

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA-
RENORBIO

VIVIANE ARAUJO DALBON

**ESTUDO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E DOS AGENTES
MICROBIANOS PARA O CONTROLE DE *Rhynchophorus* spp.
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EM ARECACEAE**

Maceió-AL
2021

VIVIANE ARAUJO DALBON

**ESTUDO DOS COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS E DOS AGENTES
MICROBIANOS PARA O CONTROLE DE *Rhynchophorus* spp.
(COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) EM ARECACEAE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção de grau de Doutor (a) no curso de Biotecnologia. Aprovada, conceito A.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana

Coorientador: Prof. Dr. Henrique Fonseca Goulart

Maceió-AL
2021

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Livia Silva dos Santos – CRB- 1670

D137e	<p>Dalbon, Viviane Araújo. Estudo dos compostos orgânicos voláteis e dos agentes microbianos para o controle de rhynchophorus spp (coleoptera: curculionidae) em arecaceae / Viviane Araújo Dalbon .– 2021. 107 f.:il.</p> <p>Orientador: Antônio Euzébio Goulart Santana. Coorientador: Henrique Fonseca Goulart.</p> <p>Tese (Doutorado na rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2021.</p> <p>Bibliografia: f. 101-106.</p> <p>1. Coqueiro - Praga. 2. Arecaceae. 3. Coleobrocas – Coqueiros – Doenças. 4. Coco nucifera. 5. Rhynchophorus palmarum. 6. Controle – Preagas - Coqueiro. I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 54:632.9</p>
-------	--

Folha de Aprovação

VIVIANE ARAUJO DALBON

Estudo dos compostos orgânicos voláteis e dos agentes microbianos para o controle de *Rhynchophorus* spp (Coleoptera: Curculionidae) em Areceaceae

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais.

Aprovada em: 21/09/2021.

BANCA EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente
Antonio Euzébio Goulart Santana
Data: 28/09/2021 23:22:26-8306
Verifique em <https://verificador.br/>

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana
Orientador - Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Documento assinado digitalmente
Henrique Fonseca Goulart
Data: 28/09/2021 11:21:24-0900
Verifique em <https://verificador.br/>

Prof. Dr. Henrique Fonseca Goulart
Coorientador - Universidade Federal de Alagoas - UFAL



Documento assinado digitalmente
Bianca Giuliano Ambrogi
Data: 24/09/2021 09:31:25-8306
Verifique em <https://verificador.br/>

Profa. Dra. Bianca Giuliano Ambrogi
Universidade Federal de Sergipe – UFS

Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB



Documento assinado digitalmente
Carlos Peres Silva
Data: 22/09/2021 13:36:55-0300
CPF: 232.039.190-20
Verifique as assinaturas em <https://ufrb.br/>

Prof. Dr. Carlos Peres Silva
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam
Universidade Federal de Sergipe - UFS

Dedico esta tese a Deus e à minha FAMÍLIA, meu apoio fundamental, pelo incentivo e amor incondicional, e por sempre estarem ao meu lado apoiando minhas decisões, e compartilhando minhas conquistas. À eles, todo meu amor, respeito, carinho e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Jesus Cristo e o Espírito Santo, a base fundamental da minha fé, o alicerce para realização de tantos sonhos nesta vida, dentre eles, ter a oportunidade de obter meu Doutorado. Obrigada pela vida cheia de amor, a bênçãos para as realizações que tem me permitido viver.

Agradeço à minha mãe, Neusa Araújo Dalbon, mulher amorosa, por sempre me fazer sentir capaz, por seu amor incondicional, e palavras de força e fé, mesmo na distância. A meu pai Dário Dalbon que sempre incentivou a superar-me. Como esquecer a minha tia Zica Dalbon, mulher de força que sempre me incentivou a vencer.

Agradeço ao meu marido, Dr. Juan Pablo Molina Acevedo, pesquisador da Agrosavia-Colômbia, pelo seu amor, compreensão, inteligência e orientação, contribuindo na minha realização pessoal e profissional, meu maior incentivador. Aos meus filhos, Larissa e Juan David, o motor e alegria da minha vida, pacientemente aguardaram a mamãe terminar sua tese.

A minha querida sogra, Rosalbina Molina Acevedo, pelo carinho e dedicação, exemplo de fortaleza e superação, quem me incentivou para ir a frente nas metas profissionais e pessoais.

A meus compadres na Itália, Cesar Pacheco e Maria Benedetto pelo seu apoio incondicional. Na Colômbia ao pesquisador de Cenicafé Juan Carlos Lopez Nuñez pela sua ajuda e conhecimento.

As minhas grandes irmãs de coração colombianas, Dra. Nancy Niño e Himelda Huertas, pelo carinho e incentivo de nunca desistir, mulheres de grande exemplo na minha vida.

Aos meus compadres e anjos no Brasil, Newton, Acacia, Nadja, Anselmo e família Santos, Celso “Barbosão”, Catarina, Luciana “Lu”, Denise, Ana Maria, Omar e minha irmã do coração, Jussara Botelho, por serem meu apoio, incentivo e carinho em momentos difíceis e de alegria.

Aos eternos amigos, com amor da minha terra, Mimoso-ES Geruza, Maria e Tereza.

Aos fieis amigos Monteria Colômbia Miguel, Marianela, Leonor, Juancho, Luchito, Luz, Berta, Kike, Adriana, Geider, Wilson, Pato, Raquel, Jorge, Maria, Lilibeth, Nora, Liliana e Lisandro.

Aos amigos inseparáveis e eternos da UENF, Campos-R.J, Lilian, Cláudia, Clara, Rívea, Antônio, Carlos Vanderley, Pueblo, Detony, Thaís, Fernanda, Kênia e Bárbara.

Aos amigos na Fé inesquecíveis, Kátia, Mary Ane, Márcio, Luiz Antônio, Fernanda, Andreia, Eva e os Pastores Cezar, Vilmar e Guarandi em Brasília-DF e em Maceió-AL, Márcia, Eliezer, Alfeu, Maria, Gutemberg, Pastor Valdiney, Ana, Anibal, Niriam, Gre, Mauricio, Geni, Pastores Fernando e Suesley, Elenir, Paulo Campos, Sandra, Cláudia e Paulo e a família ADHONEP Alagoas, que estiveram em oração por mim, esposo e filhos em momentos difíceis.

A minha queridíssima Dalvinha, conselheira, amiga fiel, meu anjo nordestino.

A amiga Lizz Kezzy, pelo carinho, dedicação e amor com todos da minha família, me apoiando e incentivando na conclusão deste trabalho. Sempre lembrarei da filhinha Bia, com saudades.

A minha amiga Prof. Regla pelas palavras de apoio e incentivo, exemplo de mulher batalhadora que desde Cuba chegou ao Brasil, com seu sorriso superando todas as barreiras.

As amigas do doutorado, Erica, Meirielly, Luciana, Fernanda e Alice, sempre ao meu lado, compartilhando alegrias, experiências e me incentivando a continuar.

Agradeço ao meu orientador e mentor, Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana, pela oportunidade, orientação, compreensão e ajuda durante toda a pesquisa. Sou grata pela sua

acolhida, pelos valiosos conselhos e ensinamentos, para meu crescimento profissional. Ao Prof Dr. Henrique Fonseca Goulart, pelo apoio no laboratório para a realização da pesquisa.

Ao Professor e mentor Dr. Francesco Porcelli da UNIBA-IT e ao Dr Thaer Yaseen da FAO, pelo apoio na minha participação no “Innovative and sustainable approaches to control the Red Palm Weevil (RPW) in CIHEAM Bari-Italia 2018”, pela oportunidade de intercâmbio internacional no estágio na Universidade de Bari na Itália, e apoio nas publicações internacionais realizadas, incentivando a pesquisa preventiva do bocado vermelho no Brasil.

In memoriam ao Pesquisador e meu co-orientador Dr. Alessandro Riffel da Embrapa Tabuleiros Costeiros, pelo incentivo, conselhos e apoio para desenvolver no início minha pesquisa no programa do Doutorado. Sempre lembrarei com carinho a imagem desse ser especial.

Agradeço ao Dr. Karlos Antônio Lisboa Ribeiro Júnior, amigo e mentor, pela grande parceria, conhecimento, compromisso e importante contribuição na análise molecular deste trabalho e demais pesquisa, sempre incentivando a seguir a frente.

Agradeço ao amigo Doutorando, João Manoel da Silva, pela incondicional ajuda durante todo processo de aprendizado relacionados a Microbiologia Ambiental, pelo estímulo e persistência.

Ao amigo Dr. Thyago Ribeiro pela incondicional ajuda e carinho, suporte e apoio nos conhecimentos em Ecologia Química.

À Professora Dra. Denise Wanderlei e Fernanda Maranhão da UFAL, pelo apoio e conhecimento na identificação taxonômica dos fungos.

Aos amigos Bruno, Miguel, Aldy, Thássia, Analice, Bruna, Isis e Jaqueline, pela sua especial amizade e companhia e incentivo nesta jornada dentro e fora do LPqRN.

Ao pesquisador Dr. Aldomario Negrisoli da Embrapa Tabuleiros Costeiros, pelo apoio nas coletas em campo, fundamental para execução e realização dos bioensaios.

Agradeço ao senhor Antônio, José Carlos e Tenório, técnicos da Embrapa Tabuleiros Costeiros, por todo o auxílio e conhecimento oferecido durante os estudos em campo.

Meu grande agradecimento ao produtor de coco Rogério da Silva, André e José, da Fazenda São José, Coruripe-AL, logrando-se um belíssimo trabalho de implementação do MIP.

Agradeço a todos os professores e funcionários do IQB/UFAL que se fizeram presentes, contribuindo para minha formação e a todos, que direta ou indiretamente me apoiaram nesta jornada, meus mais sinceros agradecimentos por fazerem parte de minha vida.

Meus grandes sinceros agradecimentos, aos distinguidos membros da banca de qualificação e defesa de tese doutoral, reconhecidos Professores Dr. Carlos Peres (UFSC), Dra. Bianca Ambrogi (UFS), Dr. Carlos de Carvalho (UFRB), Dr. Charles Estevam (UFS), Dra. Tânia Dos Santos (UFAL), Dr. Rafael Navas “in memoriam” (UFAL), Dr. Luciano Grillo (UFAL), pelos seus grandes aportes na elaboração final deste documento de tese.

Agradecimento imenso as instituições que propiciaram apoio a minha pesquisa, treinamentos, eventos e publicação de artigos científicos na execução deste projeto de tese doutoral: Programa Renorbio/UFAL; Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais da UFAL (LPqRN); FAPEAL; CAPES; INCT; Embrapa Tabuleiros Costeiros, Corporacion Colombiana de Investigación Agropecuaria AGROSAVIA; FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), University of Bari Aldo Moro, Bari-Italia; Innovative and sustainable approaches to control the Red Palm Weevil (RPW) in CIHEAM Bari-Italia 2018; Horizon 2020: EU Programme for Research and Innovation.

*“... tudo tem o seu tempo determinado,
e há tempo para todo o propósito debaixo do céu...”*

Eclesiastes 3:1

RESUMO

A família Arecaceae, constituída por 250 gêneros e 2.600 espécies, com distribuição mundial e cultivada em diferentes países com clima tropical e adaptadas a uma variedade de climas e solos. No Brasil, foram catalogados 37 gêneros nativos, com 288 espécies, das quais 123 são endêmicas e as palmeiras que apresentam com as espécies comerciais e de grande importância econômica mundial são *Cocos nucifera* L. (1758) e *Elaeis guineenses* Jacq. O coqueiro, é uma cultura de grande importância para o Brasil, devido ao seu potencial socioeconômico. Uma das limitantes na produção de coco são a incidência de pragas e de doenças nos coqueirais brasileiros que constituem um problema na exploração e propiciam uma baixa produtividade, podendo ser observadas as presenças de insetos considerados pragas desde o início da implantação das mudas até a fase adulta. Durante a etapa do crescimento, entre os 4 a 5 anos, é intensa a ação das coleobrocas, cujas larvas se alimentam dos tecidos internos da planta. Dentre as principais pragas de interesse econômico citamos *Rhynchophorus palmarum* e a praga quarantenária A1 para Brasil *Rhynchophorus ferrugineus*, as quais pertencem à família Curculionidae da ordem Coleoptera, se alimentam e ovipositam em plantas da família Arecaceae, seus hospedeiros habituais. Para mitigar os danos causados por estes insetos, são realizadas associações de vários métodos agrônômicos, dentre eles citamos: o uso do feromônio de agregação com atrativos alimentares utilizado em baldes tipo armadilha; de fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* (Bals.-Criv.) Vuill. e *Metharizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin como controladores biológicos para diminuir as populações dos insetos. Visando a busca por métodos de controle sustentáveis para culturas de palmeiras, realizou-se uma análise bibliográfica a fim de mapear desenvolvimentos científicos e tecnológicos para o controle de *R. palmarum* e *R. ferrugineus*. O objetivo principal desta pesquisa foi caracterizar os COVs dos fungos entomopatogênicos para o controle de *R. palmarum* como um modelo preventivo para *R. ferrugineus* em Arecaceae. Para a extração dos voláteis dos Fungos Entomopatogênicos (FEs) usou-se um sistema de aeração por um período de 24 horas. Após dessorção com hexano os extratos foram analisados por CG-DID, CG-EM, CG-EAG e realizados bioensaios. A identificação morfológica dos FEs baseou-se na técnica de microcultivo em médio BDA e para a molecular os isolados foram submetidos ao protocolo de extração de DNA, amplificação e sequenciamento, utilizando os marcadores ITS-rDNA (Internal Transcrito Spacer) e α -TEF (Translation Elongation Factor-1 α). Nos bioensaios de patogenicidade utilizou-se os isolados nativos denominados CVAD01, CVAD02, CVAD06 em relação *B. bassiana* CPATC/032 e *B. bassiana* isolado comercial, na suspensão fúngica de $1,0 \times 10^9$ conídios/mL. As análises morfológicas e filogenética possibilitaram a identificação dos FEs nativos pertencentes a espécie *B. bassiana*. Os testes de patogenicidade causaram alta mortalidade para *R. palmarum* em relação às testemunhas. O extrato do isolado CVAD01 não apresentou atividade no olfatômetro, enquanto CVAD02 foi ativo, porém ambos extratos foram bioativos no teste eletrofisiológico. As análises cromatográficas dos extratos indicaram a presença de dois álcoois, três hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos, dois monoterpênicos e três cetonas. Conclui-se que isolados nativos de *B. bassiana* e os compostos identificados podem ser bioprodutos com potencial para uso no controle dessas coleobrocas.

Palavras chave: Arecaceae. *Cocos nucifera*. *Beauveria* spp. *R. palmarum*.

ABSTRACT

The Arecaceae family, consisting of 250 genera and 2,600 species, with worldwide distribution and grown in different countries with tropical climate and adapted to a variety of climates and soils. In Brazil, 37 native genera are catalog, with 288 species, where 123 are endemic, among the commercial species *Cocos nucifera* L. (1758) and *Eleais guinenses*. One of the limitations in the production of coconut in Brasil, is the incidence of pests and diseases in coconut trees, which are a problem in the farm and provide low productivity, and can be observed the presence of insects considered pests initially in the beginning of plantation, the seedlings until harvest. During the growth stage, between 4 and 5 years, the action of insect borers is intense, whose larvae feed on the internal tissues of the plant. Among the main pests of economic interest, we mention *Rhynchophorus palmarum* and the quarantine pest A1 to Brasil *Rhynchophorus ferrugineus*, belonging to family Curculionidae and order Coleoptera, feed and oviposit on plants of the family Arecaceae, their usual hosts. To mitigate the damage caused by these insects, several agronomic methods are associated, among which are mention: the use of aggregation pheromone with food attractive used in trap-type buckets; of entomopathogenic fungi like *Beauveria bassiana* and *Metharizium anisopliae* as biological controllers to decrease insect populations. Aiming at the search for sustainable control methods for palm cultures, a bibliographic analysis was carried out in order to map scientific and technological developments for the control of *R. palmarum* and *R. ferrugineus*. The main objective of this research was to characterize the VOCs of entomotogenic fungi for the control of *R. plamarum* as a preventive model for *R. ferrugineus* in Arecaceae. For the extraction of volatiles from Entomopathogenic Fungi (EFs) an aeration system was used for a period of 24 hours. After desorption with hexane the extracts were analyzed by GC-DID, GC-EM, GC-EAG and bioassays performed. The morphological identification of the EFs was based on the microculture technique in medium PDA and for the molecular technique, the isolates were submitted to the DNA extraction, amplification and sequencing protocol, using the *ITS*-rDNA (Internal Transcript Spacer) and α -*TEF* (Translation Elongation Factor-1 α). In the pathogenicity bioassays, native isolates called CVAD01, CVAD02, CVAD06 were used in relation to *B. bassiana* CPATC/032 and *B. bassiana* commercial isolate, in a fungal suspension of 1.0×10^9 conidia/mL. The morphological and phylogenetic analyzes allowed the identification of native EFs belonging to the species *B. bassiana*. Pathogenicity tests caused high mortality for *R. palmarum* compared to controls. The extract of the isolate CVAD01 showed no activity in the olfactometer, while CVAD02 was active, but both extracts were bioactive in the electrophysiological test. The chromatographic analyzes of the extracts indicated the presence of two alcohols, three aromatic and aliphatic hydrocarbons, two monoterpenes and three ketones. It is concluded that native *B. bassiana* isolates and the identified compounds can be bioproducts with potential for use in the control of these beetles.

Keywords: Arecaceae. *Cocos nucifera*. *Beauveria* spp. *R. palmarum*.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO II

FIGURE 1: COCONUT PRODUCTION MAP IN BRAZIL; GEODETIC REFERENCE SYSTEM (SIRGAS-2000)..... 39

FIGURE 2: PICTORIAL SCHEME OF THE SOURCE USED FOR RHYNCHOPHORUS FERRUGINEUS LURING 44

FIGURE 3: SCHEMATIC DIAGRAM OF THE INFECTION PROCESS BY *B. BASSIANA* AFTER VISITING A BAITING AND CONTAMINATING STATION. (A) INFECTION FUNGI PROCESS IN THE LABORATORY SHOWING PATHOGENICITY AND MORTALITY; (B) ILLUSTRATIVE INFECTION CYCLE DEPICTED BY *B. BASSIANA* IN *R. PALMARUM*: (1) SPORE ADHESION; (2) CUTICLE HYDROLYSIS AND BREAKING; (3) FUNGAL CELLS CHANGE THEIR CELL STRUCTURES IN CONTACT WITH HEMOLYMPH AND SECRETE SECONDARY METABOLITES; (4) SWITCH TO A YEAST-LIKE STRUCTURE TO COLONIZE AND KILL THE INSECT; AND (5) SPORULATION..... 46

CAPITULO III

FIGURA 1: LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DEL MUNICIPIO DE CORURIBE (ALAGOAS, BRASIL). COORDENADAS DEL ÁREA DE ESTUDIO: 10°08'30.5"S, 36°12'00.7"O..... 60

FIGURA 2: RESPUESTA PORCENTUAL DE *R. PALMARUM* AL EXTRACTO PROCEDENTE DEL HONGOS ENTOMOPATÓGENOS. A: CVAD01 (HEMBRAS: $p=0,53$; $x^2=0,41$; MACHOS: $p=0,34$; $x^2=0,91$); B: CVAD02 (HEMBRAS: $p=0,19$; $x^2=1,62$; MACHOS: $p=0,04$; $x^2=3,95$); C: CVAD01 EN MEDIO PDA, Y FRENTE AL CONTROL (MEDIO PDA SIN INOCULAR, "MC")(HEMBRAS: $p=0,53$; $x^2=0,41$; MACHOS: $p=0,01$; $x^2=5,52$); D: CVAD02 EN MEDIO PDA, Y FRENTE AL CONTROL (MÉDIO PDA SIN INOCULAR. "MC") (HEMBRAS: $GL=1$; $p=0,13$; $x^2=0,12$; MACHOS: $p=0,72$; $x^2=0,12$). PARA TODOS LOS ENSAYOS $N=20$; $GL=1$. EL ASTERISCO INDICA DIFERENCIA SIGNIFICATIVA ENTRE TRATAMIENTOS, PARA EL SEXO INDICADO..... 63

FIGURA 3: RESPUESTA DE EAG (MEDIAS±ERROR ESTÁNDAR) DE LAS ANTENAS DE *R. PALMARUM* FRENTE A EXTRACTOS DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS Y AL HEXANO (CONTROL). A: HEMBRAS, CVAD01 ($1,89±0,79$ mV), CVAD02 ($1,83±0,84$ mV) Y CONTROL ($1,02±0,49$ mV) ($N=5$), PRUEBA DE DE TUKEY ($GL=2$; $p<0,01$; $CV\%=12,99$; DATOS TRANSFORMADOS POR \sqrt{x}). LETRAS DISTINTAS INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS. PARA AMBOS SEXOS $N=5$ 65

FIGURA 4: RESPUESTA ELECTROANTENOGRÁFICA (GC-EAG) REPRESENTATIVA PARA MACHOS Y HEMBRAS DE *R. PALMARUM* EXPUESTOS A EXTRACTOS DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS ($N=5$). A-C: CVAD01, TIEMPOS DE RETENCIÓN (MINUTOS) DE LOS COMPONENTES ANTENALMENTE ACTIVOS: 16,83 (A), 24,48 (B) Y 35,33 (C); D-F: CVAD02, TIEMPOS DE RETENCIÓN: 16,83 Y 18,66 (D), 24,48 (E) Y 35,33 (F). 66

CAPITULO IV

FIGURA 1: COLETA A CAMPO. (A) PLANTAÇÃO DE COCO DA FAZENDA SÃO JOSÉ, MUNICÍPIO DE CORURIBE – ALAGOAS, COM INFESTAÇÃO DE *R. PALMARUM*; (B) COQUEIRO COM MANIFESTAÇÃO DA DOENÇA DO ANEL VERMELHO; (C E D) *R. PALMARUM* PARASITADOS COM FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NATIVOS. 78

FIGURA 2: ETAPAS PARA CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NATIVOS (A E B) CORTES DO MEIO DE CULTURA EM BLOCOS; (C) REPICAGEM DOS ISOLADOS; (D) MONTAGEM DA PLACA COM AS LÂMINAS PARA A MICROCULTURA. 79

FIGURA 3: ADULTOS DE *R. PALMARUM* EM POTES PLÁSTICOS COM PAPEL FILTRO E CANA, IMERSOS EM 20 mL DE SUSPENSÃO FÚNGICA (CONÍDIOS DO FUNGO + ÁGUA ESTÉRIL E TWEEN 80) NA CONCENTRAÇÃO DE 1.0×10^9 CONÍDIOS/MLM, DURANTE DOIS CICLOS DE TRÊS SEGUNDOS CADA. ORDEM DO BIOENSAIO: (A) COMERCIAL; (B) CPATC032; (C) CVAD06; (D) CVAD02; (E) CVAD01 E (F) TESTEMUNHA. 81

FIGURA 4: ISOLADOS DOS FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS NATIVOS REPICADOS EM MEIO BDA 1ª.) LINHA SÃO O VERSO DOS DIFERENTES ISOLADOS NA ORDEM: (A) CVAD01, (B) CVAD02, (C) CVAD06, (D) COMERCIAL E (E) CPATC/032; 2ª. E 3ª) LINHA DO REVERSO DOS DIFERENTES ISOLADOS. 86

FIGURA 5: CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DOS ISOLADOS, APRESENTANDO ASPECTOS SEMELHANTES À ESPÉCIE *B. BASSIANA*: (A-B) PARTE MICELIAL E HIFAS SEPTADAS, (C-D) CONÍDIOS; 40X. 87

FIGURA 6: CICLO BIOLÓGICO COMPLETO NO INSETO *RHYNCHOPHORUS PALMARUM* POR *B. BASSIANA* ISOLADOS NATIVOS CVAD01 (19 DIAS), CVAD02 (20 DIAS), CVAD06 (23 DIAS) VERSUS AS TESTEMUNHAS *B. BASSIANA* CPATC/032 (23 DIAS) E *B. BASSIANA* COMERCIAL (25 DIAS). REPRESENTADOS POR: (A) INÍCIO DA INFECÇÃO; (B) INÍCIO DO CRESCIMENTO DO MICÉLIO; (C) COBRIMENTO DO MICÉLIO E (D) ESPORULAÇÃO. 89

FIGURA 7: ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS DOS ISOLADOS *BEAUVERIA BASSIANA* ATRAVÉS DA ANÁLISE BAYESIANA DA REGIÃO INTERGÊNICA ITS. VALORES DE PROBABILIDADE POSTERIORES BAYESIANOS $>0,55$ SÃO INDICADOS NOS NÓS. *ISARIA TENUIPES* E *ISARIA FARINOSA* FOI UTILIZADO COMO GRUPO EXTERNO. OS ISOLADOS OBTIDOS NESTE ESTUDO ESTÃO RESPRESEDADOS POR CVAD2, CVAD1 E CVD6. A BARRA DE ESCALA (0,02) REPRESENTA SUBSTITUIÇÕES DE NUCLEOTÍDEOS POR SÍTIO. AS ANÁLISES OCORRERAM POR 10 MILHÕES DE GERAÇÕES USANDO QUATRO CADEIAS E AMOSTRADAS A CADA 1.000 GERAÇÕES, PARA UM TOTAL DE 10.000 ÁRVORES. 97

FIGURA 8: ÁRVORE FILOGENÉTICA DOS ISOLADOS DOS ISOLADOS *BEAUVERIA BASSIANA* ATRAVÉS DA ANÁLISE BAYESIANA DA REGIÃO INTERGÊNICA TEF. VALORES DE PROBABILIDADE POSTERIORES BAYESIANOS $>0,82$ SÃO INDICADOS NOS NÓS. *METARHIZIUM ANISOPLIAE* FOI UTILIZADO COMO GRUPO EXTERNO. OS ISOLADOS OBTIDOS NESTE ESTUDO ESTÃO RESPRESEDADOS POR CVAD2, CVAD1 E CVD6. A BARRA DE ESCALA (0,05) REPRESENTA SUBSTITUIÇÕES DE NUCLEOTÍDEOS POR SÍTIO AS ANÁLISES OCORRERAM POR

10 MILHÕES DE GERAÇÕES USANDO QUATRO CADEIAS E AMOSTRADAS A CADA 1.000 GERAÇÕES, PARA UM TOTAL DE 10.000 ÁRVORES.USANDO MrBAYES v. 3.2.3.. 98

FIGURA 9: ÁRVORE FILOGENÉTICA DE INFERÊNCIA BAYESIANA DOS ISOLADOS BEAUVERIA BASSIANA BASEADA EM SEQUÊNCIAS CONCATENADAS DOS GENES ITS E TEF. VALORES DE PROBABILIDADE POSTERIORES BAYESIANOS >0,55 SÃO INDICADOS NOS NÓS. ISARIA TENUIPES E ISARIA FARINOSA FOI UTILIZADO COMO GRUPO EXTERNO. OS ISOLADOS OBTIDOS NESTE ESTUDO ESTÃO RESPRESEDADOS POR CVAD2, CVAD1 E CVD6. A BARRA DE ESCALA (0,02) REPRESENTA SUBSTITUIÇÕES DE NUCLEOTÍDEOS POR SÍTIO. AS ANÁLISES OCORRERAM POR 10 MILHÕES DE GERAÇÕES USANDO QUATRO CADEIAS E AMOSTRADAS A CADA 1.000 GERAÇÕES, PARA UM TOTAL DE 10.000 ÁRVORES.....99

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II

TABLE 1: <i>RHYNCHOPHORUS PALMARUM</i> AND <i>RHYNCHOPHORUS FERRUGINEUS</i> QUICK CARD.	40
--	----

CAPITULO III

TABLA 1: COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES COMUNES A LOS EXTRACTOS DE LOS DOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS, CARACTERIZADOS POR EL MÉTODO CG-EM, Y SUS RESPECTIVOS IRL. BIBLIOTECA DE REFERENCIA (CG-EM) - (NIST- NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY). TR M TIEMPO DE RETENCIÓN EN MINUTOS; IRL _C - ÍNDICE DE RETENCIÓN LINEAR CALCULADO A PARTIR DE UNA ECUACIÓN LINEAR BASADA EN LOS TIEMPOS DE RETENCIÓN DE LOS COMPUESTOS IDENTIFICADOS EN RELACIÓN CON UNA SERIE HOMÓLOGA DE N-ALCANOS (C ₇ -C ₃₀ /C ₁₃) (SIGMA-ALDRICH, SAN LUIS, MISSOURI, USA) INYECTADOS EN LAS MISMAS CONDICIONES QUE LAS MUESTRAS.	67
---	----

CAPITULO IV

TABELA 1: HOSPEDEIROS E PROCEDÊNCIA DOS ISOLADOS DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS	81
TABELA 2: PRIMERS UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES	84
TABELA 3: DESCRIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES PARA A O PCR.....	84
TABELA 4: ISOLADOS USADOS NA ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	86
TABELA 5: PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DOS FÊS NATIVOS SOBRE <i>R. PALMARUM</i> . PM (PORCENTAGEM DE MORTALIDADE); PMC (PORCENTAGEM DE MORTALIDADE CORRIGIDA); T* (TRATAMENTO); DP (DESVIO PADRÃO).....	91
TABELA 6: PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DOS FÊS NATIVOS SOBRE <i>R. PALMARUM</i> . PM (PORCENTAGEM DE MORTALIDADE); PMC (PORCENTAGEM DE MORTALIDADE CORRIGIDA); T* (TRATAMENTO); DP (DESVIO PADRÃO).....	93
TABELA 7: PORCENTAGEM DE MORTALIDADE DOS FÊS NATIVOS SOBRE <i>R. PALMARUM</i> . PM (PORCENTAGEM DE MORTALIDADE); PMC (PORCENTAGEM DE MORTALIDADE CORRIGIDA); T* (TRATAMENTO); DP (DESVIO PADRÃO).....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
COVs	Composto Orgânico Volátil
cm	Centímetro
GC-EAG	Cromatografia gasosa acoplada à eletroantenografia
ITS	Espaçador Transcrito Interno
s	Espécie
FEs	Fungo entomopatogênicos
HPLC	Grau de pureza do composto
GL	Grau de Liberdade
°C	Graus Celsius
ha	Hectare
KI	Índice de Kovarts
L	Litro
m	Metro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
pb	Pares de base
p	Probabilidade
%	Porcentagem
X ²	Qui-quadrado
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SAS	Sistema de Análise Estatística
TR	Tempo de Retenção
t	Toneladas
vol	Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	23
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO I: EARLY DETECTION AND PREVENTIVE CONTROL OF <i>Rhynchophorus ferrugineus</i> (COLEOPTERA CURCULIONIDAE): A QUARANTINE PEST IN BRAZIL.	28
Introduction	29
Potential strategies of early detection and control of red palm weevil in Brazil.....	31
Exploitable foreground.....	31
Microbial Agents	31
Tachinid parasitoids.....	31
Pest behavior-modifying chemicals	32
Perspectives for integrated pest management for all strategies of control against <i>R. palmarum</i> and <i>R. ferrugineus</i> in the field in Brazil.....	32
References.....	33
CAPÍTULO II: PERSPECTIVES FOR A SYNERGIC BLEND OF ATTRACTIVE SOURCES IN SOUTH AMERICAN PALM WEEVIL MASS TRAPPING: WAITING FOR THE RED PALM WEEVIL BRAZIL INVASION.	36
1. Introduction	38
2. The genus <i>Rhynchophorus</i> spp.....	38
2.1. South American Palm Weevil	39
2.1.1 Biology	40
3. Red Palm Weevil.....	41
3.1 Biology	42
4. Damage to the host plant	43
<i>Rhynchophorus</i> spp. Pheromone and Other Attractive Sources.....	44
5.1 Attractive accounts for South American palm weevil.....	44
5.2 Attractive Source for Red Palm Weevil.	44
6. Alternative for <i>Rhynchophorus palmarum</i> and <i>Rhynchophorus ferrugineus</i> Control.....	45
7. Future Challenges and Prospects.....	48
References.....	50
CAPITULO III: RESPUESTA COMPORTAMENTAL Y ELECTROFISIOLÓGICA DE <i>Rhynchophorus palmarum</i> (L., 1764) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) A COMPUESTOS VOLÁTILES DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS ...	56
Introducción.....	58
Material y métodos	60
Captura de insectos y obtención de hongos entomopatógenos nativos	60
Extracción de los compuestos orgánicos volátiles de hongos entomopatógenos nativos en medio PDA	61
Bioensayo comportamental	62
Bioensayo electrofisiológico	62
Análisis por cromatografía	63
Análisis estadístico	64
Resultados.....	64

Bioensayo comportamental	64
Bioensayo eletrofisiológico	65
Análisis por cromatografía	66
Discusión	67
Conclusión	69
Agradecimientos	69
Referencias	69

CAPÍTULO IV- CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS NATIVOS DE *Beauveria* spp. em *Rhynchophorus palmarum* (LINNEAUS, 1758) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

1.INTRODUÇÃO.....	76
2.MATERIAIS E MÉTODOS.....	78
2.1 Amostragem e isolamento de fungos entomopatogênicos	78
2.2 Caracterização morfológica dos fungos entomopatogênicos nativos.....	79
2.3 Avaliação da Mortalidade e Patogenicidade dos fungos entomopatogênicos nativos de <i>R. palmarum</i>	80
2.3.1 Isolados de fungos entomopatogênicos	80
2.3.2 Bioensaio de patogenicidade no inseto.....	81
2.4 Caracterização molecular dos fungos entomopatogênicos nativos	83
2.4.1 Extração de DNA.....	83
2.4.2 Amplificação, Purificação e Sequenciamento do DNA	83
2.4.3 Edição de dados e análise filogenética.....	85
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
3.1 Caracterização morfofisiológica dos fungos entomopatogênicos nativos.....	87
3.3 Avaliação da mortalidade e patogenicidade dos fungos entomopatogênicos nativos em <i>Rhynchophorus palmarum</i>	89
3.4 Caracterização molecular dos fungos entomopatogênicos nativos	95
4. CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	101

CONCLUSÕES FINAIS	107
-------------------------	-----

1 INTRODUÇÃO GERAL

As Arecaceas ocorrem em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, são de grande importância ecológica e econômica, exibem padrões espaciais e espécies com ampla distribuição e diversidade adaptadas a uma variedade de climas e solos (SOARES et al. 2014; EISERHARDT et al. 2011). É constituída por 250 gêneros e 2.600 espécies (DRANSFIELD et al. 2008).

No Brasil, estão catalogados 37 gêneros nativos, com 288 espécies, 123 endêmicas, estando alguns gêneros com valor comercial no nível internacional, dentre estes, *Cocos nucifera* L. (LEITMAN et al. 2015). As variedades de coqueiros com abertura no mercado nacional são as denominadas Typica (variedade gigante) e Nana (variedade Anã). As cultivares “Anã amarela e Anã vermelha” não possui uma boa demanda por relacionarem à cor ao estágio de maturação avançado do coco verde (FLORA DO BRASIL, 2020).

Segundo dados da FAO (2018), para o período compreendido entre 2012 a 2018, o cultivo do coqueiro foi praticado em 92 países, destacando Ásia com (83,6%), seguidos do continente Americano com (8,5%), Oceania (4,6%) e África (3,4%) da produção anual. Em relação aos países, os maiores produtores, em ordem decrescente são: Indonésia, Filipinas, Índia, Brasil e Sri Lanka, dentre outros países que somaram 52 milhões de toneladas, representando 83.2% da produção mundial.

No Brasil, a área plantada em 2018 foi de 198 mil ha (FAO, 2018). A região Nordeste corresponde a 82,9% da área colhida de coco do Brasil e 74% da produção nacional. O coqueiro, por ser uma planta de clima tropical, teve uma rápida disseminação pelo litoral nordestino, por encontrar na região características edafoclimáticas favoráveis para o cultivo, ocupando um ecossistema com poucas possibilidades de outras explorações comerciais, tendo um grande significado social para região.

Os estados nordestinos com maior área em produção de coco do Brasil para o ano de 2018, destacam-se a Bahia, seguida do Ceará, Sergipe e Alagoas, que juntas correspondem a mais de 146.855 ha de terra (IBGE, 2018).

A produção de coco é de grande importância econômica e também social para região nordeste, devido a diversidades de produtos gerados a partir do beneficiamento, tais produtos podem ser de caráter artesanal, matéria-prima para indústria de cosméticos e alimentícios, na construção de casas, no uso tradicional do coco *in natura*, gerando oportunidades de emprego e renda às comunidades (FERREIRA et al. 1998).

Todavia, uma das limitantes na produção de coco é a incidência de pragas e de doenças nos coqueirais brasileiros, que constituem um problema na exploração e propiciam uma baixa produtividade. A presença de insetos-praga, conhecidos como coleobrocas, são observados nas lavouras desde o início da implantação das mudas até a fase adulta.

Dentre as coleobrocas de interesse econômico está *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae), conhecido como broca-do-olho-do-coqueiro, principal praga em plantações de coco (*Cocos nucifera*) e dendê (*Elaeis guineenses*). O aumento das populações de *R. palmarum* é favorecido pelo hábito críptico das larvas, com crescimento endofítico. As galerias formadas dentro da planta os protegem de possíveis inimigos naturais e de inseticidas, e é responsável pela transmissão do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus* Coob (Aphlenchida: Parasitaphelenchidae), o agente causador da doença do anel vermelho, denominado no complexo besouro-nemátodo, com um registro único que aumenta os danos às palmeiras na América (FERREIRA, 2002).

Em 2018, *R. ferrugineus* foi decretado no Brasil como praga quarentenária A1, com distribuição geográfica desde Indonésia até América do Sul, com presença nas Ilhas de Curaçao e Aruba (FIABOE, 2012) causando grandes prejuízos em palmeiras ornamentais na Europa e Ásia (EPPO, 2020).

Nesta perspectiva, o manejo integrado de pragas surge como uma alternativa ambientalmente sustentável no uso de controle naturais de insetos com importância econômica, possibilitando um novo conceito de manutenção dos sistemas produtivos. Dentre as estratégias de controle de artrópodes para mitigar os danos causados por insetos pragas, são utilizados o feromônio de agregação associado com compostos orgânicos voláteis, como também parasitoides, predadores e de patógenos, capazes de regular a população de pragas importantes no campo.

Neste viés, os fungos entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopla* são muito utilizados nessas estratégias. São microorganismos que podem induzir uma doença específica, infectando os insetos em vários nichos, causando epizootias e também produzir compostos orgânicos voláteis durante o processo de infecção. Tais compostos representam uma fonte de compostos promissores ao biocontrole, estes com caráter antifúngico, inseticida, atraentes, nematicidas e repelentes de artrópodes (KANDASAMY et al. 2016; WERNER et al. 2016; XU et al. 2015; STENBERG et al. 2015; GUARINO et al. 2014)

Baseado nessas premissas, esta pesquisa tem por objetivo geral caracterizar COVs dos fungos entomopatogênicos para o controle de *R. palmarum* como um modelo preventivo para *R.*

ferrugineus em Arecaceae. Os objetivos específicos tem por finalidade (i) realizar uma análise bibliográfica a fim de mapear desenvolvimentos científicos e tecnológicos para o controle de *R. palmarum* e *R. ferrugineus* em Arecaceae; (ii) caracterizar os Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) emitidos por fungos entomopatogênicos nativos; (iii) identificar os isolados de fungos entomopatogênicos nativos com técnicas de morfologia taxonômica e molecular, como também verificar a patogenicidade destes isolados em relação a adultos *R. palmarum*, de maneira a proporcionar conhecimentos em biocontrole como um modelo preventivo para *R. ferrugineus*, frente à chegada deste inseto no território Nacional, considerado praga quarentenária A1. Portanto, os capítulos aqui apresentados circundam em relação ao controle do inseto *R. palmarum*, como modelo de estudo preventivo para *R. ferrugineus*.

REFERÊNCIAS

DRANSFIELD, J. et al. *Genera Palmarum: The Evolution and Classification of Palms* Kew. UK: **Kew Publishing**, 2008.

EISERHARDT, W. L. et al. Geographical ecology of the palms (Arecaceae): determinants of diversity and distributions across spatial scales. **Annals of Botany**, v. 108, n. 8, p. 1391-1416, 2011.

EPPO. **European and Mediterranean Plant Protection Organization. Global Database**. 2020. Disponível em: <https://gd.eppo.int>. Acesso em: 21 fev. 2020.

FAO. FAOStat: **Food and Agriculture Organization of the United Nations-Statistics Division**. 2018. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 21 fev. 2020.

FERREIRA, J. M. S.; ARAÚJO, R. P. C.; SARRO, F. B. Táticas de manejo das pragas. In: Ferreira, J. M. S. (Ed.). **Coco, fitossanidade**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p. 83, 2002.

FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. (Ed.). **A cultura do coqueiro no Brasil**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Aracaju: Embrapa-CPATC, 1998. 292 p.

FIABOE, K. K. M. et al. Predicting the potential worldwide distribution of the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) using ecological niche modeling. **Florida Entomologist**, p. 659-673, 2012.

FLORA DO BRASIL. Em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br>. Acesso em: 23 de março de 2020.

GUARINO, S. et al. Behaviour-modifying compounds for management of the red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus* Oliver). **Pest Management Science**, v. 71, n. 12, p. 1605-1610, 2014.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agrícola, Produção permanente de coco, 2018. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br>. Acesso em: 26 de fev. 2021.

KANDASAMY, D.; GERSHENZON, J.; HAMMERBACHER, A. Volatile organic compounds emitted by fungal associates of conifer bark beetles and their potential in bark beetle control. **Journal of Chemical Ecology**, v. 42, n. 9, p. 952-969, 2016.

LEITMAN, P. et al. Arecaceae in Lista de espécies da flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 2015.

SOARES, K. P. et al. Palmeiras (Arecaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 65, p. 113-139, 2014.

STENBERG, J. A. et al. Optimizing crops for biocontrol of pests and disease. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 11, p. 698-712, 2015.

WERNER, S.; POLLE, A.; BRINKMANN, N. Belowground communication: impacts of volatile organic compounds (VOCs) from soil fungi on other soil-inhabiting organisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 20, p. 8651-8665, 2016.

XU, Y. J. et al. Metabolomics reveals insect metabolic responses associated with fungal infection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 16, p. 4815-4821, 2015.

CAPÍTULO I: EARLY DETECTION AND PREVENTIVE CONTROL OF *Rhynchophorus ferrugineus* (COLEOPTERA CURCULIONIDAE): A QUARANTINE PEST IN BRAZIL.

Artigo de revisão publicado em **Arab Journal of Plant Protection**, 37(2): 130-135, 2019.

<http://dx.doi.org/10.22268/AJPP-037.2.130135>

Early detection and preventive control of *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera Curculionidae): a quarantine pest in Brazil

V.A. Dalbon¹, J.P.M. Acevedo², A.E.G. Santana³, H.F. Goulart³, I. Laterza⁴, A. Riffel⁵, A. Negrisoli Jr⁵, B. Lohr² and F. Porcelli⁴

(1) Doctoral Student in Biotechnology Natural Resources Renorbio, University Federal of Alagoas, Brazil, email: viviane.dalbon@iqb.ufal.br; (2) Researcher in Colombian Corporation of Agricultural Research, Agrosavia, Colombia; (3) Associate Professors of University Federal de Alagoas, Brazil; (4) Doctoral student and Associate Professor of University of Bari Aldo Moro, DiSSPA, Via Amendola, 165/A 70126 Bari – Italy; (5) Researcher in Brazilian Corporation of Agricultural Research – Embrapa Tabuleiros Costeiros, Sergipe, Brazil

Abstract

Dalbon, V.A., J.P.M. Acevedo, A.E.G. Santana, H.F. Goulart, I. Laterza, A. Riffel, A. Negrisoli Jr, B. Lohr and F. Porcelli. 2019. Early detection and preventive control of *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera Curculionidae): a quarantine pest in Brazil. Arab Journal of Plant Protection, 37(2): 130-135.

Red palm weevil (RPW) *Rhynchophorus ferrugineus* was described as pest from tropical Asia, Mediterranean Europe, North Africa and America (California USA, 2009 and Curacao and Aruba, 2011). There is a risk for RPW invasion in South and Central America, where the weevil could infest economic palms as coconut and Guinean oil palm. The possible invasion represents a severe risk to Brazilian agriculture, and now RPW is an A1 quarantine pest with pending alert. Having available a preventive strategy of monitoring and control before the pest enters the Country would mitigate the threat for the agriculture. Because of this we are developing in Brazil a semiochemical and biological control based strategies for RPW early detection and control. We set tests with Ferrugineol in olfactometer and lured traps in field to evaluate that semiochemical use to evaluate luring of the South American palm weevil (SAPW) *Rhynchophorus palmarum* as a model pest. Moreover, biological control agents such as entomopathogenic fungi and nematodes are now available for virulence bioassays in Brazil. Field tests will be conducted with a combination of semiochemical and biological agents to determine the level of control with *R. palmarum*. Subsequently, tests with RPW outside Brazil will be carried out. We expect to find promising combination of mass trapping and biocontrol agent to propose an effective action for the RPW management and the contemporary evaluation of its control efficacy. The study will suggest a new component to develop sustainable control strategies by the joining of intercontinental experiences and approaches. **Keywords:** Palmaceae, pest alert, insect attack, microbial control, ethological control, America.

Introduction

Red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1970) (Coleoptera: Curculionidae), hereafter RPW, is endemic in large areas of Asia, but has invaded the Middle East and Europe in the 1980's, and more recently North America and the Caribbean. The adult beetles are relatively large, ranging from two to four centimeters long, and usually exhibit a rusty red color. However, many color variants exist, which often lead to mis-identifications (Rugman-Jones *et al.* 2013). The larvae excavate galleries up to a meter long and propagate microorganisms (Scrase, *et al.*, 2016) in the stipe of a palm trees, thereby weakening and eventually killing the host plant. As a result, the weevil is considered a major pest in palm plantations in the world, including the coconut palm, date palm and oil palm (Rochat *et al.*, 2017).

Since 1972 RPW was detected and initiated dispersion in tropical Asia (Indonesia). Between 1980 to 1994 its range expanded to India, the Persian Gulf, and Israel until arriving in North Africa and Mediterranean Europe (Italy, Portugal and Spain) (Rochat *et al.*, 2017). In 2009 RPW was detected in California and in December 2008 in the Caribbean island of Curacao (Roda *et al.*, 2011) and in 2009 in the Caribbean island of Aruba near the Venezuelan coast (Löhr, 2015).

The arrival of this pest to Curaçao is suspected to be due to the importation of mature date palms from Egypt for landscaping in hotel and residential developments (Roda *et al.*, 2011). Shipments of palms from Curacao to Aruba, and the lack of local phytosanitary policies and regulations, have resulted in the most recent establishment of RPW on Aruba. Fiaboe and Roda, (2012) presented prediction maps, based on the adaptability characteristics of the pest, with pest establishment likely in all tropical and subtropical environments of South and Central America and Central Africa.

The first sign of infestation by the pest is yellowing and wilting of palm leaves. The crown wilts first, and lower leaves will follow, due to damage to vascular tissue. Major symptoms such as crown loss or leaf wilt are usually only visible long after the palm has become infested. By the time these external symptoms are observed, the damage is usually sufficient to kill the tree, and the infestation may have been present for six months or longer. In high-density infestations, sounds of the larvae burrowing and chewing can be heard by placing one's ear to the trunk of the palm. Recent research has been conducted using electronic listening devices or dogs trained to recognize the scent of weevils or palm decay to detect infestations at low densities earlier in the process (Rochat *et al.*, 2017).

The prevention of entry of high risk organisms to potentially vulnerable countries is necessary. Such prevention can be achieved through offshore mitigation strategies ranging from diagnosis of the presence/absence of a pest threat in adjacent countries and/or territories to eradication. The principal risk at present, is the invasion of South America by RPW, in particular for the main producer countries of commercial palm species like Brazil and Colombia. Brazil has 280,000 hectares cultivated with coconut and 210,000 hectares with oil palms (ABRAPALMA, 2017), while Colombia has 30,000 hectares cultivated with coconut and 470,000 hectares with oil palms (Dane, 2015.; Abrapalma, 2017) which would be endangered by the eventual invasion of *R. ferrugineus*.

In America, another palm weevil exist, with similar behavior and biology, and can be a model for RPW management, called South American palm weevil SPW, *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae). This weevil is common in virgin forests and in agroecosystems infesting all commercially important palm species mainly of *Cocos nucifera* L. (Arecales: Arecaceae), *Elaeis guineensis* Jacq. (Arecales: Arecaceae) (Sánchez and Cerda, 1993), in addition to ornamental palm species. The larvae of *R. palmarum* feed exclusively on live vegetative tissue. Studies on the population dynamics of this species in Brazil showed that the maximum adult population peaks during the dry season (Schuiling and Van Dinther, 1981). Bain and Fedon (1951) determined that *R. palmarum* is the most important vector of the phytonematode *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) (Aphlenchida: Parasitaphelenchidae) which is the causal agent red ring disease of coconut and oil palm disease. The nematode is an obligate parasite distributed in all tissues of the plant. Redring disease has reached epiphytotic levels in the past (Griffith, 1968). The external symptoms on infested palms are a progressive yellowing of the foliar area, destruction of the emerging leaf and flowers necrosis. Leaves start to dry in ascending order in the crown; the apical leaf bends and eventually drops. However, these external symptoms are not sufficient for clear diagnosis. Internally, the galleries and damage to leaf-stems produced by the larvae are easily detected in heavily infested plants. Large economic impact of SPW in South and Central America has been reported in Brazil, Colombia, Venezuela and Costa Rica. The larvae of SPW feed on the tender tissue in the crown of the palm, often destroying the apical growth area and eventually causing death of the palm. Economic damage depends on the palm species and on the number of infesting larvae (Dalbon *et al.*, 2018).

Esser and Meredith (1987) estimated that several million USD are lost annually due to the association of redring disease and SPW. They estimated that 800 ha of coconut plantations were abandoned due to this disease in Grenada, with 22% of the coconut palms were infested with red-ring disease. A similar situation seems to be common in other countries in America. More recently in Colombia, in the years 2014-2016, the damage of SPW in the pacific coast affected 8,000 hectares of coconut palms and 470,000 ha of oil palm. In Brazil *R. palmarum* affected coconut and oil palms an area of at least 250,000 hectares.

Control strategies have to take into account that SPW is a pest in its own right and a vector of *B. cocophilus*. The control of red-ring disease is currently conducted by controlling the insect vector but there is no efficient control method of the nematode. Chemical control of the insect, although often attempted, is not successful (Hagley, 1963). Cultural control consisting in the eradication and burning of affected trees reduce infestation. Chemical killing and drying of infected plants also reduce infestation (Griffith, 1987), as larvae need living plant tissue in order to survive. The most widely used control methods are based on the capture of adults with traps baited with rotting plant materials, such as palm tissue, pineapple and sugar cane. Recent traps, use synthetic pheromone based to capture the insects. Moura *et al.* (1989) and Rochat *et al.* (1991a) showed that males produce an aggregation pheromone while feeding, attracting males and females equally. Rochat *et al.* (1991b) identified the pheromone as 2(E)-6-methyl-2-hepten-4-ol, naming it rhynchophorol.

SPW was added in 2005 to the EPPO A1 action list, and endangered EPPO member countries are thus requested to regulate it as a quarantine pest. *Rhynchophorus palmarum* presents a significant phytosanitary risk to date palms in Central America, North Africa, and to ornamental palms planted throughout the Mediterranean basin. At present, an integrated pest management (IPM) system for SPW in South America does not exist. New tools, including biological control and further ecological control methods are under development at Universidade Federal of Alagoas in Brazil and Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Potential strategies of early detection and control of red palm weevil in Brazil

The potential control tools for *R. ferrugineus* before its arrival in South America must lie on a preventive and protective approach (Porcelli and Cornara, 2013 and Porcelli *et al.*, 2012), given the previous failure experienced in purely mass-trapping based control. In the specific case of *R. ferrugineus*, the rapid detection and availability of an array of control tools would avoid great economic losses for the permanent crops of coconut and oil palm. To develop biological and ethological control strategies for the control of palm weevils (*Rhynchophorus palmarum* and *R. ferrugineus*) is necessary to evaluate native and exotic biological agents and semiochemicals, to determine control efficacy, initially in SPW like pest control, to determine the more effective biocontrol for the future containment of RPW in Brazil and South America (Dalbon *et al.*, 2018).

Exploitable foreground

Some examples of biological agents for evaluation, selection and use in IPM for *R. palmarum* and potentially *R. ferrugineus*, in case of invasion in South America, will be mentioned in this paper.

Microbial Agents: Pathogens like fungi (*Beauveria* spp., *Metarrhizium* spp.) and nematodes (*Steinernema* spp., *Heterorhabditis* spp.) have been applied to suppress pest populations of SAPW and RPW. A wide range of microorganisms suppress pests by producing toxins, causing disease, preventing establishment of other microorganisms or possibly by other mechanisms. Such microorganisms include bacteria, viruses, fungi and nematodes.

Entomopathogenic fungi, have been applied in Brazil since the 1990s. *Beauveria bassiana* strains have been isolated from dead weevils (Santana and Lima, 1992). Since then, EMBRAPA has conducted laboratory and field bioassays in order to develop the pathogenic *B. bassiana* strain CPATC 032 as an effective biological control of *R. palmarum*. The inoculation of adults in pheromone traps (capture – release) can be used to disseminate fungal conidia to other individuals due to the aggregation behavior. Additionally, fungal suspensions can be sprayed on plants (Ferreira and Lima, 1996). Inoculation of fungal conidia of CPATC 032 in combinations with pheromone traps have resulted in reduction of insect population level up to 72.2% (Ferreira and Lima, 1996).

Entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae) have been described as an additional biological agent for control of adults of SAPW. The main research had started in 2014 through cooperation between Embrapa Tabuleiros Costeiros and Federal University of Alagoas. Actually in Embrapa in alliance with Colombian Corporation of Agricultural Research Center (AGROSAVIA) created a complete entomopathogenic nematodes bank with species and native strains like *Heterorhabditis amazonensis* JPM4.; *Steinernema carpocapsae* Santa Rosa strain.; *Heterorhabditis* sp. P5.; *Steinernema feltiae*; *Steinernema brasiliense*; *Heterorhabditis amazonensis* RS03. *Heterorhabditis amazonensis* RS05., *Heterorhabditis bacteriophora*, *Heterorhabditis amazonensis* MSC01. (Acevedo *et al.*; 2018). For RPW, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* applied in field conditions with chitosan formulation, cause over 80% mortality. Laboratory tests in Brazil indicated that nematode-induced mortality was significantly greater than that produced by the following native nematodes: *S. carpocapsae* Santa Rosa strain, *H. amazonensis* strain JPM4, *S. brasiliense*, *Heterorhabditis* sp P5, with mortalities in larvae and adults between 80 to 100%. The preliminary results suggested that the use of selected EPN species in field experiments are needed to evaluate their potential under environmental conditions for the control of SAPW and EPN and could use in RPW trials as a potential biological control agent (Acevedo *et al.*, 2018).

Tachinid parasitoids

The natural occurrence of the tachinid parasitoids *Billaea rhynchophorae* and *Billaea menezesi* on larvae of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (L.) has been documented in plantations of piassava palm (*Attalea funifera* Mart.) and African oil palm (*Elaeis guineensis* Jacquin), in Ilheus southeastern Bahia, Brazil (Moura *et al.*, 1993, 2006). The average parasitism ranged from 40% up to 72%. The bioecology of these parasitoids is currently subject of research by a consortium led by AGROSAVIA with contributions of CEPLAC and EMBRAPA with the aim to introduce the parasitoids to Colombia. The potential of these parasitoids has been completely overlooked in attempts to control *R. ferrugineus* in the Mediterranean and the Gulf region.

An artificial method of massive production of this parasitoid is still unavailable. The development of a method of mass production for an inundative liberation would be an additional management practice for *R. palmarum* and *R. ferrugineus* IPM. Mass rearing of tachinid parasitoids on artificial diet has been developed for

other tachinid species (Dindo *et al.*, 2006; 2007) and an effort will be made to adapt this technology to *Billaea* spp.

Pest behavior-modifying chemicals

Semiochemicals are important tools for pest management, either for luring pests to traps, or for disrupting mate or host location. Pheromone-based trapping systems have been used as an efficient method in RPW IPM. Early detection and monitoring help to plan further actions, whereas mass trapping reduces population and infestation levels. Hallett *et al.* (1999) reported that males of RPW were found to produce the aggregation pheromone 4-methyl-5-nonanol (ferrugineol), which attracts both males and females. The use of pheromone-based trapping and an effective management of RPW have been widely demonstrated in the Middle East (Hallett *et al.*, 1999; Soroker *et al.*, 2005; Faleiro *et al.*, 2011). The best semiochemical-based trapping system for RPW in Mediterranean basin is composed of three main components: trap, ferrugineol (the aggregation pheromone) and natural compounds emitted by the host plant (kairomone). The synthetic kairomone (ethyl acetate/ethanol) was reported to improve the attractant level of ferrugineol. The synthetic blend was as effective as the natural kairomones as co-attractants (plant material + molasses) (Vacas *et al.*, 2017). Though *R. ferrugineus* and *R. palmarum* are closely related, they do not share the same host plant range. The analysis of volatiles from hosts and non-host plants (green leaves, male inflorescence, healthy meristem and decaying tissues) may allow the identification of new kairomones or repellents and masking odours.

The biological control by using entomopathogenic microorganisms is another important technique to be included in any IPM program. The fungi *Beauveria bassiana* and *Metharizium anisopliae* causing high *R. ferrugineus* mortality rates, ranging from 60 to 87%, have been described (Gindin *et al.*, 2006.; Dembilio *et al.*, 2010; Lo Verde *et al.*, 2015). Semiochemical-based control methods including mass trapping and attract and infect procedures using entomopathogenic fungi to control RPW have also been reported. Laboratory and field trials have shown that these strains have enormous potential for controlling this palm pest.

Perspectives for integrated pest management for all strategies of control against *R. palmarum* and *R. ferrugineus* in the field in Brazil

The major components of the IPM strategy for *R. ferrugineus* and *R. palmarum* are surveillance, trapping the weevil using pheromones lures, detecting infestation by examination of palms, implementing quarantine measures, training and education (Abraham *et al.*, 1998). In Saudi Arabia, Vidyasagar *et al.* (2000) successfully developed an IPM programme which, in addition to mass pheromone trapping, included a survey of all cultivated gardens and systematic checking of all palms for infestation. A more detailed review of control strategies and IPM for the weevil were also published (Ramachandran, 1998; Murphy and Brisco, 1999.; Faleiro *et al.*, 2011).

The entry of RPW in Brazil without a preventive strategy of monitoring, control and integrated management would be a critical threat for agriculture. In order to develop local early detection and control of RPW in Brazil, we have developed a semiochemical-based and biological control strategy. We set Ferrugineol-lured traps to try attraction tests targeting the South American Palm Weevil (SAPW) *R. palmarum* (Coleoptera Curculionidae) as a model pest. Moreover, kairomones from *C. nucifera* and *E. guineensis*, Ferrugineol in combination with biological control agents in further studies of chemical ecology will contribute to RPW control. Field tests will be conducted by a combination of semiochemical and biological agents to determine the level of control obtained with *R. palmarum*. Subsequently, tests with RPM outside Brazil will be carried out.

As a result, we expect to evaluate ferrugineol and other effective volatile compounds for monitoring *R. ferrugineus* after the occurrence of the pest (early detection) in Brazil and contribute with others strategies in IPM of this pest. We expect to join efforts with different institutions in Brazil, South America and International Research Centers and Universities to contribute towards improvement of RPW management.

الملخص

دالبون، ف. أ. ج. ب. م. أسيفيدو، أ. ج. سانتانا، ح. ف. غولارت، إي. لاترزا، أ. ريفيل، أ. نيغريسولي، ب. لور و ف. بورسيلي. 2019. الكشف المبكر والمكافحة الوقائية لسوسة النخيل الحمراء (*Rhynchophorus ferrugineus*) عائلة السوس، رتبة غمديات الأجنحة: أفة حَجْرِيَّة في البرازيل. مجلة وقاية النبات العربية، 37(2): 130-135.

وص سوسن يل الح يله ي *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier كآف ن في يل اطق يل دي لن ن أسلاو و اطق أو وبا يل توسطلنو وش اح رف لالا وأ لكا (كالك و لايولالا يل تعدة يلا لكنو 2009؛ كويساو وأ وباو 2011) و ع وجود اطق لغزو هذه يله عة اطق ج وو وسطاً لكا لك ان تصقلو أشفقا يل الح ذي يلاه لن يلا تصفاد لن كجوز يل دو الح يزل يلغلي ورن ركالن يلغزو تلك تشفكح اطيح جسفلا ج للز يلن يلب يزلنو وتس سد سفوسفنن يل الح يله ي ءالاج أفن ع لن ن يل ن يلاولى ع رذي تاو رن ي تلك يسففففت يتلجلن ودائن جاهزة ل صفففففد و كآفن يلفن دبح داو ل رلى يلبد سفففففلا فت ن ت دلدها للز يلن وبسبو ذلك طو في يلب يزلج يست يتلجلا تست د لى يل كآفن يلعولن ويستاديم كل لانا يلاتصاح للكشف يل بك لن سوسن يل الح يله ي و كآفت ا وتم ت ظلم ياتبا ي يستادم فل ايل ل وجل وح ض ن صائد أول اكنو لت ولو د في يله اح لتاللم يستاديم كل لانا يلاتصاح تلك في جدو سوسن يل الح يلا لکن *Rhynchoporus palmarum* كآف ن وذلجن وللاوة ج لى ذلك فإن لوي ح يل كآفن يلعولن كال ط لا ويل ل اتودي يل صففففن للشففف ي دد بات تاءنج يلن لاتبنا شفف يسفففت ايلعولن في يلب يزلج سففلج ج ت لذتجا و ءاللن تد اقل لوي ح يل كآفن يلعولن وكل لانا يلاتصففاح لتعدلد سففففتوي سففلط ت ا لى يسففوسفن *R. palmarum* و بسد ذلك سفنطبق يلاتبا ي لى سفوسفنن يل الح يله ي ا و عدود يلب يزلج و تودع بجن جد تولل نج و يلة تصففم تا لن يلفففد يلغزل للعهة ع لوي ح يل كآفن يلعولن بءلك ات أسفلوباج اجساج ادي ء سفوسفنن يل الح يله ي و تالل اج ساصف يجل ساللن هذه يل كآفن سفتات هذه يلد يسفن ل اصف جدلدة لتطول يست يتلجلا كآفن سندي ن لن طلق دا يلاب ي ويل جلا يلدولن

كلمات مفتاحية: يل صلنن يل اللور ذي بالفنو هجوم يله عة قو يل كآفن يل لك وبلنو يل كآفن يسفلوكنو أ لكا

References

- Abraham, V.A., M.A. Al Shuaibi, J.R. Faleiro, R.A. Abozuhairah and P.S.P.V. Vidyasagar. 1998. An integrated management approach for red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Oliv. - A key pest of date palm in the Middle East. Sultan Qaboos University Journal of Agricultural and Marine Sciences, 3:77–83 <https://doi.org/10.24200/jams.vol3iss1pp77-83>
- Abrapalma. 2017. <http://www.abrapalma.org/pt/a-palmano-brasil-e-no-mundo/>
- Bain, F. and C. Fedon. 1951. Investigations on red ring of coconut. Agronomia Tropical, 1: 103–130.
- Acevedo, J.P.M., A.S. Negrisoli Jr., B.L. Lhor, V.A.S. Junior, P.S. Santos, E.T. Da Silva and R.R. Ferreira Cuesta. 2018. Pathogenicity of entomopathogenic nematodes against immature stages of *Rhynchophorus palmarum* as potential tool for biological control of *Rhynchophorus ferrugineus* for Tropical America. In: International Meeting Innovative and Sustainable Approches for the Control of Red Pal Weevil. CIHEAM Bari, Italy, 23–25 October, 2018. P: 32
- Dalbon, V.A., A.E.G. Santana, J.P.M. Acevedo, A. Riffel, H.F. Goulart and F. Porcelli. 2018. Early detection and warning by ferrugineol combined with other volatile compounds for the biocontrol of *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae): a quarantine pest in Brazil. Book of ABSTRACTS in the International meeting - Innovative and sustainable approches to control the Red Palm Weevil (RPW). CIHEAM Bari, 23–25 October 2018. P: 43
- Dane. 2015. Boletín técnico Encuesta Nacional Agropecuaria -ENA–DANE-COLOMBIA. https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agrope/cuario/enda/ena/2015/boletin_ena_2015.pdf
- Dembilio, Ó., M.E. Quesada, S.C. Álvarez and J.A. Jacas. 2010. Potential of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* as a biological control agent against the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. Journal of Invertebrate Pathology, 104: 214–221 <https://doi.org/10.1016/j.jip.2010.04.006>
- Dindo, M.L., S. Grenier, L. Sighinolfi and P. Baronio. 2006. Biological and biochemical differences between in vitro and in vivo-reared *Exorista larvarum*. Entomologia Experimentalis et Applicata 120: 167–174. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2006.00438.x>

- Dindo, M.L., E. Marchetti and P. Baronio.** 2007. In vitro rearing of the parasitoid *Exorista larvarum* (Diptera: Tachinidae) from eggs laid out of host. *Journal of Economic Entomology* 100: 26–30. <https://doi.org/10.1093/jee/100.1.26>
- Esser, R. and J. Meredith.** 1987. Red ring nematode. *Nematology Circular of the Florida Department of Agriculture* no. 141, Gainesville (US).
- Faleiro, J.R., M.A. El-Saad and A.H. Al-Abbad.** 2011. Pheromone trap density to mass trap *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae: Rhynchophoridae/ Curculionidae) in date plantations of Saudi Arabia. *International Journal of Tropical Insect Science*, 31:75–77. <https://doi.org/10.1017/s1742758411000099>
- Ferreira, J.M.S. and M. Lima.** 1996. Transmissão de *Beauveria bassiana* na população de *Rhynchophorus palmarum* através do contato entre indivíduos contaminados e não contaminados. In: Simpósio De Controle Biológico, 5, 1996, Foz do Iguaçu, PR. Resumos... Foz do Iguaçu: SEB, 1996. p.188.
- Fiaboe, K.K.M. and A.L. Roda.** 2012. Predicting the potential worldwide distribution of the Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (coleoptera:curculionidae) using ecological niche modeling. *Florida Entomologist*, 95: 659–673. <https://doi.org/10.1653/024.095.0317>
- Gindin G.; S. Levski, I. Glazer and V. Soroker.** 2006. Evaluation of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. *Phytoparasitica*, 34:370-379. <https://doi.org/10.1007/bf02981024>
- Griffith, R.** 1968. The relationship between the red ring nematode and the palm weevil. *Journal of the Agricultural Society of Trinidad and Tobago*, 68: 342– 356.
- Griffith, R.** 1987. Red ring disease of coconut palm. *Plant Disease* 71: 193–196.
- Hagley, E.** 1963. The role of the palm weevil as a vector of red ring disease of coconuts. *Journal of Economic Entomology*, 56: 375–380.
- Hallett, R.H., A.C. Oehlschlager, and J.H. Borden.** 1999. Pheromone trapping protocols for the Asian palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *International Journal of Pest Management*, 45: 231–237. <https://doi.org/10.1080/096708799227842>
- Lo Verde, G., L.Torta, V. Mondello, C. G. Caldarella, S. Burrmano, V. Caleca.** 2015. Pathogenicity bioassays of isolates of *Beauveria bassiana* on *Rhynchophorus ferrugineus*. *Pest Management Science*, 71: 323–328. <https://doi.org/10.1002/ps.3852>
- Lohr, B.** 2015. *Rhynchophorus ferrugineus*, a very dangerous pest of palms worldwide. I Simpósio de Pragas Quarentenárias na Amazônia Brasileira. *Memorias. Embrapa Roraima*. p 21-23.
- Moura, J., E. Vilela, R. Sgrillo, M. Aguilar and M. Resende.** 1989. A behavioral olfactory study of *Rhynchophorus palmarum* in the field. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, 18: 267–274.
- Moura, J.I.L, D. Mauriau and J.H.C. Delabie.** 1993. Eficiência de *Paratheresia menezesi* Townsend (Díptera: Tachidae) no controle biológico natural de *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleóptera: Curculionidae). *Oléagineux* 48: 219-23
- Moura, J.I., R. Toma, R.B. Sgrillo and J.H.C. Delabie.** 2006. Eficiência do parasitismo natural por *Billaea rhynchophorae* (Blanchard) (Diptera: Tachinidae) para o controle de *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Neotropical Entomology*, 35: 273–274. <https://doi.org/10.1590/s1519-566x2006000200019>
- Murphy, S.T., B-R. Briscoe.** 1999. The red palm weevil as an alien invasive: biology and prospects for biological control as a component of IPM. *Biocontrol News and Information*, 20: 35–45
- Porcelli, F. and D. Cornara.** 2013. Mezzi e metodi di controllo integrato del Punteruolo Rosso delle Palme. *Atti Accademia Nazionale Italiana di Entomologia*, LXI: 233–238.
- Porcelli F., I. Al-Jboory and H.Y.A. Raheem.** 2012. Key Factors in red palm weevil biology (*Rhynchophorus ferrugineus*) (Curculionoidea). *Proceeding of XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on the Challenge for a Sustainable Production, Protection and Consumption of Mediterranean Fruits and Nuts*. A. D'Onghia, I. Batlle, T. Caruso, L. Corelli Grappadelli, O. Callesen and J. Bonany (eds). *ISHS Acta Horticulturae*, 940: 591–596. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2012.940.83>
- Ramachandran, C.P.** 1998. The red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*: a review and future strategies. *Indian Coconut Journal*, 29: 104-106.
- Rochat, D., A. Gonzalez, D. Marian, A. Villanueva and P. Sagatti.** 1991a. Evidence for male-produced aggregation pheromone in *Rhynchophorus palmarum*. *Journal of Chemical Ecology*, 17: 1221–1230 <https://doi.org/10.1007/bf01402945>
- Rochat, D., C. Malosse, M. Lettere, P.H. Ducrot, P. Zagatti, M. Renou and C. Descoins.** 1991b. Maleproduced aggregation pheromone of *Rhynchophorus palmarum*: collection, identification, electrophysiological

- activity, and laboratory bioassay. *Journal of Chemical Ecology*, 17: 2127–2141 <https://doi.org/10.1007/BF00987996>
- Rochat, D., O. Dembillo, J.A. Jaques, P. Suma, A. Pergola, R. Hamidi, D. Kontodimas and V. Soroker.** 2017. *Rhynchophorus ferrugineus*: Taxonomy, Distribution, Biology and Life Cycle. Pages 69-104. In: Handbook of Major Palm Pests, Chapter: 4, eds: Colazza, S. and Soroker, V. Wiley Blackwell, 2017
- Roda, A., M. Kairo, T. Damian, F. Franken, K. Heidweiller, C. Johanns and R. Mankin.** 2011. Red palm weevil, (*Rhynchophorus ferrugineus*), an invasive pest recently found in the Caribbean that threatens the region. OEPP/EPPO Bulletin, 41: 116121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2338.2011.02446.x>
- Rugman-Jones, P.F., C.D. Hoddle, M.S. Hoddle and R. Stouthamer.** 2013. The lesser of two weevils: Molecular genetics of pest palm weevil populations confirm *Rhynchophorus vulneratus* (Panzer 1798) as a valid species distinct from *R. ferrugineus* (Olivier 1790), and reveal the global extent of both. PLoS ONE 8: e78379. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078379>
- Sánchez, P. and H. Cerda.** 1993. The complex *Rhynchophorus palmarum*/*Bursaphelenchus cocophilus* in palms. Boletín de Entomología Venezolana, 8: 1–18.
- Santana, D.L.Q. and M.F. de Lima.** 1992. Patogenicidade do fungo *Beauveria bassiana* (Balz.) Vuill. a adultos de *Rhynchophorus palmarum* (L.). In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 3., Águas de Lindóia, SP. Anais... Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1992. p. 242
- Schuling, M. and J. van Dinther.** 1981. Red ring disease in the Paricatuba oil palm estate, Brazil. Zeitschrift für Angewandte Entomologie, 91: 154–169.
- Scrascia M., C. Pazzani, F. Valentini, M. Oliva, V. Russo, P. D’Addabbo and F. Porcelli.** 2016. Identification of pigmented *Serratia marcescens* symbiotically associated with *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae). MicrobiologyOpen, 5: 883–890. <https://doi.org/10.1002/mbo3.377>
- Soroker, V., D. Blumberg, A. Haberman, M. Hamburguer-Rishard, S. Reneh and S. Talebaev.** 2005. Current status of red palm weevil infestation in date palm plantations in Israel. Phytoparasitica, 33: 97–106. <https://doi.org/10.1007/bf02980931>
- Vacas, S., O. Melita, A. Michaelakis, P. Milonas, R. Minuz, P. Riolo and V. Soroker.** 2017. Lures for red palm weevil trapping systems: aggregation pheromone and synthetic kairomone. Pest Management Science, 73: 223-231. <https://doi.org/10.1002/ps.4289>
- Vidyasagar, P.S.P.V., M. Hagi, R.A. Abozuhairah, O.E. Al-Mohanna and A.A. Al-Saihati.** 2000. Impact of mass pheromone trapping on red palm weevil adult population and infestation level in date palm gardens of Saudi Arabia. Planter, 76: 347–355.

CAPÍTULO II: PERSPECTIVES FOR SYNERGIC BLENDS OF ATTRACTIVE SOURCES IN SOUTH AMERICAN PALM WEEVIL MASS TRAPPING: WAITING FOR THE RED PALM WEEVIL BRAZIL INVASION

Artigo de revisão publicado na revista **Insects** 2021, 12, 828.

<https://doi.org/10.3390/insects12090828>

Received: 15 July 2021

Accepted: 7 September 2021

Published: 14 September 2021

Review

Perspectives for Synergic Blends of Attractive Sources in South American Palm Weevil Mass Trapping: Waiting for the Red Palm Weevil Brazil Invasion

Viviane Araujo Dalbon ^{1,*}, Juan Pablo Molina Acevedo ², Karlos Antônio Lisboa Ribeiro Junior ¹, Thyago Fernando Lisboa Ribeiro ¹, Joao Manoel da Silva ³, Henrique Goulart Fonseca ¹, Antônio Euzébio Goulart Santana ¹ and Francesco Porcelli ^{4,5}

Citation: Dalbon, V.A.; Acevedo, J.P.M.; Junior, K.A.L.R.; Ribeiro, T.F.L.; da Silva, J.; Fonseca, H.G.; Santana, A.E.G.; Porcelli, F. Perspectives for Synergic Blends of Attractive Sources in South American Palm Weevil Mass Trapping: Waiting for the Red Palm Weevil Brazil Invasion. *Insects* **2021**, *12*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor(s):

Received: date
Accepted: date
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Natural Resources Research Laboratory, Center for Engineering and Agrarian Sciences at the Federal University of Alagoas, Renorbio (LPqRN, CECA, Renorbio-UFAL). Av. Lourival Melo Mota, S/N, Tabuleiro do Martins, Maceió-AL CEP 57072-900, Brazil; karloslisboa@gmail.com (K.A.L.R.J.); tfribeiro@gmail.com (T.F.L.R.); fonscagoulart@gmail.com (H.G.F.); aegs@ceca.ufal.br (A.E.G.S.)
 - ² Colombian Corporation for Agricultural Research Agrosavia C. I. Turipana – AGROSAVIA. Km. 13, Montería-Cereté, Córdoba, Colombia; juanpamolina@yahoo.com.br
 - ³ Microbiology Research Laboratory, Center for Engineering and Agrarian Sciences at the Federal University of Alagoas, Renorbio (LM, CECA, Renorbio-UFAL). Av. Lourival jm.agro@hotmail.com
 - ⁴ Dipartimento di Scienze del Suolo, della Pianta e degli Alimenti. University of Bari Aldo Moro, Via Amendola, 165/a - 70126 Bari – Italy; francesco.porcelli@uniba.it
 - ⁵ CIHEAM Mediterranean Agronomic Institute of Bari, Via Ceglie 9 - 70010 Valenzano (BA) – Italy
- * Correspondence: vida-molina@hotmail.com

Simple Summary: Palm weevils—both South American and red palm weevils—threaten economically relevant palms, affecting oil and fruit production with a corresponding social impact. The natural tendency of the red palm weevil to explore vast territories in combination with corridors of cultivated susceptible palm species drives pest expansion in new territories. Invasion still occurs westward, from Sundaland to Portugal and the West-African coast, including the Canary Archipelago. The red palm weevil menaces the South American oil palm plantations, opening a new double-pest scenario and consequential damages or a possible coexistence with reciprocal competitive exclusion phenomena opportunities. On the brink of the red palm weevil's entrance into South America, we present available options for multiple lure-use in contaminating stations for the sustainable and effective management of both pests.

Abstract: Coupling several natural and synthetic lures with aggregation pheromones from the palm weevils *Rhynchophorus palmarum* and *R. ferrugineus* reveals a synergy that results in an increase in pest captures. The combined attraction of pure pheromones, ethyl acetate, and decaying sweet and starchy plant tissue increases the net total of mass-trapped weevils. The 2018 entrance of the red palm weevil (RPW) into South America has threatened palm-product income in Brazil and other neighboring countries. The presence of the new A1 quarantine pest necessitates the review of all available options for a sustainable mass-trapping, monitoring, and control strategy to ultimately target both weevils with the same device. The effective lure-blend set for the mass-trapping system will attract weevils in baiting and contaminating stations for entomopathogenic fungi that the same weevils will spread.

Keywords: preventive and protective alien invasive and quarantine pest IPM; *Dynamis borassi*; *Cosmopolites sordidus*; banana weevil

1. Introduction

The South American palm weevil (SAPW), *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus 1764), and the red palm weevil (RPW), *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliver, 1790), are well-known, relevant pest species worldwide [1–12]. Today, SAPW and RPW are the key invasive pests [13,14] of cultivated palms (Arecales: Arecaceae) in the old and new world. The two insects are Curculionidae (Coleoptera), included in the genus *Rhynchophorus* in a ten-species natural assemblage [15]. Eight *Rhynchophorus* species are considered pests because they damage fruit bunches and sometimes even kill the host palm [16]. Specifically, *R. ferrugineus* is a major threat to coconut production in Brazil [2,17]. The RPW has arrived in the Caribbean islands Aruba and Curaçao, near South America [10], and Brazil reports this insect as an A1 quarantine pest [2].

The invasive pest *R. ferrugineus* is responsible for killing thousands of ornamental Canary date palms (*Phoenix canariensis* Chabaud), first detected in San Diego County in Southern California, USA, in 2011 and established around 2010 [16]. Considered a worldwide pest, the related species *R. vulneratus* was declared eradicated from California [18]. Therefore, it is necessary to adopt multiple complementary tactics, including cultural measures, biological control, and semiochemicals, for an integrated pest management program (IPM) of *R. palmarum* and *R. ferrugineus* [19,20].

This review aims to inform and contribute to a better knowledge of the bait sources used to capture *R. palmarum* and, therefore, to facilitate adequate management of the *R. ferrugineus* quarantine pest. Here, the focus is on the efficacy of attractive sources and further pest control strategies for *R. palmarum* and *R. ferrugineus* in Arecaceae.

2. The Genus *Rhynchophorus* spp.

The *Rhynchophorus* genus includes oligophagous insect pests, which reproduce on a diverse variety of palm species (Arecales: Arecaceae) [15] with a complete metamorphosis, including the egg, larva, pupa, and adult stages [21]. In adulthood, males release the aggregation pheromone to attract males and females to a new food source when they reach a suitable host plant [22–25]. Females dig an egg chamber at the base of the spine or on a wounded plant part, and a female can lay approximately 250 eggs in many different palms during her life. The *Rhynchophorus* life cycle ranges from 132 to 215 days [26–29].

Morphologically, within the genus *Rhynchophorus*, chromatic polymorphism exists among the specimens [15,30–32]. Such variations may relate to environmental conditions, food availability, and plant lifecycle. We need further studies to identify the genetic and phylogenetic variations among populations and to characterize differences among invading insect populations [33].

Species in the genus exhibit behaviors and characteristic activity periods. For example, *R. palmarum* is diurnal with a maximum flight distance of 1.6 km in 24 h, regardless of sex. The more significant bioactivity is between the hours 9–11 and 17–19 within that period, decreasing in rainy periods [34,35]. The flight capabilities of *R. palmarum* in 24 h flight mill trials recorded average distances of 41 km (M) and 53 km (F) in 24 h in predominantly daytime [7,8], using field-collected male and female weevils. For *R. ferrugineus*, catches were higher between the hours of 8:00 and 18:00 [4,34] with the capacity to make long-distance

flights reaching 7 km, corresponding to 3 to 5 days. However, for *Rhynchophorus* spp., biogeographic location conditions pest biology, as the species show extended biological plasticity, inflicting damage in different situations [36].

It is also characteristic of this genus that the larvae feed boring galleries into the Arecaceae stipes, destroying the palm apical meristem [4]. Given that *Rhynchophorus* has a palm borer lifestyle, the damage is based on larvae survivorship in the host palm trunk coupled with late damage and infestation diagnosis [17]. Thus, understanding the insect's behavior is important for the implementation of new control strategies, especially those derived from research on telemetry [37], semiochemical interference [38–41], new secondary metabolites and formulations [42–49], early infestation detection [50], novel biopesticides [51–54], and natural enemies [55,56].

2.1. South American Palm Weevil

The pest *R. palmarum*, known as palm weevil or palm's eye bit, oviposits in plants of the Arecaceae family. It is the primary pest in coconut (*Cocos nucifera* L.) and oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantations. The New World distribution of *R. palmarum* encompasses the American continent, from Argentina to California, and includes the Central American Antilles [57].

The SAPW is a well-known plague of coconut palm and oil palm in Brazil, and the weevil has been reported in all the Brazilian areas of commercial palm production, where it causes relevant damages [58]. All states of Brazil such as Acre (AC), Alagoas (AL), Amazonas (AM), Bahia (BA), Ceará (CE), Espírito Santo (ES), Goiás (GO), Maranhão (MA), Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG), Pará (PA), Paraíba (PB), Paraná (PR), Pernambuco (PE), Piauí (PI), Rio de Janeiro (RJ), Rio Grande do Norte (RN), Rondonia (RO), Roraima (RR), Sao Paulo (SP), Sergipe (SE), and Tocantins (TO) are particularly interested with the weevil outbreak and are the largest commercial coconut producers in ton (t) of Brazil (Figure 1).

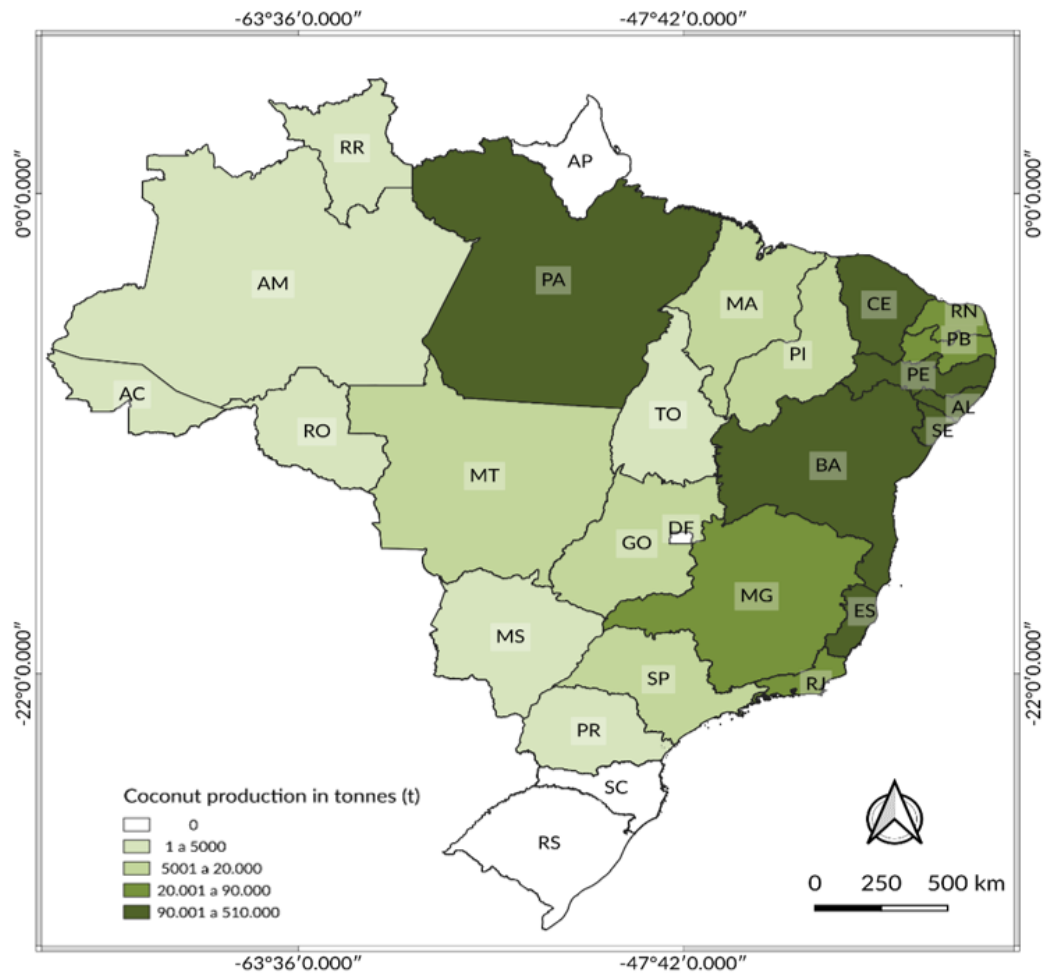


Figure 1. Coconut production map in Brazil; geodetic reference system (SIRGAS-2000).

Biology

The lifecycle of *R. palmarum* in palms completes in approximately 127 days, consisting of the expected holometabolic sequence of eggs, larvae, pupae, and adults (Table 1) [27,35].

Table 1. *Rhynchophorus palmarum* and *Rhynchophorus ferrugineus* quick card.

Phase	<i>Rhynchophorus palmarum</i>			<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>			Source
	Measure (mm)	Duration (days)	Colour	Measure (mm)	Duration (days)	Colour	
Eggs	25 × 10	2–5	White	9 × 29	3–5	white	[15,21]
Larve	75	45–70	Yellowish	36–46	40–60	yellowish	[15,21]
Pupae	80–100	25–45	Yellowish	50–95	20–25	yellowish	[15,21]
Adults	35–60	60–95	black and reddish atypical chromatic natural polymorphism	(♂): 19–42 (♀): 26–40	60–95	rust red, typical chromatic natural polymorphism	[9,15,31]
Total cycle	132 to 215 days			82 days			[15,21]

Eggs: Female *R. palmarum* deposits, approximately some millimeters inside soft plant tissue white and elongate ovoid eggs long about 2.5 mm and large 1 mm, lasting 2–5 days [21,59] before hatching.

Larvae: The larvae *R. palmarum* are eucephalous, “C”-shaped, and apodous. Grubs are 75 mm long, creamy-white, and yellowing at the end of their instars stage. The larvae stage is between 45 and 70 days [21]. *Rhynchophorus palmarum* populations take advantage of the larvae’s cryptic habits as their growth occurs in the galleries formed within the plant, protecting them from possible natural enemies. It is also the vector responsible for transmitting the nematode *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard (Parasitaphelenchidae), the causative agent of the red-ring-like disease in palms, with a unique record of increasing symptoms damage to palms only in America [60–63].

Pupae: The pupae *R. palmarum* are yellowish and remain housed within their 80–100 mm long pupal case that larvae set with coconut fibers, and the pupa stage has a variation of 25 to 45 days [21,27]. Adults: The black palm weevil measures between 35 mm and 60 mm, and the rostrum may serve to discriminate between male and female: the male snout is straight, stout, and shows series of stout seta set as in a brush on the front-clypeal head region, while the female rostrum is slender, devoid of seta, and slightly dorso-ventrally arched [15,21]. SAPW are active daytime in the morning and during the spring with warmer temperatures. Adults can fly up to 1.6 km per day [7,8], but it is not common to see them flying during the hottest hours of the day. Experience suggests that *R. palmarum* populations fluctuate in economic palm-intensive cultivation [64–66].

In adults, it has atypical chromatic natural polymorphism and colors with a different gradient of red in the cuticle in some *R. palmarum* individuals, captured with the aggregation pheromone in the Colombian Pacific region. The molecular analysis of each single SAPW mitochondrial region Cytochrome c oxidase subunit I (CO1 or MT-CO1) allowed the allocation of each DNA sequencing to a species, demonstrating the chromatic variation for the species *R. palmarum* [31]. The male’s adults produce an aggregation pheromone that attracts both males and females (*E*-6-methyl-2-hepten-4-ol) [25]. The semiochemical is the primary control tool for this pest, participating in several mass-trapping opportunities with fresh and fermenting food lures. Much of the researchers’ concern has focused on the pure trapping ability of the devices [67,68], but studies on the cost/efficacy of attractant combinations [69,70] and the use of traps in ornamental palm polycultures [71–75] exist. Technology today suggests the usage of digital tools also to study the efficacy of traps [76].

3. Red Palm Weevil

The RPW, *R. ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae), is considered the worst plague of date [4,77] and urban [78] Canary palm trees worldwide, causing considerable damage to palm trees. It originates from tropical Asia, and in less than 40 years since 1972, it had spread from Sundaland to North Africa and the Mediterranean [9]. In the Americas, it first entered California in 2009 [12]. However, this invasive population was first incorrectly identified as the red palm weevil, *R. ferrugineus*. Further taxonomic classification confirmed that another species, *Rhynchophorus vulneratus* (Panzer, 1798), was responsible for the infestation of date palms in Laguna Beach, California, United States

[22,79]. In 2008–2009, the RPW thrived on the islands of the American Caribbean, Curaçao, and Aruba [10].

Brazil considers *R. ferrugineus* an A1 quarantine pest for the country [80] with a considerable risk and potential threat for the Brazilian territory invasion. The risk for the commercial coconut and oil palm plantations increases due to the presence of the RPW in the Antilles (Aruba and Curaçao) [2,10] just at 64 km from the Venezuelan coast. Therefore, once the RPW invades these relevant crops, it could cause severe damage, significantly impacting Brazilian agriculture and native or commercial palm plantations in South America [17]. There are several review papers on the RPW, and the knowledge on the species is based on its impact on a more diversified array of environments and infested plants [22], eliciting the need for worldwide prediction modeling [5] and a rush for actual and future sustainable IPM control strategies also in just-invaded countries [14,16,81–84].

Biology

Rynchophorus ferrugineus completes its life cycle in palms in approximately 80 days; the pest may develop up to four broods per year, with up to 3 months of adult longevity. All the instars live associated with bacteria and other organisms [53,54,85–87]. The holometabolic life cycle consists of the expected sequence of egg, larvae, pupae, and adult [9,28] (Table 1). Wattanapongsiri [15] has also reported on *Rhynchophorus* spp. biology in much of the stabilized literature.

Eggs: Females of *R. ferrugineus* oviposit for 8–10 weeks, laying an average of 250 eggs and up to 760 eggs per female during the reproductive life. The eggs are creamy-white, elongate-ovoid, slightly arched, measuring about 0.98 per 2.96 mm, and left in soft palm tissue. The egg stage lasts from 3 to 5 days.

Larvae: The final *R. ferrugineus* larvae (AKA grubs) are 36–46 mm long, eucephalous, apodous and “C”-shaped, and creamy-white if still feeding but orange in post-feeding, with the larvae instars lasting from 40 to 60 days. Larvae mine tunnels that are up one meter and a half long into palm stipes. Late damage sighting requires a complex pest management strategy, with the pest being practically undetectable until the strikes to the host plant are about lethal.

Pupae: The pupae *R. ferrugineus* are orange-yellow and remain housed within their 50–96 mm long pupal case that larvae set with palm fibers. The pupal stage lasts from 20 to 25 days.

Adults: An RPW adult male measures between 19 and 42 mm in length, the female between 26 and 40 mm, and rostrum features may serve to discriminate between male and female: the male snout is straight, stout, and shows series of stout seta set as in a brush on the front-clypeal head region, while the female rostrum is slender, devoid of seta, and slightly dorso-ventrally arched [83]. It has a typical adult chromatic polymorphism shown in the field [9,15]. The RPW is a highly aggressive pest that has been invading new niches worldwide [6]. The weevil is well active in high-temperature conditions between 26 and 30 °C and undergoes dormancy below 18.5 °C [82]. *Rhynchophorus ferrugineus* and *R. vulneratus* aggregate to a blend of two composites in pheromones produced by males, characterized as a “4-ethyl-5-nonanol” alkali and a “4-methyl-5-nonanone” ketone [22], but some field experiments showed

an increment in the attraction for a stereoisomeric mixture (4*S*, 5*S*)-4-metilnonan-5-ol [24].

4. Damage to the Host Plant

Both *Rhynchophorus palmarum* and *R. ferrugineus* cause severe damage to the host plant. With any efficient control of these palm borers, they lead the plant to death and consequential damages. These insects feed on the sensitive tissue at the top of the palm, the larvae produce extensive galleries in the palm stipe, plants lose their ability to absorb nutrients, and the leaves turn yellow, hang, and fall [4,15,28].

In the American continent, the occurrence of *R. palmarum* causes considerable damage in sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) [29], banana (*Musa sapientum* L.) [59], papaya (*Carica papaya* L.), and pineapple (*Ananas comosus* L.) [57] when feeding on sweet plant parts.

In Brazil, SAPW causes damage to coconut plantations (*Cocos nucifera* L.) and oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) [1,35]. The Black Weevil transmits the *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) Baujard (Parasitaphelenchidae), the causal agent of the "Red Ring" or "Anillo Rojo," whose name originated from the characteristic red belt always present in the stipe of diseased palms [26,61]. Red Ring external symptoms are present in the leaves, which turn yellow from the tip of the leaflets to the base of the rachis and then turn brown. Vector insect management currently achieves the red ring disease control, but there is no efficient method for controlling the nematode once it enters the palm [62]. RPW has known symbiotic nematodes such as *Mononchoides macrospiculum* (Nematoda: Neodiplogastridae) and *Teraorhabditis synpapillata* Sudhaus, 1985 (Nematoda: Rhabditidae) with a possible role in biocontrol [86,87]. The palms *Phoenix canariensis* Hort. ex Chabaud and *Phoenix dactylifera* L. are strongly susceptible to RPW. Significant damages appear in *P. canariensis* as a green crown drop-down in the shape of an "open umbrella" or as leaf wilt in *P. dactylifera*. Injuries become eventually visible only long after the palm has become infested. Unlike the infestation of *R. palmarum* that causes the red ring by *B. cocophilus*, the meristematic tissues of *P. canariensis* and *P. dactylifera* suffer infections due to symbiotic bacteria [53,54] and fungi that the RPW females lay by contaminated eggs.

Infested *P. canariensis* and *P. dactylifera* tissues root to a melted, hot fermenting matter with an acute alcohol-acid smell due to infection by *Serratia* spp., other bacteria, and yeasts that belong to *Candida* and *Hyphopichia* [85]. Such a guild of microorganisms enforces the pests' fitness and creates a protective environment in infestation foci. In addition, in high-density infestations, the larvae burrowing and chewing the palm stipes produce audible sounds [88].

The control of the *R. palmarum* and *R. ferrugineus* has low efficiency in reducing damages, mainly due to the cryptic habit of its larvae inside the trunk [89]. Unexposed larvae can also eventually better survive the application of insecticides that badly impact humans and the environment. Cultural pest control consisting of timely uprooting and burning infested trees can reduce infestation but is often applied too late for use and has an environmental impact by greenhouse gas emissions [2,90].

5. *Rhynchophorus* spp. Pheromone and Other Attractive Sources

Behavioral control using aggregation pheromones enforced with food lures and ethyl acetate in mass trapping devices [3,43,70,74] propitiates the management, allowing a more confident use of insecticides.

5.1. Attractive Source for South American Palm Weevil

Attractive food sources associated with the aggregation pheromone improve the mass capture of *R. palmarum* by emulating the attraction for palm wound kairomones [70]. Moreover, the adults of *R. palmarum* use male-emitted semiochemicals as communication tools [25] to aggregate females and males at the “wound” spot. The aggregation pheromone alone is not as effective as needed in capturing adult *R. palmarum*, even if released at around 30 mg/day into the environment. Evidence suggests that the synergy among the plant kairomones, the pheromone, rotting plant parts such as sugar cane stalks, and ethyl acetate significantly captured more insects [70,73,91].

One study tested the attraction of *R. palmarum* to pieces of coconut palm, plantain, papaya, and pineapple. Banana was the most attractive lure peaking on the seventh day of fermentation [75]. The efficiency of modified traps associated with pheromone and bananas demonstrated one more opportunity for *R. palmarum* mass-trapping [73]. For the control of *R. palmarum*, the use of pieces of palm red-rings-infested stipe impregnated with insecticide also appears valuable despite the doubt raised by the possible nematode dispersion [26].

Attractiveness tests using the aggregation pheromone, 6-methyl-2 (E)-heptane-4-ol, associated with sugar cane stalks, pineapple fruit pieces, and six isolated volatile compounds of pineapple fruits, demonstrated that they do not show significant differences in the number of weevils captured [3]. A similar study [90] suggested that a combination of sugarcane with the aggregation pheromone increased the attraction of *R. palmarum* males and females toward traps, demonstrating the appearance of the synergy between these attractive sources. Adding ethyl acetate, sugar cane, and the aggregation of pheromone in traps exposed for three months had a significant effect on *R. palmarum* capture, demonstrating the synergy between the pheromone and other attractive substances. A similar synergism exists associating three days of pre-fermented baits for the attractiveness of *R. palmarum* [65,68]. The experiences are contradictory but suggest exploring the attractive potential of semiochemicals originating from fermenting plant material. The use of a new and inexpensive bait trap combination could offer significant benefits to producers and become a robust device to include in *R. palmarum* IPM [70,71]. Innovation in trap design and technology [69,76,92] may also play a role if novelties will well-embed management opportunities in local palm orchards.

5.2. Attractive Source for Red Palm Weevil

Rhynchophorus ferrugineus detection and management experience in different countries suggests that monitoring and ferrugineol-lured mass trapping are the most effective methods. The control method widely works in other countries of Asia and Europe [9,93]. Several studies, including the evaluation of stump traps, ethyl acetate as a lure synergist, kairomones, food baits, and yeast [94–96], exist to maximize the mass capture of *R. ferrugineus*. In addition, using black traps lured by

pheromones added with a few dates can significantly increase the *R. ferrugineus* absolute collection number, minimizing the RPW impact and damage [94].

Electroantennography can verify the response of *R. ferrugineus* to volatile compounds [97], demonstrating that the finger palm esters (ethyl acetate, ethyl propionate, ethyl butyrate, and propyl butyrate) elicit strong responses in EAG trials but poor performance on the field. However, the synthetic mixture of pheromone with plant material and molasses appears ineffective in attracting and collecting *R. ferrugineus* adults [96].

Figure 2 shows the scheme of the aggregation pheromone, 4-methyl-5-nonanol, and the synergy with ethyl acetate and parts of the palm tree. A blend of ferrugineol with plant kairomones or other palm tree volatiles effectively attracts adult RPW. A combination of synthetic lures, pheromone and ethyl acetate (released at 200–400 mg/day), and fermenting date palms parts in water increases the capture efficiency. The pheromone/food lure-based capture system is ecologically safer than insecticides for the current control of RPW infestations [98].

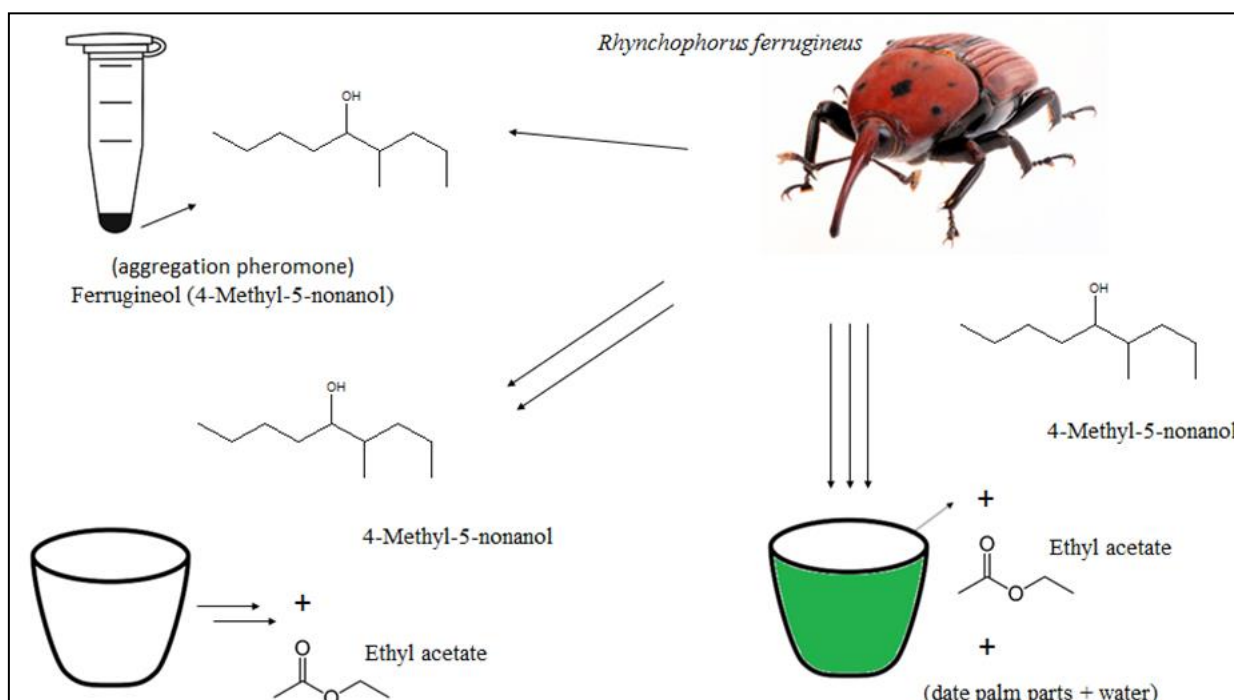


Figure 2. Pictorial scheme of the source used for *Rhynchophorus ferrugineus* luring.

Studies [99] have explored the opportunity to increase the mass trapping of *R. ferrugineus* by stump traps, lures, lure synergists such as ethyl acetate, kairomones, food baits, and yeast. The stump trap lured more weevils than the tree trap did. The three tested pheromone lures were similar in attraction, but with ethyl acetate, Ferrolure[®] TM lured more weevils than RHYFERTM[®] did. Amongst the tested kairomones, acetic acid and ethyl acetate alone and together emerged as strong synergists of the lure. The date fruits, date palm stem pieces, and sugarcane pieces all attracted more weevils, but date fruits attracted significantly more adults in the presence of ethyl acetate. Date fruits attracted more weevils with yeast than alone, but overall, date fruits, yeast, and ethyl acetate together recorded the highest trap catches.

Regarding using traps with the aggregation pheromone associated with attractive sources, the experiences disbelieve the importance of defining a standardized system that makes it possible to attract and efficiently collect mass for *R. ferrugineus* [92]. The evaluation of three types of traps with pheromones PO28 Ferrolure and different VOCs (ethyl acetate, sugar cane cubes, and fruit pieces) obtained the best capture by the provided traps of the fermenting chamber and a cover with funnel [100].

Traps lured with a pheromone (ferrugineol), allomone (sugar beet juice), kairomone (ethyl acetate), and ester (ethyl propionate), each lure working alone or in combination, showed more females than males attraction. The best combination was in traps lured with ferrugineol + sugar beet juice + ethyl acetate + ethyl propionate than other chemical materials [95]. Improvements of the pheromones formulation technology, i.e., the use of pheromone in nanogels associated with dry funnel traps [44], disclose new opportunities.

6. Alternative for *Rhynchophorus palmarum* and *Rhynchophorus ferrugineus* Control

Further opportunities for efficient control-building strategies versus Red and South America Palm weevils rise from the use of parasitoids [55,56], entomopathogenic fungi [46,101,102], bacteria [53,66], nematodes as regulatory agents [86,89,103], volatile organic compounds [42,48,51], and biotechnological methods [38,41].

Billaea rhynchophorae (Blanchard) and *Billaea menezesi* (Guimarães) (Diptera: Tachinidae) [55,56] are indigenous larval parasitoids of *R. palmarum* in Brazil. A better knowledge of both Tachinidae lifecycle and host acceptance will tell if they can serve in the inundative biological control of all *Rhynchophorus*, pest species. Parasitoidism can join other control methods to enforce the management efficacy and minimize the actual *R. palmarum* impact [2,3].

Likewise, a study [55] suggested the importance of *Billaea* spp. introduction and mass release—not available at the time—in coconut and oil palm production areas waiting for the potential invasion of *R. ferrugineus*. By that time, *Billaea* targeted five different genera of palm beetles, proposing natural biocontrol in the state of Bahia-Brazil. However, we need accurate studies to establish economic mass multiplication techniques and the proper inclusion of Diptera in palm weevil IPM.

Among the entomopathogenic fungi, the *Beauveria bassiana* and *Metharizium anisopliae* are relevant for biological pest control of palm borers [104,105]. The fungi can induce mycosis in various niches, leading to epizootics [46,106]. Most of these fungi assemble in a complex of about 90 genera and 700 species [107] of soil inhabitant species responsible for approximately 80% of insect diseases occurring without propagule ingestion [108,109].

The infective process starts when spores germinate on the insect's cuticle [49,109]. Chitinolytic enzyme secretion is the primary key to the virulence of the entomopathogenic fungi [107,108]. Fungi invade insects through the integument, provoking a systemic invasion in the hemocoel by releasing enzymes such as endoproteases, aminoproteases, lipases, esterases, and chitinases. The death of the insect follows about five days later [103,104,109].

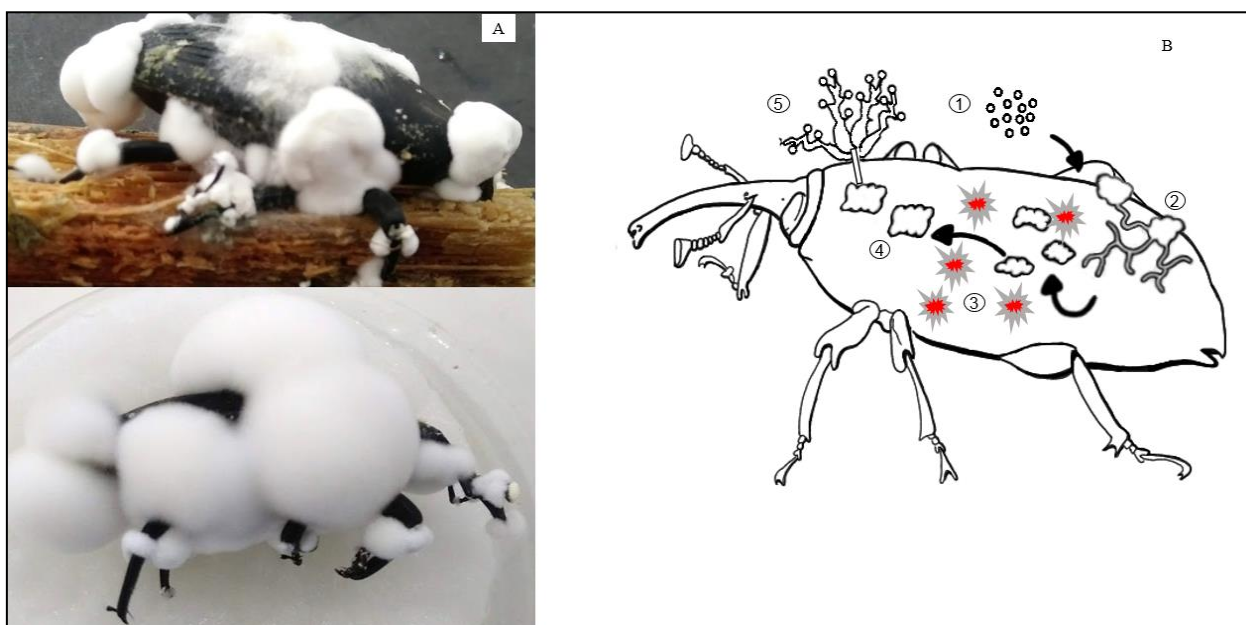


Figure 3. Schematic diagram of the infection process by *B. bassiana* after visiting a baiting and contaminating station. (A) Infection fungi process in the laboratory showing pathogenicity and mortality; (B) illustrative infection cycle depicted by *B. bassiana* in *R. palmarum*: (1) spore adhesion; (2) cuticle hydrolysis and breaking; (3) fungal cells change their cell structures in contact with hemolymph and secrete secondary metabolites; (4) switch to a yeast-like structure to colonize and kill the insect; and (5) sporulation.

Fungal infection (Figure 3) causes insect septicemia, a lethal disease, bacterial contamination, and rotting. The same microorganisms produce VOCs and other semiochemicals bearing information to the receiving organisms. VOCs are also media for interspecific communications ruling fungi–insect interactions [42,110]. Thus, VOCs secreted by fungi may represent a source of promising compounds for biocontrol and pest manipulation despite also having antifungal, insecticidal, attractive, or repellent properties [111]. Species of Coleoptera, Isoptera, Hemiptera, and Orthoptera, once they have detected specific VOCs produced by entomopathogenic fungi of the Hypocreales, change their behavior to avoid mycosis [112].

For the use in a control strategy, a study [47] referred to 22 organic compounds of *B. bassiana* capable of repelling *R. ferrugineus*. Evidence suggests using repellent as a “puller” associated with traps lured with aggregation pheromones for ornamental palms protection. For banana weevil (*Cosmopolites sordidus* Germar, 1824), management [48] suggests similar opportunities characterizing ninety-seven profiles of fungal VOCs from *B. bassiana* isolate Bb1TS11, *Metarhizium robertsii* isolate Mr4TS04, and *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) isolate Pc123. In the experiences, the compounds 3-cyclohepten-1-one and 1,3-dimethoxybenzene show repellence in banana weevil. The insect–fungal interactions can be a new allelochemicals-based interaction of particular benefit for developing innovative strategies for pest management [45]. Volatile organic compounds combined with aggregation pheromones interplay in a push–pull method to control *R. ferrugineus* [113,114].

Another technique of great importance is the use of botanical oils as a sanitary control method versus insect pests [52,115] given the effect of botanical oils of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae), *Borago officinalis* (L.) (Boraginaceae), *Laurus nobilis* L. (Lauraceae), and *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson (Rubiaceae) for the control of *R. ferrugineus*. The results showed that males of *R. ferrugineus* were more reactive to the four botanical oils than females were. Botanical oils remarkably reduce adult longevity, female fecundity, and eggs hatchability. The larvae showed different degrees of susceptibility to the four botanical oils.

The impacts of sesquiterpenes secondary plant metabolites, including farnesol, farnesyl acetate, Picrotoxin, β -caryophyllene, (+)-cedrol, nerolidol, (+)-nootkatone, and parthenolide, on *R. ferrugineus* are also puzzling [8]. Picrotoxin, farnesol, and farnesyl acetate are compounds most toxic to larvae of eight instar. Picrotoxin showed lethal effects and reduced food indexes, providing significant inductions of glutathione-S-transferase (GST) and cytochrome P450 gene expressions. These results may suggest using Picrotoxin as a promising biopesticide to control red weevil infestations, despite the difficulties of safely delivering such a venomous and reactive compound.

Molecular biology has provided some promises [39], eliciting interest in adopting biotechnological alternatives to pest control, mitigating the damage in different crop pests. The RNAi technique breaks the odor-binding protein, thus preventing the insects from tracking specific semiochemicals [38]. The interruption of the olfactory ability leads to reduced pheromones detection and suggests a promising alternative for *R. ferrugineus* [39,106,109]. The RNAi silencing of *R. ferrugineus* RferOBP1768 appears in EAG tests with a reduction in the weevil responses to the aggregation pheromone.

Among the technologies applied to detect insects that cause injuries to the tree trunks, there are devices capturing signals emitted by the larvae, identifying the infestation in the culture [24,37].

A protective and preventive IPM strategy [116] will considerably manage the pest population and damage, with every control method array that we intend to apply.

7. Future Challenges and Prospects

This review aimed to inform and will contribute to a better knowledge of palm weevil pest control. The focus here was on the efficacy of some attractive or repellent sources for weevil management, but we also considered secondary conventional or innovative control methods. The suggestion is to view all the *Rhynchophorus* and allied species as study model pests based on homogeneous bionomics. The advice also rises for the current alarm on *Dynamis borassi* in the New World [117,118].

The key tract of the palm weevil pestiferous attitude is the late evidence of the ongoing infestation. The tract unexpectedly assimilates palm weevil control to several other insect-borne plant pathogens such as *Xylella fastidiosa pauca* ST53 (Wells et al., 1987) [119], whose damages appear years after the first transmission. Unluckily, both the adversities will be managed better by preventive and protective strategies [116], with the critical factor in the timing of the control actions [120,121]. Volatile compounds experience suggests their use in proper combination [122] and with effective traps, preferably dry. Experiments have shown that male and female attraction depends not only on each component, volatiles

compounds, pheromones, or kairomones, but also on a significant synergism among components [42,43,90].

The advances developed in recent decades in America for the control of *R. palmarum* shows promising results in expanding the management experience to a preventive and protective strategy against *Rhynchophorus ferrugineus*.

Effective pest mass rearing techniques [123] will enforce a palm weevil IPM strategy by controlling actions. The combination of control methods based on semiochemicals, contaminating stations, Diptera parasitoid mass release, and further natural enemies' enrichment promises effective management options. The assemblage is advantageous with the VOCs repellent properties, eventually pulling the parasitoids versus the uncontaminated target pests only.

The basis is wide enough for research and technology transfer that will quickly turn to sustainability and environmentally safe control tools if the stakeholders learn the IPM rationale lesson [124].

In 2018, the Brazilian Ministry of Agriculture and Supply [80] already registered the *Rhynchophorus ferrugineus* as an A1 quarantine pest for Brazil, making the first relevant step to consider the opportunity for combined effective control of SAPW and RPW.

Since 2018, the Brazilian EMBRAPA Tabuleiros Costeiros, the Natural Resources (LPqRN) of the Federal University of Alagoas (UFAL, Brazil), and the Colombian Corporation for Agricultural Research (Agrosavia) have run the RPW control challenge in SAPW-invaded territories. The following steps will suggest control strategies tuning, enlightening, in New World palm weevils, the factors that triggered the RPW population [125] from endemism to outbreak.

Author Contributions: Conceptualization, A.E.G.S., F.P., H.G.F., J.M.d.S., J.P.M.A., K.A.L.R.J., T.F.L.R. and V.A.D.; investigation, A.E.G.S., H.G.F., J.M.d.S., J.P.M.A., K.A.L.R.J., T.F.L.R. and V.A.D.; data curation, H.G.F., J.M.d.S., J.P.M.A., K.A.L.R.J., T.F.L.R. and V.A.D.; writing—original draft preparation, A.E.G.S., H.G.F., J.M.d.S., J.P.M.A., K.A.L.R.J., T.F.L.R. and V.A.D.; writing—review and editing, F.P. and V.A.D.; visualization, A.E.G.S., H.G.F., J.M.d.S., J.P.M.A., K.A.L.R.J., T.F.L.R. and V.A.D.; supervision, F.P.; funding acquisition, F.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under Grant Agreements No. 635646 - POnTE "Pest Organisms Threatening Europe" and No. 727987 - XF-ACTORS "Xylella Fastidiosa Active Containment Through a multidisciplinary-Oriented Research Strategy". The EU Funding Agency is not responsible for any use that may be made of the information it contains. This research was also supported by CURE-Xf, an EU-funded project, coordinated by CIHEAM Bari (H2020-Marie Skłodowska-Curie Actions – Research and Innovation Staff Exchange. Reference number: 634353). The APC was funded by F.P.

Acknowledgments: The authors wish to thank: The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Foundation for Research Support of the State of Alagoas (FAPEAL), and the Northeast Biotechnology Network (RENORBIO). In memory for my PhD thesis co-advisor, the researcher of Embrapa Tabuleiros Costeiros, Alessandro Riffel, for helping me with friendship and knowledge.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Bondar, G. Insectos Nocivos e Moléstias do Coqueiro (Cocos nucifera L.) no Brasil; Tipografia Naval: Brazil, 1940; 156p.
2. Dalbon, V.; Acevedo, J.P.M.; Santana, A.E.G.; Goulart, H.F.; Laterza, I.; Riffel, A.; Negrisoni, A., Jr.; Lohr, B.; Porcelli, F. Early detection and preventive control of *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera Curculionidae): A quarantine pest in Brasil. *Arab J. Plant Prot.* **2019**, *37*, 130–135, doi:10.22268/AJPP-037.2.130135.
3. Dionisio, L.F.S.; Lima, A.C.S.; de Moraes, E.G.F.; Farias, P.R.S.; Correia, R.G.; Martins, W.B.R.; dos Santos, A.V.F. Spatial distribution of *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) in oil palm, Roraima state, Brazil. *Rev. Bras. Cienc. Agrar.* **2020**, *15*, e5683, doi:10.5039/agraria.v15i1a5683.
4. Faleiro, J.R. A review on the issues and management of red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Rhynchophoridae) in coconut and date palm during the last one hundred years. *Int. J. Trop. Insect Sci.* **2006**, *26*, 135–154, doi:10.1079/IJT2006113.
5. Fiaboe, K.K.M.; Peterson, A.T.; Kairo, M.T.K.; Roda, A.L. Predicting the potential worldwide distribution of the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) using ecological niche modeling. *Fla. Entomol.* **2012**, *95*, 659–673, doi:10.1653/024.095.0317.
6. Gonzalez, F.; Kharrat, S.; Rodríguez, C.; Calvo, C.; Oehlschlager, A.C. Red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier): Recent advances. *Arab J. Plant Prot.* **2019**, *37*, 178–187, doi:10.22268/AJPP-037.2.178187.
7. Hoddle, M.S.; Hoddle, C.D.; Milosavljević, I. How far can *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) fly? *J. Econ. Entomol.* **2020**, *113*, 1786–1795, doi:10.1093/jee/toaa115.
8. Hoddle, M.S.; Hoddle, C.D.; Milosavljević, I. Quantification of the life time flight capabilities of the south American palm weevil, *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Insects* **2021**, *12*, 126, doi:10.3390/insects12020126.
9. Rochat, D.; Dembillo, O.; Jaques, J.A.; Suma, P.; Pergola, A.; Hamidi, R.; Kontodimas, D.; Soroker, V. *Rhynchophorus ferrugineus*: Taxonomy, distribution, biology and life cycle. In *Handbook of Major Palm Pests*; Colazza, S., Soroker, V., Eds.; Wiley-Blackwell: Hoboken, NJ, USA, **2017**; pp. 69–104, doi:10.1002/9781119057468.ch4.
10. Roda, A.; Kairo, M.; Damian, T.; Franken, F.; Heidweiller, K.; Johanns, C.; Mankin, R. Red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*), an invasive pest recently found in the Caribbean that threatens the region. *EPPO Bull.* **2011**, *41*, 116–121, doi:10.1111/j.1365-2338.2011.02446.x.
11. Thomas, M.C. Giant Palm Weevils of the Genus *Rhynchophorus* (Coleoptera: Curculionidae) and Their Threat to Florida Palms. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry. DACS-P-01682: 1-2. 2010. Available online: https://www.fdacs.gov/content/download/66344/file/pest_alert_-_giant_palm_weevils_of_the_genus_rhynchophorus.pdf (accessed on 6 January 2020).
12. Bertone, C.; Michalak, P.S.; Roda, A. New Pest Response Guidelines. Red Palm Weevil. USDA-APHIS-PPQ-Emergency and Domestic Programs-Emergency Planning, Riverdale, Maryland. 2011. Available online: https://assets.ippc.int/static/media/uploads/resources/new_pest_response_guidelines_red_palm_weevil.pdf (accessed on 18 August 2021).
13. Esteban-Durán, J.; Yela, J.L.; Beitia-Crespo, F.; Jiménez-Álvarez, A. Curculiónidos exóticos susceptibles de ser introducidos en España y otros países de la Unión Europea a través de vegetales importados (Coleoptera: Curculionidae: Rhynchophorinae). *Boletín Sanid. Veg.* **1998**, *24*, 23–40. Available online: <http://hdl.handle.net/20.500.11939/7308> (accessed on 19 August 2021).
14. Murphy, S.T.; Briscoe, B.R. The red palm weevil as an alien invasive: Biology and the prospects for biological control as a component of IPM. *Biocontrol News Inf.* **1999**, *20*, 34n–46n.
15. Wattanapongsiri, A. A Revision of the Genera *Rhynchophorus* and *Dynamis* (Coleoptera: Curculionidae). PhD Thesis, Oregon State University, Corvallis, OR, USA, 1966; 431p. Available online: https://ir.library.oregonstate.edu/concern/graduate_thesis_or_dissertations/6d570047d (accessed on 19 August 2021).
16. NAPPO First U.S. Detection of Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*, in California. Letter to State Plant Regulatory Officials. 2010. Available online: <https://www.pestalerts.org/official-pest-report/first-u-s-detection-red-palm-weevil-rhynchophorus-ferrugineus-california> (accessed on 6 January 2020).
17. Dalbon, V.A.; Oliveira, E.R.L.; Silva, A.F.; Santana, A.E.G.; Acevedo, J.P.M.; Lisboa-Junior, K.A.; Goulart, H.F.; Oliveria, J.F.T.; Pitta, G.B.B. O uso de uma nova mistura de composição química, de fontes atrativas, para controlar o inseto-praga *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) em areáceas: Um estudo prospectivo. *Cad. Prospecção* **2019**, *12*, 825–834, doi:10.9771/cp.v12i4.27427.
18. Hoddle, M.S.; Hoddle, C.D.; Alzubaidy, M.; Kabashima, J.; Nisson, J.N.; Millar, J.; Dimson, M. The palm weevil *Rhynchophorus vulneratus* is eradicated from Laguna Beach. *Calif. Agric.* **2016**, *71*, 23–29, doi:10.3733/ca.2016a0012.
19. Liebhold, A.M.; Tobin, P.C. Population ecology of insect invasions and their management. *Ann. Rev. Entomol.* **2008**, 387–408, doi:10.1146/annurev.ento.52.110405.091401.

20. Tobin, P.C.; Kean, J.M.; Suckling, D.M.; McCullough, D.G.; Herms, D.A.; Stringer, L.D. Determinants of successful arthropod eradication programs. *Invas. Biol.* **2014**, *16*, 401–414.
21. Vásquez-Ordóñez, A.A.; Löhr, B.L.; Marvaldi, A.E. Comparative morphology of the larvae of the palm weevils *Dynamis borassi* (Fabricius) and *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus) (Curculionidae: Dryophthorinae): Two major pests of peach palms in the Neotropics. *Papéis Avulsos Zool.* **2020**, *60*, e202060-27, doi:10.11606/1807-0205/2020.60.special-issue.27.
22. Hallett, R.H.; Gries, G.; Gries, R.; Borden, J.H. Aggregation pheromones of two Asian palm weevils, *Rhynchophorus ferrugineus* and *R. vulneratus*. *Naturwissenschaften* **1993**, *80*, 328–331, doi:10.1007/BF01141908.
23. Oehlschlager, A.C.; Chinchilla, C.M.; González, L.M. Manejo del picudo de la palma (*Rhynchophorus palmarum*) y la enfermedad de anillo rojo, mediante un sistema de trapeo basado en la feromona de agregación. *ASD Oil Palm* **1992**, *5*, 24–30.
24. Perez, A.L.; Gries, G.; Gries, R.; Giblin-Davis, R.M.; Oehlschlager, C. Pheromone chirality of african palm weevil, *Rhynchophorus phoenicis* (F.) and palmetto weevil, *Rhynchophorus cruentatus* (F.) (Coleoptera: Curculionidae). *J. Chem. Ecol.* **1994**, *20*, 2653–2671, doi:10.1007/BF02036199.
25. Rochat, D.; Malosse, C.; Lettere, M.; Ducrot, P.-H.; Zagatti, P.; Renou, M.; Descoins, C. Male-produced aggregation pheromone of the American palm weevil, *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), collection, identification, electrophysiological activity and laboratory bioassay. *J. Chem. Ecol.* **1991**, *17*, 2127–2141, doi:10.1007/BF00987996.
26. Franco, E. *Estudo Sobre o Anel Vermelho do Coqueiro*; Publisher Ministry of Agriculture, Department of Defense and Agricultural Inspection, Plant Health Defense Service, Plant Health Defense Inspectorate in Sergipe, Brazil, **1964**, 236p.
27. Mexzón R.G.; Chinchilla, C.M.; Castrillo, G.; Salamanca, D. Biología y hábitos de *Rhynchophorus palmarum* L. asociado a la palma aceitera en Costa Rica. *ASD Oil Palm* **1994**, *8*, 14–21.
28. Prabhu, S.T.; Patil, R.S. Studies on the biological aspects of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliv.). *J. Agric. Sci.* **2009**, *22*, 732–733.
29. Restrepo, L.G.; Rivera, F.; Raigosa, J.D. Ciclo de vida, hábitos y morfometría de *Metamasius hemipterus* Olivier y *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). *Acta Agronómica* **1982**, *32*, 33–44.
30. Arun Kumar, S.; Payal, J.; Satyendra, P. Taxonomic redescription of the red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus*). *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2017**, *6*, 1054–1060.
31. Löhr, B.; Vásquez-Ordóñez, A.A.; Lopez- Lavallo, L.A.B. *Rhynchophorus palmarum* in disguise: Undescribed polymorphism in the “black” palm weevil. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0143210, doi:10.1371/journal.pone.0143210.
32. Sukirno, S.; Tufail, M.; Rasool, K.G.; Aldawood, A.S. Undescribed color polymorphism of the Asiatic palm weevil, *Rhynchophorus vulneratus* Panzer (Coleoptera: Curculionidae) in Indonesia: Biodiversity study based on COI gene. *Fla. Entomol.* **2018**, *101*, 642–648, doi:10.1653/024.101.0401.
33. EL-Mergawy, R.A.A.M. Genetic comparison among *Rhynchophorus ferrugineus* and four *Rhynchophorus* species. *J. Agric. Sci. Technol. B* **2011**, *1*, 610–615.
34. Faleiro, J.R.; Satarkar, V.R. Diurnal activity of red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) in coconut plantation. *Insect Environ.* **2003**, *9*, 63–64.
35. Hagley, E.A.C. On the life history and habits of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (L.). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1965**, *5*, 22–28, doi:10.1093/aesa/58.1.22.
36. Milosavljević, I.; El-Shafie, H.A.F.; Faleiro, J.R.; Hoddle, C.D.; Lewis, M.; Mark, S.; Hoddle, M.S. Palmageddon: The wasting of ornamental palms by invasive palm weevils, *Rhynchophorus* sp. *J. Pest Sci.* **2019**, *92*, 143–156, doi:10.1007/s10340-018-1044-3.
37. Al-Ansi, A.; Aldryhim, Y.; Al-Janobi, A. First use of radio telemetry to assess behavior of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Dryophthoridae) in the presence and absence of pheromone traps. *Comput. Electron. Agric.* **2020**, *170*, 105252, doi:10.1016/j.compag.2020.105252.
38. Antony, B.; Jibin, J.; Aldosari Saleh, A. Silencing the odorant binding protein RferOBP1768 reduces the strong preference of palm weevil for the major aggregation pheromone compound ferrugineol. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 1–17, doi:10.3389/fphys.2018.00252.
39. Gonzalez, F.; Johny, J.; Walker, W.B., III; Guan, Q.; Mfarrej, S.; Jakšić, J.; Montagné, N.; Jacquín-Joly, E.; Alquarni, A.A.; Al-Saleh, M.A.; et al. Antennal transcriptome sequencing and identification of candidate chemoreceptor proteins from an invasive pest, the American palm weevil, *Rhynchophorus palmarum*. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 8334, doi:10.1038/s41598-021-87348-y.
40. Soffan, A.; Antony, B.; Abdelazim, M.; Shukla, P.; Witjaksono, W.; Aldosari, S.A.; Aldawood, A.S. Silencing the olfactory co-receptor RferOrco reduces the response to pheromones in the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0162203, doi:10.1371/journal.pone.0162203.
41. Zhao, Y.Y.; Liu, F.; Yang, G.; You, M.S. PsOr1, a potential target for RNA interference-based pest management. *Insect Mol. Biol.* **2011**, *20*, 97–104, doi:10.1111/j.1365-2583.2010.01049.x.

42. Dalbon, V.A.; Lisboa-Ribeiro, T.F.; Molina-Acevedo, J.P.; Silva, J.M.; Anacleto-Andrade, A.B.; Granja, B.S.; Ribeiro-Junior, K.A.L.; Fonseca-Goulart, H.; Goulart-Santana, A.E. Respuesta comportamental y electrofisiológica de *Rhynchophorus palmarum* (L.; 1764) (Coleoptera: Curculionidae) a compuestos volátiles de hongos entomopatógenos nativos. *An. Biol.* **2021**, *43*, 65–77, doi:10.6018/analesbio.43.07.
43. Duarte, A.G.; De Lima, I.S.; Ferraz, D.M.A.; Santana, A.E.G. Captura de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) em armadilhas iscadas con o feromônio de agregação e compostos voláteis de frutos do abacaxi. *Rev. Bras. Frutic.* **2003**, *25*, 81–84, doi:10.1590/S0100-29452003000100024.
44. Abd El-Wahab, A.S.; Abd El-Fattah, A.Y.; El-Shafei, W.K.M.; El Helaly, A.A. Efficacy of aggregation nano gel pheromone traps on the catchability of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) in Egypt. *Braz. J. Biol.* **2020**, *81*, 452–460, doi:10.1590/1519-6984.231808.
45. Holighaus, G.; Rohlf, M. Fungal allelochemicals in insect pest management. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 5681–5689, doi:10.1007/s00253-016-7573-x.
46. Leon-Martinez, G.A.; Campos-Pinzon, J.C.; Arguelles-Cardenas, J.H. Patogenicidad y autodiseminación de cepas promisorias de hongos entomopatógenos sobre *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Dryophthoridae). *Agron. Mesoam.* **2019**, *30*, 631–646, doi:10.15517/am.v30i3.36184.
47. Lopez-Llorca, L.V.; Jalinas, J.; Marhuenda Egea, F.C. Compuestos Orgánicos Volátiles del Hongo Entomopatógeno *Beauveria bassiana* Como Repelentes de Insectos. España Patente de Invención P201631534, 9 February 2017.
48. Lozano-Soria, A.; Picciotti, U.; Lopez-Moya, F.; Lopez-Cepero, J.; Porcelli, F.; Lopez-Llorca, L.V. Volatile organic compounds from entomopathogenic and nematophagous fungi, repel banana black weevil (*Cosmopolites sordidus*). *Insects* **2020**, *11*, 509, doi:10.3390/insects11080509.
49. Xu, Y.-J.; Luo, F.; Gao, Q.; Shang, Y.; Wang, C. Metabolomics reveals insect metabolic responses associated with fungal infection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 4815–4821, doi:10.1007/s00216-015-8648-8.
50. Harith-Fadzilah, N.; Haris-Hussain, M.; Abd Ghani, I.; Zakaria, A.; Amit, S.; Zainal, Z.; Azmi, W.A.; Jalinas, J.; Hassan, M. Physical and physiological monitoring on red palm weevil-infested oil palms. *Insects* **2020**, *11*, 407, doi:10.3390/insects11070407.
51. Hussain, A.; Rizwan-ul-haq, M.; AlJabr, A.M.; Al-Ayedh, H. Lethality of sesquiterpenes reprogramming red palm weevil detoxification mechanism for natural novel biopesticide development. *Molecules* **2019**, *24*, 1648, doi:10.3390/molecules24091648.
52. Reyad, N.F.; Al-Ghamdi, H.A.; Abdel-Raheem, M.A.; Al-Shaeri, M.A. The effects of botanical oils on the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae). *Appl. Ecol. Environ. Res.* **2020**, 2909–2919, doi:10.15666/aeer/1802_29092919.
53. Scrascia, M.; Pazzani, C.; Valentini, F.; Oliva, M.; Russo, V.; D'Addabbo, P.; Porcelli, F. Identification of pigmented *Serratia marcescens* symbiotically associated with *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier (Coleoptera: Curculionidae). *Microbiol. Open* **2016**, *5*, 883–890, doi:10.1002/mbo3.377.
54. Scrascia, M.; D'Addabbo, P.; Roberto, R.; Porcelli, F.; Oliva, M.; Calia, C.; Dionisi, A.M.; Pazzani, C. Characterization of CRISPR-cas systems in *Serratia marcescens* isolated from *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae). *Microorganisms* **2019**, *7*, 368, doi:10.3390/microorganisms7090368.
55. Löhr, B.; Negrisoli, A.; Molina, J.P. *Billaea rhynchophorae*, a palm weevil parasitoid with global potential. *J. Arab Plant Prot.* **2019**, *37*, 101–108, doi:10.22268/AJPP-037.2.101108.
56. Moura, J.I.L.; Toma, R.; Sgrillo, R.B.; Delabie, J.H.C. Natural efficiency of parasitism by *Billaea rhynchophorae* (Blanchard) (Diptera: Tachinidae) for the Control of *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Neotrop. Entomol.* **2006**, *35*, 273–274.
57. CABI CPC Datasheet *Rhynchophorus palmarum*. Available online: <https://www.cabi.org/cpc/search/?q=Rhynchophorus+palmarum> (accessed on 21 February 2021).
58. IBGE—Brazilian Institute of Geography and Statistics. Agricultural Census, Permanent Coconut Crop Production. 2019. Available online: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457#resultado> (accessed on 26 February 2021).
59. Takada, H.M.; Batista Filho, A.; Hojo, H. Aspectos biológicos de *Rhynchophorus palmarum* Linnaeus, 1764 (Coleoptera: Curculionidae) em banana-prata (*Musa sapientum*). *Biológico* **2014**, *76*, 35–39.
60. Sánchez, P.A.; Cerda, H. El complejo *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae)—*Bursaphelenchus cocophilus* Cobb. (Tylenchida: Aphelenchoididae) en palmas. *Bol. Entom. Venez.* **1993**, *8*, 1–18.
61. Ferreira, J.M.S. Controle biológico do agente transmissor do nematoide causador do anel vermelho-do-coqueiro. *EMBRAPA Tech. Bull.* **2002**, *31*, 1–4.
62. Griffith, R. The relationship between the red ring nematode and the palm weevil. *J. Agric. Soc. Trinidad Tobago* **1968**, *68*, 342–356.
63. Moura, J.I.L.; Vilela, E.F. *Pragas do Coqueiro e Dendzeiro*, 2nd ed.; Aprenda Fácil: Viçosa, Brazil, **1998**; 126p.

64. Cysne, A.Q.; Cruz, B.A.; Cunha, R.N.V.; Rocha, R.N.C. Flutuação populacional de *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) em palmeiras oleíferas no Amazonas. *Acta Amaz.* **2013**, *197–202*, doi:10.1590/S0044-59672013000200010.
65. Landero-Torres, I.; Presa-Parra, E.; Galindo-Tovar, M.E.; Leyva-Ovalle, O.R.; Murguía-González, J.; Valenzuela-González, J.E.; García-Martínez, M.A. Variación temporal y espacial de la abundancia del picudo negro (*Rhynchophorus palmarum* L.; Coleoptera: Curculionidae) en cultivos de palmas ornamentales del centro de Veracruz, México. *Southwest Entomol.* **2015**, *40*, 179–188, doi:10.3958/059.040.0116.
66. Schlickmann-Tank, J.A.; Enciso-Maldonado, G.A.; Hauptenthal, D.I.; Luna-Alejandro, G.; Badillo-López, S.E. Detección y variación temporal de *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus) (Coleoptera: Dryophthoridae) en cultivos de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. en Itapúa, Paraguay. *Rev. Chil. Entomol.* **2020**, *46*, 163–169, doi:10.35249/rche.46.2.20.04.
67. Chang, M.L.C.; Delgado, H.V. Estudio de trampa com atrayentes: Feromona de agregacion y frutas vegetales para capturas de adultos de gualpas (*Rhynchophorus palmarum*) y picudos rallados (*Metamasius sericeus*) em cocotero. *Rev. Técnica* **2012**, *8*, 12–19, doi:10.33936/la_tecnica.v0i8.601.
68. Landero-Torres, I.; Galindo-Tovar, M.E.; Leyva-Ovalle, O.R.; Murguía-González, J.; Presa-Parra, E.; García-Martínez, M.A. Evaluación de cebos para el control de *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) en cultivos de palmas ornamentales. *Entomol. Mex.* **2015**, *2*, 112–118.
69. Milosavljević, I.; Hoddle, C.D.; Mafra-Neto, A.; Gómez-Marco, F.; Hoddle, M.S. Effects of food bait and trap type on captures of *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) and trap bycatch in Southern California. *J. Econ. Entomol.* **2020**, *113*, 2407–2417, doi:10.1093/jee/toaa175.
70. Moura, J.I.L.; Resende, M.L.V.; Sgrillo, R.; Nascimento, L.A.; Romano, R. Diferente tipos de armadilhas de iscas no controle de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae). *J. Agrotrópica* **1990**, *2*, 165–169.
71. Murguía-González, J.; Landero-Torres, I.; Leyva-Ovalle, O.R.; Galindo-Tovar, M.E.; Llerena-Hernández, R.C.; Presa-Parra, E.; García-Martínez, M.A. Efficacy and cost of trap-bait combinations for capturing *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) in ornamental palm polycultures. *Neotrop. Entomol.* **2018**, *47*, 302–310, doi:10.1007/s13744-017-0545-8.
72. Navarro, D.M.A.F.; Murta, M.M.; Duarte, A.G.; De Lima, I.S.; Nascimento, R.R.; Santana, A.E.G. Aspectos práticos relacionados ao uso do rincoforol, o feromônio de agregação da broca-do-olho-do-coqueiro *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) no controle de pragas do coqueiro. Análise de sua eficiencia em campo. *Quim. Nova* **2002**, *25*, 32–36, doi:10.1590/S0100-40422002000100007.
73. Ovando-Cruz, M.E.; Serrano-Altamirano, V.; Galvez-Marroquin, L.A.; Ariza-Flores, R.; Martinez-Bolanos, M.; Ovando-Barroso, E. Evaluacion de trampas para *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) en la costa de Oaxaca, Mexico. *Agroproductividad* **2019**, *12*, 3–8, doi:10.32854/agrop.vi0.1488.
74. Silva, A.B.; Müller, A.A.; Souza, L.A.; Ohashi, O.S.; Paulo, R.B. *Avaliação de Iscas e Armadilhas para Captura de Rhynchophorus palmarum em Dendzais*; Technical Bulletin number 200; Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) Eastern Amazon Agroforestry Research Center (CPATU): Belém, Brazil, 18p.
75. Vera, H.D.; Orellana, F.M. Combate de la gualpa (*Rhynchophorus palmarum* L.) en plantaciones de cocotero y palma africana mediante la captura con trampa del insecto adulto. *INIAP Estac. Exp. St. Domingo Dep. Entomol. Tech. Bull.* **1988**, *198*, 12.
76. Milosavljević, I.; Hoddle, C.D.; Mafra-Neto, A.; Gómez-Marco, F.; Hoddle, M.S. Use of digital video cameras to determine the efficacy of two trap types for capturing *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Econ. Entomol.* **2020**, *113*, 3028–3031, doi:10.1093/jee/toaa223.
77. Ali-Bob, M. Management of the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) using sustainable options in Saudi Arabia. *Arab J. Plant Prot.* **2019**, *37*, 163–169, doi:10.22268/AJPP-037.2.163169.
78. Sardaro, R.; Grittani, R.; Scrascia, M.; Pazzani, C.; Russo, V.; Garganese, F.; Porfido, C.; Diana, L.; Porc, F. Red palm weevil city Bari: A first damage assessment. *Forests* **2018**, *9*, 452, doi:10.3390/f9080452.
79. Rugman-Jones, P.F.; Hoddle, C.D.; Hoddle, M.S.; Stouthamer, R. The lesser of two Weevils: Molecular-genetics of Pest Palm Weevil populations confirm *Rhynchophorus vulneratus* (Panzer 1798) as a valid species distinct from *R. ferrugineus* (Olivier 1790), and reveal the global extent of both. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e78379, doi:10.1371/journal.pone.0078379.
80. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply of Brazil (MAPA). Pragas quarentenárias present and absent in Brazil. Normative Instruction nº39. *Off. J. União* **2018**, *190*, 11.
81. Zhao, M.; Rui-Ting, J. Effects of temperature on the development and fecundity of experimental population of *Rhynchophorus ferrugineus*. *Acta Phytopylacica Sin.* **2010**, *37*, 517–521, Available online: <https://www.cabi.org/ISC/abstract/20113039019> (accessed on 19 August 2021).
82. Giblin-Davis, R.M.; Faleiro, J.R.; Jacas, J.A.; Peña, J.E.; Vidyasagar, P.S.P.V. Biology and management of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. In *Potential Invasive Pests of Agricultural Crops*; Peña, J.E., Ed.; CABI International: Wallingford, UK, 2012; pp. 1–34.

83. Faleiro, J.R.; Ferry, M.; Yaseen, T.; Al-Dobai, S. Overview of the gaps, challenges and prospects of red palm weevil management. *Arab J. Plant Prot.* **2019**, *37*, 170–177, doi:10.22268/AJPP-037.2.170177.
84. Porcelli, F.; Scrascia, M.; Pazzani, C.; Pollastro, S.; Di Palma, A.; Russo, V.; Roberto, R.; Salerno, M.; Valentini, F.; Djelouah, K. The RPW as Vector of Bacteria, Fungi and Acari. 2017. Available online: http://www.fao.org/fileadmin/templates/fcc/documents/01_The_RPW_as_vector.pdf (accessed on 19 August 2021).
85. Troccoli, A.; Oreste, M.; Fanelli, E.; De Luca, F.; Tarasco, E. *Mononchoides macrospiculum* sp. (Nematoda: Neodiplogastridae) and *Teratorhabditis synpapillata* Sudhaus, 1985 (Nematoda: Rhabditidae): Nematode associates of *Rhynchophorus ferrugineus* (Oliver) (Coleoptera: Curculionidae) in Italy. *Nematology* **2015**, *17*, 953–966, doi:10.1163/15685411-00002916.
86. De Luca, F.; Fanelli, E.; Oreste, M.; Scarzia, G.; Troccoli, A.; Vovlas, A.; Tarasco, E. Molecular profiling of nematode associates with *Rhynchophorus ferrugineus* in southern Italy. *Ecol. Evol.* **2019**, *9*, 14286–14294, doi:10.1002/ece3.5865.
87. Potamitis, I.; Rigakis, I.; Tatlas, N.-A.; Potirakis, S. In-vivo vibroacoustic surveillance of trees in the context of the IoT. *Sensors* **2019**, *19*, 1366, doi:10.3390/s19061366.
88. Dembilio, O.; Llácer, E.; Martínez de Altube del Mar, M.; Jacas, J.A. Field efficacy of imidacloprid and *Steinernema carpocapsae* in a chitosan formulation against the red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) in *Phoenix canariensis*. *Pest Manag. Sci.* **2010**, *66*, 365–370, doi:10.1002/ps.1882.
89. Ferreira, J.M.S.; Araújo, R.P.C.; Sarro, F.B. Táticas de manejo das pragas. In *Coco, Fitossanidade*; Ferreira, J.M.S., Ed.; Technical Bulletin Brazilian Agricultural Research Corporation (EMBRAPA) Tabuleiros Costeiros: Aracaju, Brazil; **2002**, *83*, p.1.
90. Oliveira, C.A.; Alves, V.M.C.; Gomes, E.A.; Lanna, U.G.P.; Sá, N.M.H.; Marriel, I.E. Otimizacao da Metodologia de Extração e Amplificacao do DNA de Fungos do Solo. Technical Bulletin of Embrapa Corn and Sorghum. **2005**. Available online: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPMS/18425/1/Circ_69.pdf (accessed on 19 August 2021).
91. Navarro-Llopis, V.; Primo, J.; Vacas, S. Improvements in *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae) trapping systems. *J. Econ. Entomol.* **2018**, *111*, 1298–1305, doi:10.1093/jee/toy065, doi:10.1093/jee/toy065.
92. Abbass, M.K.; Nasser, S.A. Ecological studies and evaluation of some aggregation pheromone types with measuring the potential of female reproductive system in red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier). *Nat. Sci.* **2012**, *10*, 188–193. Available online: <http://www.sciencepub.net/nature> (accessed on 18 August 2021).
93. Abuagla, A.M.; Al-Deeb, M.A. Effect of bait quality and trap color on the trapping efficacy of the pheromone trap for the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. *J. Insect Sci.* **2012**, *12*, 1–6, doi:10.1673/031.012.12002.
94. Arafa, O.E. Field evaluation of synthetic pheromone, allomone, palm kairomone and ester in capturing adult red palm weevils, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) by aggregation pheromone traps in date palm plantations. *Plant Arch.* **2020**, *20*, 1857–1862.
95. Vacas, S.; Melita, O.; Michaelakis, A.; Milonas, P.; Minuz, R.; Riolo, P.; Abbass, M.K.; Io Bue, P.; Colazza, S.; Peri, E.; et al. Lures for red palm weevil trapping systems: Aggregation pheromone and synthetic kairomone. *Pest Manag. Sci.* **2017**, *23*, 223–231, doi:10.1002/ps.4289.
96. Vacas, S.; Abab-Payá, M.; Primo, J.; Navarro-Llopis, V. Identification of pheromone synergists for *Rhynchophorus ferrugineus* trapping systems from *Phoenix canariensis* palm volatiles. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 6053–6064, doi:10.1021/jf502663y.
97. El-Sayed, A.M.; Suckling, D.; Wearing, C.; Byers, J. Potential of mass trapping for long-term pest management and eradication of invasive species. *J. Econ. Entomol.* **2006**, *99*, 1550–1564, doi:10.1603/0022-0493-99.5.1550.
98. Abdel-Azim, M.M.; Aldosari, S.A.; Mumtaz, R.; Vidyasagar, P.S.P.V. Pheromone trapping system for *Rhynchophorus ferrugineus* in Saudi Arabia: Optimization of trap contents and placement. *Emir. J. Food Agric.* **2017**, *29*, 936–948, doi:10.9755/ejfa.2017.v29.i12.1564.
99. Abbas, M.K.A.; El-Deeb, M.A.; El-Zohairy, M.M.; Arafa, O.E. Impact of the aggregation pheromone traps baited with fermented food materials on the attraction of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) in Egypt. *Egypt. J. Agric. Res.* **2019**, *97*, 67–75, doi:10.21608/EJAR.2019.68564.
100. Ishak, I.; Ng, L.C.; Haris-Hussain, M.; Jalinis, J.; Idris, A.B.; Azlina, Z.; Samsudin, A.; Wahizatul, A.A. Pathogenicity of an indigenous strain of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) (MET-GRA4 Strain) as a potential biological control agent against the red palm weevil (Coleoptera: Dryophthoridae). *J. Econ. Entomol.* **2020**, *113*, 43–49, doi:10.1093/jee/toz233.
101. Lima, H.M.A.; de Rodrigues, V.M.; Sabino, A.R.; dos Santos, M.Q.C.; de Lima, I.S.; Duarte, A.G.; Negrisola, A.S., Jr.; da Silva, J.M. Effect of isolates of entomopathogenic fungi in the coconut eye borer. *Comun. Sci.* **2020**, *11*, e3300, doi:10.14295/CS.v11i0.3300.

102. Negrisoli, A.S., Jr.; Barbosa, C.R.C.; Moino JR, A. Avaliação da compatibilidade de produtos fitossanitários com nematoides entomopatogênicos (Rhabditida: Steinernematidae: Heterorhabditidae) utilizando o protocolo da IOBC/WPRS. *Nematol. Bras.* **2008**, *32*, 111–116.
103. Yasin, M.; Wakil, W.; Ghazanfar, M.U.; Qayyum, M.A.; Tahir, M.; Bedford, G.O. Virulence of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier). *Entomol. Res.* **2019**, *49*, 3–12, doi:10.1111/1748-5967.12260.
104. Lo Verde, G.; Torta, L.; Mondello, V.; Caldarella, C.G.; Burruano, S.; Caleca, V. Pathogenicity bioassays of isolates of *Beauveria bassiana* on *Rhynchophorus ferrugineus*. *Pest Manag. Sci.* **2014**, *71*, 323–328, doi:10.1002/ps.3852.
105. Sanjuan, T.; Tabima, J.; Restrepo, S.; Læssøe, T.; Spatafora, J.W.; Franco-Molano, A.E. Entomopathogens of Amazonian stick insects and locusts are members of the *Beauveria* species complex (*Cordyceps* sensu stricto). *Mycologia* **2014**, *106*, 260–275, doi:10.3852/13-020.
106. Alves, S.B. Quantificação de inóculo de patógenos de inseto. In *Controle Microbiano de Insetos*, 2nd ed.; Alves, S.B., Ed.; FEALQ: Piracicaba, Brazil, 1998; pp. 765–777.
107. Gallo, D.; Nakano, O. Silveira Neto, S.; Carvalho, R.P.L.; de Baptista, G.C.; Berti Filho, E.; Parra, J.R.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramim, J.D.; et al. *Entomologia Agrícola*; FEALQ: Piracicaba, Brazil, 2002; 920p.
108. Fernandes, E.K.K.; Angelo, I.C.; Rangel, D.E.N.; Bahiense, T.C.; Moraes, A.M.L.; Roberts, D.W.; Bittencourt, V.R.E.P. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. *Vet. Parasitol.* **2011**, *182*, 307–318, doi:10.1016/j.vetpar.2011.05.046.
109. Wang, C.; Wang, S. Insect pathogenic fungi: Genomics. Molecular interactions and genetic improvements. *Ann. Rev. Ent.* **2017**, *62*, 73–90, doi:10.1146/annurev-ento-031616-035509.
110. Kandasamy, D.; Gershenson, J.; Hammerbacher, A. Volatile organic compounds emitted by fungal associates of conifer bark beetles and their potential in bark beetle control. *J. Chem. Ecol.* **2016**, *42*, 952–969, doi:10.1007/s10886-016-0768-x.
111. Werner, S.; Polle, A.; Brinkmann, N. Belowground communication: Impacts of volatile organic compounds (VOCs) from soil fungi on other soil-inhabiting organisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 8651–8665, doi:10.1007/s00253-016-7792-1.
112. Ormond, E.L.; Thomas, A.P.M.; Pell, J.K.; Freeman, S.N.; Roy, H.E. Avoidance of a generalist entomopathogenic fungus by the ladybird, *Coccinella septempunctata*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2011**, *77*, 229–237, doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01100.x.
113. El-Shafie, H.A.F.; Faleiro, J.R. Optimizing components of pheromone-baited trap for the management of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) in date palm agro-ecosystem. *J. Plant Dis. Prot.* **2017**, *124*, 279–287, doi:10.1007/s41348-017-0097-5.
114. Faleiro, J.R.; Al-Shawaf, A.M.; El-Shafie, H.A.F.; Raikar, S.P. Studies on service free semiochemical mediated technologies to control red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus* Olivier based on trials in Saudi Arabia and India. *Arab J. Plant Prot.* **2019**, *37*, 136–142, doi:10.22268/AJPP-037.2.136142.
115. Pluess, T.; Jarošík, V.; Pyšek, P.; Cannon, R.; Pergl, J.; Breukers, A.; Bacher, S. Which factors affect the success or failure of eradication campaigns against alien species? *PLoS ONE* **2012**, *7*, 48157, doi:10.1371/journal.pone.0048157.
116. Porcelli, F.; Cornara, D. Mezzi e metodi di controllo integrato del Punteruolo Rosso delle Palme. *Atti Accad. Naz. Ital. Entomol.* **2013**, *LXI*, 233–238.
117. Bautista-Giraldo, M.A.; Armbrrecht, I.; Vásquez-Ordoñez, A.A. The weevil *Dynamis borassi* (Coleoptera: Curculionidae: Dryophthorinae) associated with native palms in forests and disturbed areas in Buenaventura, Colombia. *Rev. Colomb. Entomol.* **2020**, *46*, e7721, doi:10.25100/socolen.v46i2.7721.
118. Gaviria, J.; Montoya-Lerma, J.; Armbrrecht, I.; Löhr, B.; Vásquez-Ordóñez, A.A. *Dynamis borassi* (Coleoptera: Curculionidae), a new potential pest to the palms (Arecaceae): An early warning for the palm producers. *Fla. Entomol.* **2021**, *104*, 107–116, doi:10.1653/024.104.0206.
119. Picciotti, U.; Lahbib, N.; Sefa, V.; Porcelli, F.; Garganese, F. Aphrophoridae role in *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* ST53 invasion in southern Italy. *Pathogens* **2021**, *10*, 1035, doi:10.3390/pathogens10081035.
120. Fierro, A.; Liccardo, A.; Porcelli, F. A lattice model to manage the vector and the infection of the *Xylella fastidiosa* on olive trees. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8723, doi:10.1038/s41598-019-44997-4.
121. Liccardo, A.; Fierro, A.; Garganese, F.; Picciotti, U.; Porcelli, F. A biological control model to manage the vector and the infection of *Xylella fastidiosa* on olive trees. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0232363, doi:10.1371/journal.pone.0232363.
122. Abbas, M.S.T.; Hanounik, S.B.; Shahdad, A.S. Aggregation pheromone traps, a major component of IPM strategy for the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* in date palms (Coleoptera: Curculionidae). *J. Pest Sci.* **2006**, *79*, 69–73, doi:10.1007/s10340-005-0113-6.
123. Negrisoli, A.S., Jr.; Silva, E.S.; Barbosa Negrisoli, C.R.C.; Santos, N.L.; Guzzo, E.C. Criação em Laboratório da Broca-do-Olho-do-Coqueiro *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) Visando Pesquisas para

- o Controle das Suas Larvas. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros Comunicado Técnico, 116. 2011. Available online: http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2011/cot_116.pdf (accessed on 19 August 2021).
124. Kassem, H.S.; Alotaibi, B.A.; Ahmed, A.; Aldosri, F.O. Sustainable Management of the Red Palm Weevil: The Nexus between Farmers' Adoption of Integrated Pest Management and Their Knowledge of Symptoms. *Sustainability* **2020**, *12*, 9647, doi:10.3390/su12229647.
125. Leefmans, S. De Palmsnuitkever (*Rhynchophorus ferrugineus* Oliv.). *Meded. Van Het Inst. Voor Plantenziekten* **1920**, *43*, 1–87.

CAPITULO III: RESPUESTA COMPORTAMENTAL Y ELECTROFISIOLÓGICA DE *Rhynchophorus palmarum* (L., 1764) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) A COMPUESTOS VOLÁTILES DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS NATIVOS

Artigo publicado na revista científica Anales de Biología 43: 65-77, 2021

<http://dx.doi.org/10.6018/analesbio.43.07>

ISSN/eISSN 1138-3399/1989-2128

Recibido: 21 outubro 2020

Aceitado: 12 abril 2021

Publicado on-line: 6 mayo 2021

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

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

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

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

Resumen

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

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

Abstract

Behavioral and electrophysiological response of Rhynchophorus palmarum (L., 1764) (Coleoptera: Curculionidae) to volatile compounds of natives entomopathogenic fungi
Rhynchophorus palmarum is a major pest of palms (Arecaceae) in Brasil. Both the behavioral (olfactometry) and electrophysiological (electroantennography, both alone and coupled to chromatography) was studied against volatile organic compounds emitted by native entomopathogenic fungi isolated from Coruripe (Alagoas, Brazil). Fungal isolates were identified by aeration system for 24 hours. CVAD01 did not cause a significant behavioral response; however, males were significantly attracted to CVAD02 extracts. Electrophysiological bioassays showed antennal activity, in both sexes, to volatile components of the two identified native fungi. The chromatographic analysis of the extracts indicated profiles of volatile organic compounds with the presence of three alcohol, three aromatics, three ketones, and four hydrocarbons.

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

Introducción

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

antillas de Aruba y Curazao (Fiaboe *et al.* 2012), y es considerado como una plaga cuarentenaria A1 en Brasil (MAPA 2018).

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

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

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

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

Entre las estrategias de control de insectos, el uso de feromonas de agregación asociadas con compuestos orgánicos volátiles (COVs) de plantas hospedantes, combinados con medidas de control biológico como el empleo de parasitoides, depredadores y patógenos, pueden regular la población de plagas importantes en el campo. Los COVs generalmente comprenden moléculas de menos de 20 átomos de carbono, ya que son moléculas de bajo peso molecular, y se liberan fácilmente a la atmósfera o al suelo, propagándose rápidamente por el movimiento de la solución acuosa y el flujo de agua en el suelo (Wheatley *et al.* 2002, Dudareva *et al.* 2006). Son compuestos que pertenecen a diferentes clases químicas, como hidrocarburos simples, aldehídos, cetonas, alcoholes, fenoles y sus derivados, incluidos los derivados de benceno y ciclohexano (Campos *et al.* 2010, Morath *et al.* 2012), pueden ser letales para otros microorganismos patógenos (Strobel 2007, Bojke *et al.* 2018). Los hongos producen compuestos volátiles a través de sus vías metabólicas y aparecen como productos intermedios y finales del metabolismo primario y secundario (Muller *et al.* 2013).

Los hongos entomopatógenos, como *B. bassiana* y *M. anisopliae*, son ampliamente utilizados en estas estrategias de control. Son microorganismos que pueden inducir una

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

La selección del hábitat de oviposición tiene una gran influencia en la supervivencia de la descendencia y, por lo tanto, en el éxito de la reproducción (Doubtina *et al.* 1998). Otros hongos entomopatógenos han provocado similar actividad de repelencia. Rännback *et al.* (2015) observaron esta actitud en la avispa *Trybliographa rapae* (Westw.) (Hymenoptera: Figitidae), un parasitoide larval de la mosca de la raíz del repollo *Delia radicum* (L.) (Diptera: Anthomyiidae), ante hospedadores infectados por hongos. Las hembras de *T. rapae* pusieron más huevos en larvas sanas que en larvas infectadas con el hongo *Metarhizium brunneum* Petch sp. KVL 04-57.

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

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

Material y métodos

Captura de insectos y obtención de hongos entomopatógenos nativos

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

embudo plástico de 15 cm de diámetro. Las paredes laterales de la trampa tenían orificios de 2 mm de diámetro que permitían el drenaje del exceso de agua de lluvia. Se instalaron veinte trampas en las márgenes limítrofes de la zona de estudio, a una altura de 1 metro del suelo, con espacio de 100 metros entre cada trampa (Ferreira *et al.* 2002). Las trampas contenían cápsulas con la feromona rincoforol® (Interacta Ltda, Brazil) y se les agregaron también pedazos de caña de azúcar, de 10 cm de largo, cambiados cada semana para evitar fermentación. Las colectas se llevaron a cabo semanalmente durante el periodo de estudio, que fue desde 1 de agosto de 2018 a 31 de diciembre de 2019. Los adultos de picudos capturados se colocaron en contenedores de plástico y se transportaron al Laboratorio de Investigación en Recursos Naturales de la Universidad Federal de Alagoas. En total 100 insectos (50 hembras y 50 machos) de *R. palmarum* se mantuvieron individualizados en pots de plástico estériles de 14 cm diámetro y 9,4 cm de altura, con suministro de alimento a base de trozos de caña de azúcar, y se mantuvieron en incubación por aproximadamente 20 días, a una temperatura de 25 ± 2 °C para analizar el crecimiento de hongos. Los insectos parasitados con hongos entomopatógenos se separaron y se cultivaron en medio a base de Papa Dextrosa Agar (PDA). Igualmente, los insectos recolectados muertos y parasitados en el campo fueron analizados a lo largo de 10 días para ver si presentaban crecimiento micelial, en cuyo caso fueron esterilizados y aislados en medio PDA. Los hongos entomopatógenos fueron identificados por la técnica de microcultivo y separados en dos grupos descritos como CVAD01 y CVAD02, de acuerdo con el protocolo descrito por Alves *et al.* (1998) y las claves morfológicas de hongos de De Hoog (1972), Fernandes *et al.* (2011), Rehner *et al.* (2011) y Kepler *et al.* (2017). Después de la purificación, todos los aislamientos se mantuvieron en DBO y se incubaron a 25 ± 1 °C en un fotoperíodo de 12 horas para los bioensayos.

Figura 1: Localización geográfica del municipio de Coruripe (Alagoas, Brasil). Coordenadas del área de estudio: 10°08'30.5"S, 36°12'00.7"O



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

Los hongos entomopatógenos nativos, denominados tratamiento CVAD01 y CVAD02, utilizados para recolectar COVs, tuvieron quince días de crecimiento en medio PDA. La captura de los COVs se realizó utilizando el adsorbente Porapak Q (USA, Estados Unidos) con una malla 50/80 (Supelco Inc. Bellefonte, PA 16823 Estados Unidos). Las extracciones se realizaron de acuerdo con la metodología descrita por Toll *et al.* (2006), técnica adaptada para aireación de hongos entomopatógenos llamada "capilla biológica", registrada en la Institución Nacional de Propiedad Intelectual (INPI, Brazil, patente BR1020190125659). El aire filtrado con carbón activo se inyectó a través de un compresor con un flujo de entrada de 500 ml min⁻¹, mientras otra bomba aspiraba el aire a través de la trampa adsorbente a un caudal de 400 ml

min⁻¹. Todas las conexiones del sistema de aireación se realizaron con tubos flexibles de politetrafluoroetileno (PTFE), creando un sistema de presión positiva, como lo describen Moraes *et al.* (2008). Las extracciones se realizaron durante 24 horas, con tres repeticiones por tratamiento. También se realizó extracción de COVs a partir de cuatro testigos (el mismo medio de cultivo usado anteriormente, pero desprovisto de siembra de los hongos estudiados), para comprobar la eventual actividad sobre el insecto de emisiones volátiles procedentes del medio de cultivo. Al final de las aireaciones, la desorción de los compuestos se realizó utilizando 500 µl de hexano bidestilado de hexano bidestilado HPLC (SigmaAldrich, San Luis, Missouri, USA). Los extractos obtenidos se colocaron en viales (vidrio de borosilicato, 2 ml) y se almacenaron en un congelador a -20 °C.

Bioensayo comportamental

La respuesta comportamental de los adultos de *R. palmarum* a los compuestos volátiles presentes en los HEs nativos se evaluó en bioensayos utilizando un olfatómetro “Y”. Este modelo de olfatómetro bidireccional es similar al utilizado en otras pruebas olfativas para el orden Coleoptera (RuizMontiel *et al.* 2003, Lopez-Llorca *et al.* 2017). Cada brazo del tubo de vidrio posee 30 cm de longitud con 5 cm de diámetro, estando separados por un ángulo de 75°, operando con un flujo de aire continuo de 200 ml min⁻¹ previamente humidificado y filtrado con carbón activado (RuizMontiel *et al.* 2003).

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

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

La respuesta se registró por un tiempo de 10 minutos, considerándose finalizada cuando el insecto caminó contra el flujo de aire filtrado hasta el final del brazo del olfatómetro que contenía la fuente de olor testada o bien hacia el brazo que contenía el control. Ambos bioensayos de olfatometría “Y” se realizaron de las 8:00 a.m. a la 1:00 p.m. en una habitación mantenida a 28 ± 2 °C y $75 \pm 5\%$ de humedad relativa. Se emplearon 20 insectos distintos de cada sexo por tratamiento cada día.

Bioensayo electrofisiológico

Las respuestas de las antenas de *R. palmarum* a los extractos obtenidos en este trabajo fueron analizadas mediante electroantenografía (EAG) y mediante cromatografía acoplada a

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

Para analizar la respuesta CG-EAG se inyectó una alícuota de 4 µl de las muestras en un cromatógrafo de gases (Shimadzu, GC-2010, Kyoto, Japan) acoplado a detector de ionización de llama (FID) (Shimadzu QP-2010), operado en el modo "splitless" y provisto de una columna capilar RTX-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µl de hexano bidestilado). Las condiciones de análisis fueron las siguientes: temperatura del detector FID, 280 °C; rampa de temperaturas del CG comenzando a 40 °C durante 7 minutos, seguido de un gradiente de calentamiento de 4 °C min⁻¹ hasta alcanzar 150 °C, que se mantuvo durante 20 minutos. La duración total del programa fue de 41 minutos. Se utilizó nitrógeno como gas portador con un caudal de 1 l min⁻¹. Las respuestas de las antenas se registraron mediante un amplificador de alta impedancia (IDAC4, Syntech 2004, Hilversum, Países Bajos). Las salidas del amplificador EAG y el FID se monitorearon simultáneamente y se analizaron utilizando el software Data Aquisición System for Spike Analysis (AutoSpike 3.10, versión 2018). Se consideró que los compuestos que eluían del cromatógrafo eran activos si producían actividad electroantenográfica similar en varias señales CGEAG. Se realizaron al menos cinco repeticiones de cada muestra analizada.

Análisis por cromatografía

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

Los compuestos se identificaron comparando sus tiempos de retención (RT), y sus índices de retención lineal (LRI) se determinaron relativamente y se calcularon inyectando una solución estándar saturada de n-alcano (C₇-C₃₀) a 1000 µl de hexano bidestilado g ml⁻¹ en hexano de grado HPLC (Supelco, Bélgica), siguiendo la definición de Van Den Dool & Kratz (1963). Los espectros de masas se compararon por similitud con los de las bibliotecas del dispositivo

(Nist National Institute of Standards and Technology) y con los disponibles en referencias bibliográficas (El-Sayed 2019).

Análisis estadístico

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

Resultados

Bioensayo comportamental

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

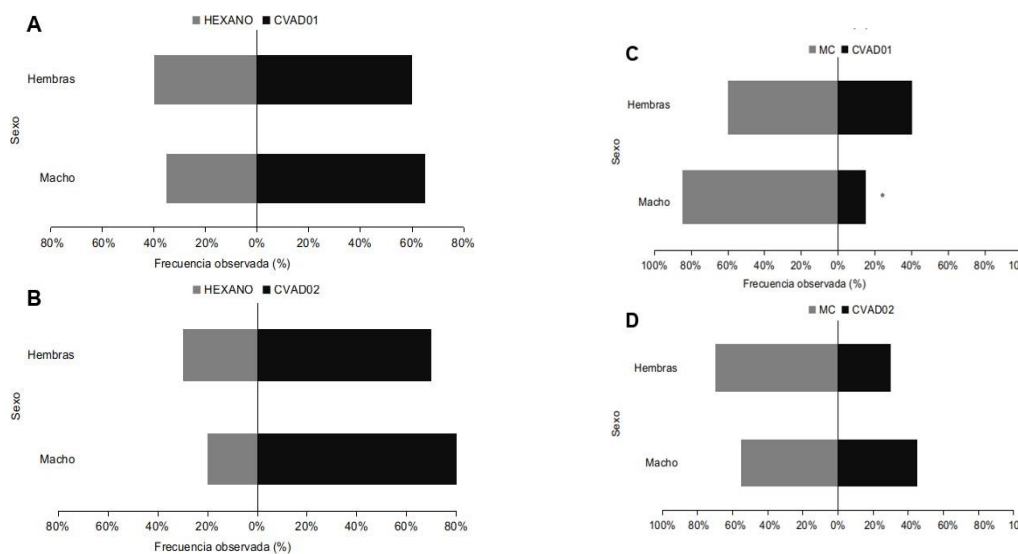
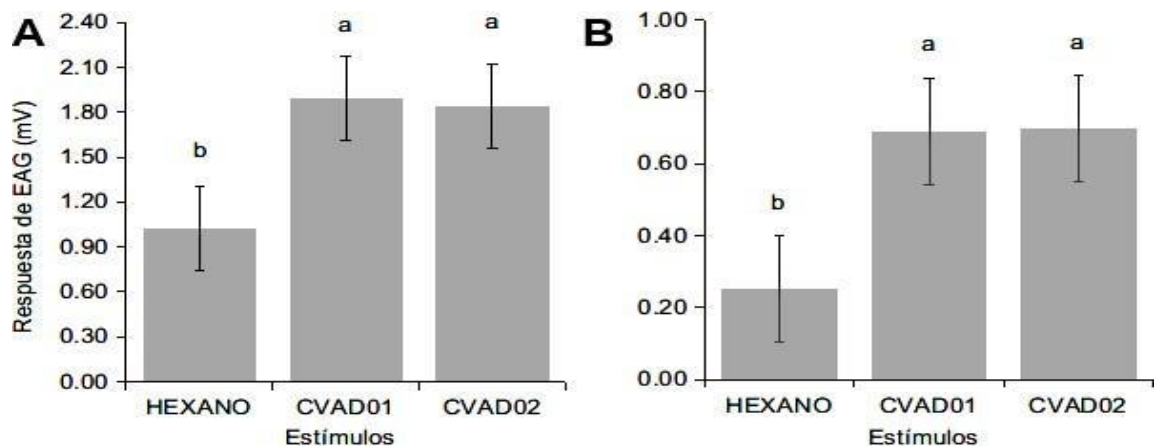


Figura 2: Respuesta porcentual de *R. palmarum* al extracto procedente del hongos entomopatógenos. A: CVAD01 (Hembras: $p=0,53$; $\chi^2=0,41$; Machos: $p=0,34$; $\chi^2=0,91$); B: CVAD02 (Hembras: $p=0,19$; $\chi^2=1,62$; Machos: $p=0,04$; $\chi^2=3,95$); C: CVAD01 en medio PDA, y frente al control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

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

Figura 3: Respuesta de EAG (medias \pm error estándar) de las antenas de *R. palmarum* frente a extractos de los hongos entomopatógenos y al hexano (control). A: Hembras, CVAD01



(1,89 \pm 0,79 mV), CVAD02 (1,83 \pm 0,84 mV) y control (1,02 \pm 0,49 mV) ($n=5$), prueba de de Tukey ($gl= 2$; $p< 0,01$; $CV\%= 12,99$; Datos transformados por \sqrt{x}). Letras distintas indican diferencias significativas. Para ambos sexos $n=5$

Bioensayo eletrofisiológico

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

La figura 4 muestran las señales de CG-EAG representativas, donde se resaltan los picos de EAG que se repitieron en el mismo tiempo de retención en las 5 señales de CG-EAG analizadas en cada, para extractos de los hongos estudiados. Los resultados sugirieron la existencia de respuesta antenal, para machos y hembras, frente a tres componentes del extracto de CVAD01

(tiempos de retención en minutos: 16,83; 24,48 y 35,33) y frente a cuatro componentes del extracto de CVAD02 (tiempos de retención en minutos: 16,83; 18,66; 24,48 y 35,33).

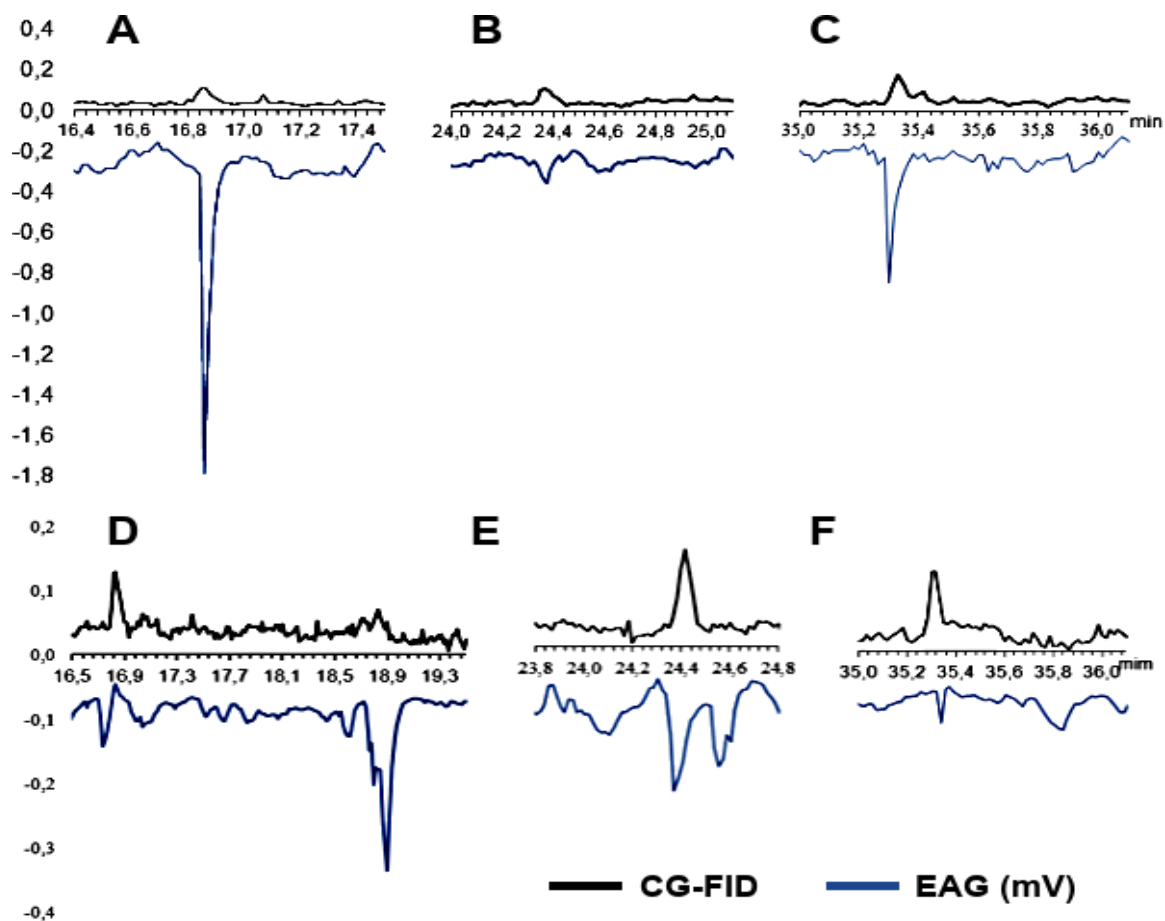


Figura 4: Respuesta electroantenográfica (GC-EAG) representativa para machos y hembras de *R. palmarum* expuestos a extractos de hongos entomopatógenos nativos (n=5). A-C: CVAD01, tiempos de retención (minutos) de los componentes antenalmente activos: 16,83 (A), 24,48 (B) y 35,33 (C); D-F: CVAD02, tiempos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

Análisis por cromatografía

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

Nº	TR _{MIN}	Componente	IRL _C	Tipo funcional	Fórmula Molecular
1	10,72	1,3 Dimetil benzeno	870	Hidrocarburo aromático	C ₈ H ₁₀
2	11,87	1,2 Dimetil benzeno	891	Hidrocarburo aromático	C ₈ H ₁₀
3	14,95	2-Octen-4-ol	953	Alcohol	C ₈ H ₁₆ O
4	15,65	2-metiloctan-3-ona	968	cetona	C ₉ H ₁₈ O

5	15,67	2,5-Octanediona	968	cetona	C ₈ H ₁₄ O ₂
6	16,62	3-Isopropil-5-metil-hexan-2-ona	988	cetona	C ₁₀ H ₂₀ O
7	16,78	Mirceno	991	Monoterpeno	C ₁₀ H ₁₆
8	18,42	Limoneno	1028	Monoterpeno	C ₁₀ H ₁₆
9	18,50	2-Etil-1-hexanol	1030	Alcohol	C ₈ H ₁₈ O
10	24,67	Naftaleno	1180	Hidrocarburo aromático	C ₁₀ H ₈
11	32,49	Tetradecano	1400	Hidrocarburo lineal	C ₁₄ H ₃₀
12	35,46	Pentadecano	1499	Hidrocarburo lineal	C ₁₅ H ₃₂
13	37,03	Hexadecano	1600	Hidrocarburo lineal	C ₁₆ H ₃₄

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

Discusión

En el presente trabajo, la técnica de aireación realizada en la "capilla biológica" ha mostrado eficiencia para la captura de COVs de hongos entomopatógenos. De acuerdo con Ormond *et al.* (2011), los insectos de los órdenes Coleoptera, Isoptera, Hemiptera y Orthoptera, al detectar los COVs de los hongos entomopatógenos del orden Hypocreales, cambian su comportamiento para evitar que los parasiten. Los resultados obtenidos en olfatómetro "Y" sugieren que los COVs liberados por cultivos PDA de CVAD01 podrían tener actividad repelente para machos de *R. palmarum*; el cultivo CVAD02 no pareció actuar en el mismo sentido, incluso hubo una selección significativa de los machos por el ramal del olfatómetro que contenía extractos hexánicos de este hongo. Res puestas de repelencia de *R. ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae) fueron observadas en pruebas de olfatometría donde se utilizaron hongos entomopatógenos en esporulación versus control (Lopez-Llorca *et al.* 2017). Meyling & Pell (2006) observaron el mismo comportamiento repelente causado por *B. bassiana*, pero esta vez sobre insectos parasitoides. Concluyeron que los machos y las hembras de *Anthocoris nemorum* (L., 1760) (Heteroptera: Anthocoridae) evitaban el contacto con las superficies de las hojas inoculadas con *B. bassiana*. Este tipo de comportamiento evidencia que los artrópodos, especialmente los parasitoides, que buscan alimentos y lugares para la oviposición, evalúan su entorno mediante signos químicos relacionados con el riesgo de depredación, ya sea para sí mismos (Grostal & Dicke 2000, Venzon *et al.* 2000) o sus descendientes (Nakashima & Senoo 2003, Eitam & Blaustein 2004). Lopes *et al.* (2014) analizaron la combinación del hongo *B. bassiana* y feromona en bioensayos de olfatometría en "Y", mediante una formulación granular en capsulas gelatinosas como estrategia de atracción y muerte contra el picudo del plátano *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824) (Coleoptera: Curculionidae). Concluyeron que el sistema atrayente capsular estudiado garantizó la integridad tanto del componente feromonal como de las esporas, sin causar repelencia de *B. bassiana* hacia *C. sordidus*. El desarrollo de una formulación atrayente considerada aceptable para el insecto diana, con una concentración adecuada del agente entomopatógeno, puede ser la clave para aumentar la eficiencia del agente de control y, además, minimizar un eventual efecto de repelencia no beneficioso en las poblaciones de enemigos naturales.

Triana *et al.* (2020) proponen realizar bioensayos electroantenográficos acoplado a cromatografía (CG-EAG) para analizar la respuesta antenal de los insectos frente a mezclas de aromas, ya que la antena del insecto responde de forma gradual y dinámica a las moléculas bioactivas presente en el extracto analizado. También Vickers *et al.* (2001) y Riffell *et al.* (2008), describen que la respuesta de la antena en relación con las plumas de olores se puede visualizar con la técnica de la electroantenografía (EAG), ya que la antena del insecto responde

gradual y dinámicamente a las moléculas bioactivas presentes en el extracto analizado. Basado en esas premisas, para este trabajo el bioensayo de CG-EAG mostró la existencia de varios componentes antenalmente activos para *R. palmarum* en los extractos hexánicos de los dos hongos entomopatógenos nativos testados; las propias pruebas de EAG revelaron respuestas de baja intensidad, pero significativas, comparadas con el control, frente a COVs de extractos hexánicos de los dos HEs nativos identificados estudiados. La eficiencia de la respuesta de los insectos está intrínsecamente correlacionada con las estructuras sensoriales en las antenas (denominadas sensilas). En *R. palmarum* las sensilas se distribuyen en una organización funcional de mosaico a lo largo de la estructura de la antena (Said *et al.* 2003). Los insectos utilizan los penachos de olores para la localización de sitios adecuados de alimentación u oviposición, para buscar huéspedes, aparearse y escapar de depredadores (Fleischer *et al.* 2017, Antony *et al.* 2018). Da Silva *et al.* (2019) describieron que las estructuras olfativas sensilares son importantes para la detección de moléculas de olores. Al entrar en los poros de la pared cuticular del sensila olfatoria, se transportan a la linfa sensilar a través de proteínas que se unen al olor (OBPs), receptores olfativos (ORs) hasta que llegan a las neuronas sensoriales olfativas que permitirá en el reconocimiento molecular e indujo una respuesta de comportamiento de insectos.

En relación con los análisis cromatográficos de los extractos CVAD01 y CVAD02, fue caracterizado un perfil común constituido por trece compuestos orgánicos volátiles, que podrían tener uso potencial para el manejo integrado de plagas de perforadores. En el mismo sentido, Lozano-Soria *et al.* (2020) caracterizaron noventa y siete compuestos orgánicos volátiles fúngicos de *B. bassiana* (Bb1TS11), *Metarhizium robertsii* J.F. Bisch., Rehner & Humber (Mr4TS04) y *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare & W. Gams (Pc123); los compuestos 3-ciclohepten-1-ona y 1,3-dimetoxibenceno presentaron repelencia para *C. sordidus*. Polezel (2017) identificó compuestos orgánicos volátiles en tres hongos filamentosos, con potencial para varias aplicaciones, ya sea en la industria farmacéutica, para la producción de antifúngicos, antimicrobianos, así como en el área agrícola, algunas de las cuales pueden usarse para controlar nematodos. Oliveira *et al.* (2017) también describieron la presencia de cuarenta y cuatro componentes volátiles producidos por *Albonectria rigidiuscula* (Berkeley & Broome) Rossmann & Samuels obtenidos por microextracción en fase sólida (SPME). La mayoría de los componentes identificados pertenecieron a las clases de sesquiterpenos, monoterpenos, otros hidrocarburos lineales, alcoholes aldehídos, cetonas, ésteres y compuestos aromáticos. Según Silva *et al.* (2019), entre las funciones ecológicas que desempeñan los microorganismos, se destaca la capacidad de inhibir el crecimiento de agentes fitopatógenos, ejerciendo la función de biocontroladores de enfermedades al actuar como antagonistas a través de diversos mecanismos, entre ellos la producción de compuestos orgánicos volátiles. La presencia de compuestos orgánicos volátiles en hongos entomopatógenos también ha sido descrita por Bojke *et al.* (2018). Al realizar un análisis por CG-EM, encontraron que los 63 los compuestos volátiles detectados se clasificaron en los siguientes grupos: aldehídos, cetonas, alcoholes, ésteres, ácidos, terpenos y otros. Los resultados muestran que los hongos entomopatógenos producen un perfil amplio de COVs y que estos median las interacciones entre organismos dentro y a través de diferentes nichos ecológicos (Hung *et al.* 2015). Según Holighaus & Rohlf (2016), el estudio de las interacciones entre insectos y hongos puede revelar nuevos aleloquímicos de particular beneficio para el desarrollo de estrategias innovadoras de manejo de plagas, aunque la forma con que la diversidad de COVs de hongos actúa sobre el comportamiento de los insectos es aún poco conocida.

Conclusión

La extracción de compuestos orgánicos volátiles de hongos entomopatógenos nativos mediante aireación por el sistema capilla biológica es una técnica sencilla de realizar, pero es necesario realizarla correctamente para que se obtenga el máximo rendimiento. Con las extracciones y análisis realizados se puede apreciar que es posible determinar una cantidad considerable de componentes presentes en los extractos de hongos entomopatógenos nativos. Los bioensayos por electroantenografía evidenciaron respuestas antenales para los extractos. Los análisis cromatográficos obtenidos de las muestras de los extractos CVAD01 y CVAD02 permitieron la caracterización de dos alcoholes, tres hidrocarburos aromáticos, dos monoterpenos, tres cetonas y tres hidrocarburos lineales. Los resultados aquí descritos proporcionan la caracterización de perfiles de compuestos orgánicos volátiles para dos hongos entomopatógenos nativos que parasitan *R. palmarum*, que podrían tener un uso potencial en el control de plagas de insectos perforadores. Se necesita continuar con estudios más específicos en relación con el comportamiento de atracción y/o repelencia de picudos de las palmeras, tanto para la elección de los sistemas óptimos de control de estos insectos como para evitar una potencial actividad repelente tanto en los propios insectos diana como en sus enemigos naturales.

Agradecimientos

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

Referencias

- Alves SB. 1998. Controle microbiano de insetos. Piracicaba, SP: FEALQ, pp. 1163.
- Antony BA, Johny J & Aldosari SA. 2018. Silencing the Odorant Binding Protein RferOBP1768 Reduces the Strong Preference of Palm Weevil for the Major Aggregation Pheromone Compound Ferrugineol. *Frontiers in Physiology* 9(252): 1-17. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00252>
- Arimura G, Ozawa R, Horiuchi JI, Nishioka T & Takabayashi J. 2001. Plant-plant interactions mediated by volatiles emitted from plants infested by spider mites. *Biochemical Systematics and Ecology* 29(10): 1049-1061. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(01\)00049-7](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(01)00049-7)
- Bojke A, Tkaczuk C, Stepnowski P & Gołębowski M. 2018. Comparison of volatile compounds released by entomopathogenic fungi. *Microbiological Research* 214: 129-136. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.06.011>
- Campos VP, Pinho RSC & Freire ES. 2010. Volatiles produced by interacting microorganisms potentially useful for the control of plant pathogens. *Ciência e Agrotecnologia* 34(3): 525-535. <https://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542010000300001>
- Cysne AQ, Cruz BA, Cunha RNV & Rocha RNC. 2013. Flutuação populacional de *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) em palmeiras oleíferas no Amazonas. *Acta Amazonica* 43(2): 197-202. <https://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672013000200010>
- Cobb NA. 1919. A new discovered nematode *Aphelenchus cocophilus* n. sp. Connected with a serious disease of the coconut palm. *West Indian Bulletin* 17 (4): 203-210.
- Da Silva KB, da Silva CB, Lisboa-Ribeiro-Júnior KA, de Freitas JMD, de Freitas JD, Sanchez-Chia G, . . . Goulart Santana AE. 2019. Morphology and distribution of antennal sensilla of *Automeris liberia* (Lepidoptera: Saturniidae). *Micron* 123: 102682. <https://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2019.102682>
- De Hoog GS. 1972. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium*, *Paecylomyces* and *Acrodontium* gen. nov. *Studies in Mycology* 1: 1-41.

- Duarte AG, Lima IS, Navarro DMF & Sant'ana, AEG. 2003. Captura de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: curculionidae) em armadilhas iscadas com o feromônio de agregação e compostos voláteis de frutos do abacaxi. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25 (1): 81-84. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452003000100024>
- Doumbia M & Hemptinne JL, D. 1998. Assessment of patch quality by ladybirds: Role of larval tracks. *Oecologia* 113: 197-202. <https://doi.org/10.1007/s004420050368>
- Dudareva N, Florence N, Dinesh NA & Orlova I. 2006. Plant Volatiles: Recent Advances and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25(5): 417-440. <https://doi.org/10.1080/07352680600899973>
- Eitam A & Blaustein L. 2004. Oviposition habitat selection by mosquitoes in response to predator (*Notonecta maculata*) density. *Physiological Entomology* 29: 188–191. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6962.2004.0372.x>
- El-Sayed AM. 2019. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. Disponível em <http://www.pherobase.com> (accedido el 19-VI-2020)
- Ferreira JMS, Araújo RPC & Sarro FB. 2002. Táticas de manejo das pragas. En: *Coco, fitossanidade*. (Ferreira JMS, ed.) Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, pp. 83.
- Ferreira DF. 2014. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciencia e Agrotecnologia* 38(2): 109-112. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542014000200001>
- Fernandes EKK, Angelo IC, Rangel DEN, Bahiense TC, Moraes AML, Roberts DW & Bittencourt VREP. 2011. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology* 182: 307318. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.046>
- Fiaboe KKM & Roda AL. 2012. Predicting the potential worldwide distribution of the Red Palm Weevil *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) using ecological niche modeling. *Florida Entomologist* 95: 659-673. <https://doi.org/10.1653/024.095.0317>
- Fleischer J, Pregitzer P, Breer H & Krieger J. 2018. Access to the odor world: olfactory receptors and their role for signal transduction in insects. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75: 485-508. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2627-5>
- Giblin-Davis RM, Gries R, Gries G, Peña-Rojas E, Pinzón I, Peña JE, . . . Oehlschlager AC. 1997. Aggregation Pheromone of Palm Weevil, *Dynamis borassi*. *Journal of Chemical Ecology* 23: 2287-2297. <https://doi.org/10.1023/B:JOEC.0000006674.64858.f2>
- Grostal P & Dicke M. 2000. Recognising one's enemies: a functional approach to risk assessment by prey. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 47: 258-264. <https://doi.org/10.1007/s002650050663>
- Guarino S, Colazza S, Peri E, Bue PL, Germanà MP, Kuznetsova T & Soroker V. 2015. Behaviour-modifying compounds for management of the red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus* Oliver). *Pest Management Science* 71(12):1605-1610. <https://doi.org/10.1002/ps.3966>
- Holighaus G & Rohlf M. 2016. Fungal allelochemicals in insect pest management. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(13): 5681-5689. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7573-x>
- Hung R, Lee S & Bennett J. 2015. Fungal volatile organic compounds and their role in ecosystems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 99(8): 33953405. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6494-4>
- Kandasamy D, Gershenzon J & Hammerbacher A. 2016. Volatile Organic Compounds Emitted by Fungal Associates of Conifer Bark Beetles and their Potential in Bark Beetle Control. *Journal of Chemical Ecology* 42(9): 952-969. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0768-x>
- Kepler RM, Luangsa-Ard JJ, Hywel-Jones NL, AlishaQuandt C, Sung GH, Rehner SA, . . . Shrestha B. 2017. A phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). *IMA Fungus* 8(2): 335-353. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2017.08.02.08>
- Landero-torres I, Galindo-Tovar ME, Leyva-Ovalle OR, Murguía-González J, Presa-Parra E & GarcíaMartínez MA. 2015. Evaluación de cebos para el control de *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera: Curculionidae) en cultivos de palmas ornamentales. *Entomologia Mexico* 2: 112–118
- Leon-Martinez GA, Campos-Pinzon JC & ArguellesCardenas JH. 2019. Patogenicidad y autodiseminación de cepas promisorias de hongos entomopatógenos sobre *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Dryophthoridae). *Agronomía Mesoamericana* 30(3): 631-646.
- Lopes RB, Laumann R, Dave-Moore MWMO & Faria M. 2014. Combination of the fungus *Beauveria bassiana* and pheromone in an attract-and-kill strategy against the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 151: 75-85. <https://doi.org/10.1111/eea.12171>
- Lopez-Llorca LV, Jalinas J & Marhuenda Egea FC. 2017. Compuestos orgánicos volátiles del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* como repelentes de insectos. España, Patente de Invención, P201631534, 9 February 2017.
- Lozano-Soria A, Picciotti U, Lopez-Moya F, LopezCepero J, Porcelli F & Lopez-Llorca LV. 2020. Volatile Organic Compounds from Entomopathogenic and Nematophagous Fungi, Repel Banana Black Weevil (*Cosmopolites sordidus*). *Insects* 11(8): 509. <https://doi.org/10.3390/insects11080509>
- MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). 2018. Pragas Quarentenárias Presentes e Ausentes no Brasil. Instrução Normativa nº 39, publicado no Diário Oficial da União, n. 190, p. 11.
- Meyling NV & Pell JK. 2006. Detection and avoidance of an entomopathogenic fungus by a generalist insect predator. *Ecological Entomology* 31(2): 162-171. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6946.2006.00781.x>
- Myles T. 2002. Alarm, aggregation, and defense by *Reticulitermes flavipes* in response to a naturally occurring isolate of *Metarhizium anisopliae*. *Sociobiology* 40: 243-255.
- Moraes MCB, Laumann RA, Paula DP, Pareja M, Silva CC, Viera HG, . . . Borges M. 2008. Eletroantenografia: a antena do inseto como um biossensor. *Boletim Técnico Embrapa* N. 270. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

- Morath S, Hung R, Bennett J. 2012. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews* 26: 73–83. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.001>
- Moura JIL, Resende MLV, Sgrillo R., Nascimento LA, Romano R. 1990. Diferente tipos de armadilhas de iscas no controle de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae). *Agrotropica* 2(3): 165-169.
- Müller A, Faubert P, Hagen, M, Castell W, Polle A, Schnitzler JP & Rosenkranz M. 2013. Volatile profiles of fungi—chemotyping of species and ecological functions. *Fungal Genetics and Biology* 54: 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.02.005>
- Murguía-González J, Landero-Torres I, Leyva-Ovalle OR, Galindo-Tovar ME, Llarena-Hernandez RC & Garcia-Martinez MA. 2018. Efficacy and Cost of Trap–Bait Combinations for Capturing *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) in Ornamental Palm Polycultures. *Neotropical Entomologic* 47: 302-310. <https://doi.org/10.1007/s13744-017-0545-8>
- Nakashima Y & Senoo N. 2003. Avoidance of ladybird trails by an aphid parasitoid *Aphidius ervi*: active period and effects of prior oviposition experience. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 109: 163-166. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2003.00094.x>
- Oliveira FC, Barbosa F, Mafezolia J, Oliveira CF, Goncalves FJT & Freireb FCO. 2017. Perfil dos componentes voláteis produzidos pelo fungo fitopatogénico *albonectria rigiduscula* em diferentes condições de cultivo. *Química Nova* 40(8): 890-894. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170064>
- Ormond EL, Thomas AP, Pell JK, Freeman SN & Roy HE. 2011. Avoidance of a generalist entomopathogenic fungus by the ladybird, *Coccinella septempunctata*. *FEMS Microbiol Ecology* 77(2): 229-237. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01100.x>
- Polezel DR. 2017. Fungos isolados de ninhos iniciais da formiga *Atta sexdens rubropilosa*: análise do potencial para biocontrole de formigas-cortadeiras. Rio Claro, San Pablo, Brasil: Universidad Estadual Paulista. Disertación de Maestria.
- Rännbäck LM, Cotes B, Anderson P, Rämert B & Meyling NV. 2015. Mortality risk from entomopathogenic fungi affects oviposition behavior in the parasitoid wasp *Trybliographa rapae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 124: 78-86. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.11.003>
- Rehner SA, Minnis AM, Sung GH, Luangsa-ard JJ, Devotto L & Humber RA. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia* 103(5): 1055-1073. <https://doi.org/10.3852/10-302>
- Rochat D, Dembilio O, Jacas J, Suma P, La Pergola A, Hamidi R, Kontodimas D & Soroker V. 2017. *Rhynchophorus ferrugineus*: Taxonomy, Distribution, Biology, and Life Cycle. En *Handbook of Major Palm Pests* (Soroker V & Colazza S, eds.), Hoboken (NJ): John Wiley & Sons Ltd, pp. 69-104. <https://doi.org/10.1002/9781119057468.ch4>
- Ruiz-Montiel C, González-Hernández H, Leyva J, Llanderal-Cazares C, Cruz-López L & Rojas JC. 2003. Evidence for a male-produced aggregation pheromone in *Scyphophorus acupunctatus* Gyllenhal (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology* 96(4): 1126-1131. <https://doi.org/10.1093/jee/96.4.1126>
- Riffell JA, Abrell L & Hildebrand JG. 2008. Physical processes and real-time chemical measurement of the insect olfactory environment. *Journal of Chemical Ecology* 34(7): 837-853. <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9490-7>
- Said I, Tauban D, Renou M, Mori K & Rochat D. 2003. Structure and function of the antennal sensilla of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum* (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of Insect Physiology* 49(9): 857–872. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(03\)00137-9](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(03)00137-9)
- Seiedy M, Heydari S, & Tork M. 2015. Orientation of *Hippodamia variegata* (Coleoptera: Coccinellidae) to healthy and *Beauveria bassiana*-infected *Aphis fabae* (Hemiptera: Aphididae) in an olfactometer system. *Turkish Journal of Zoology* 39: 53-58.
- Silva JM, Nascimento MS, Cristo CCN, Silva CE, Silva CS & Santos TMC. 2019. Capítulo 10. Antagonismo de *Thielaviopsis paradoxa* e *Fusarium oxysporum* por fungos rizosféricos associados à cactáceas do semiárido alagoano e eficiência de duas técnicas de avaliação. En *Impactos das Tecnologias nas Ciências Agrárias 3* (dos Santos CA & Ribeiro JC, eds.). Ponta Grossa, Brasil: Atena Editora, pp. 77-85. <http://doi.org/10.22533/at.ed.61419300910>
- Stenberg JA, Heil M, Åhman I & Björkman C. 2015. Optimizing Crops for Biocontrol of Pests and Disease. *Trends Plant Science* 20(11): 698-712. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.08.007>
- Strobel GA, Kluck K., Hess WM, Sears J, Ezra D & Vargas PN. 2007. *Muscodor albus* E-6, an endophyte of *Guazuma ulmifolia* making volatile antibiotics: isolation, characterization and experimental establishment in the host plant. *Microbiology* 153(8): 2613-2620. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/008912-0>
- Tafoya F, Whalon ME, Vandervoot C, Coombs AB & Cibrian-Tovar J. 2007. Aggregation pheromone of *Metamasius spinolae* (Coleoptera: Curculionidae): chemical analysis and field test. *Environmental Entomology* 36(1): 53-57. [https://doi.org/10.1603/0046225x\(2007\)36\[53:apomsc\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1603/0046225x(2007)36[53:apomsc]2.0.co;2)
- Triana MF, França PHB, Queiroz AFO, Santos JM, Goulart HF & Santana AEG. 2020. The giant sugarcane borer (*Telchin licus*). *Plos One* 15(4): e0231689 [17]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone0231689>
- Tholl D, Boland W, Hansel A, Loreto F, Rose UR & Schnitzler JP. 2006. Practical approaches to plant volatile analysis. *The Plant Journal* 45(4): 540–560. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2005.02612.x>
- Vacas S, Melita O, Michaelakis A, Milonas P, Minuz R, Riolo P, . . . Navarro-LLopis V. 2017. Lures for red palm weevil trapping systems: aggregation pheromone and synthetic kairomone. *Pest Management Science* 73(1): 223-231. <https://doi.org/10.1002/ps.4289>
- Van Den Dool H & Kratz PD. 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography* 11: 463-71. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)80947-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)80947-x)

- Venzon M, Janssen A, Pallini AE, Sabelis MW. 2000. A dieta de um predador de artrópodes polifágico afeta a busca de refúgio de suas presas tripes. *Comportamento Animal* 60: 369 – 375.
- Vickers NJ, Christensen TA, Baker TC & Hildebrand JG. 2001. Odour-plume dynamics influence the brain's olfactory code. *Nature* 410(6827): 466-470. <https://doi.org/10.1038/35068559>
- Wattanapongsiri A. 1966. A revision of the genera *Rhynchophorus* and *Dynamis* (Coleoptera: Curculionidae). Corvallis, Oregon, USA: Oregon State University. Tesis Doctoral. Disponible en https://ir.library.oregonstate.edu/concern/file_sets/5h73q005b (accedido el 19-VI-2020)
- Werner S, Polle A & Brinkmann N. 2016. Belowground communication: impacts of volatile organic compounds (VOCs) from soil fungi on other soil-inhabiting organisms. *Applied Microbiological Biotechnology* 100(20): 8651-8665. <https://doi.org/10.1007/s00253016-7792-1>
- Wheatley RE. 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81(1-4): 357364. <https://doi.org/10.1023/a:1020592802234>
- Xu YJ, Luo F, Gao Q, Shang Y & Wang C. 2015. Metabolomics reveals insect metabolic responses associated with fungal infection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407 (16): 4815-4821. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8648-8>

CAPÍTULO IV- IDENTIFICAÇÃO E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS NATIVOS DE *Beauveria bassiana*, em *Rhynchophorus palmarum* (LINNEAUS, 1758) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

CAPÍTULO IV- IDENTIFICAÇÃO E PATOGENICIDADE DE ISOLADOS NATIVOS BRASILEIROS DE *Beauveria bassiana* EM *Rhynchophorus palmarum* (LINNEAUS, 1758) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

RESUMO

A broca do coqueiro da América do Sul, *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus, 1764), pertence a família Curculionidae da Ordem Coleoptera, se alimentam e ovipositam em plantas da família Arecáceae. Este inseto é uma praga nas plantações de coco e dendzeiros. Este capítulo teve como objetivo identificar os isolados de fungos entomopatogênicos nativos (FENs) que parasitam *R. palmarum*; caracterizar a diversidade genética e analisar a patogenicidade destes isolados em adultos *R. palmarum* como potencial controle para a espécie invasora, o bicudo vermelho *R. ferrugineus*. Para a identificação morfológica dos FENs usou-se a técnica de microcultivo em meio BDA e para a molecular os isolados foram submetidos ao protocolo de extração de DNA, amplificação e sequenciamento, utilizando os marcadores *ITS-rDNA* (Internal Transcrito Spacer) e α -*TEF* (Translation Elongation Factor-1 α). Nos bioensaios de patogenicidade utilizaram-se os isolados nativos denominados CVAD01, CVAD02, CVAD06 em relação *Beauveria bassiana* CPATC/032 e *Beauveria bassiana* isolado comercial, na suspensão fúngica de $1,0 \times 10^9$ conídios/mL. Os esporos foram raspados das placas de Petri, com auxílio de um bisturi devidamente flambado e, em seguida, transferidos para tubos de ensaios. Foram realizadas diluições sucessivas para contagem em câmara de Neubauer e quantificação e os adultos de *R. palmarum* foram imersos em 20 mL de suspensão fúngica na concentração de 1,0 a 10^9 conídios/mL. As análises morfológicas e filogenética possibilitaram a identificação dos FENs pertencentes a espécie *Beauveria bassiana*. O uso do protocolo da extração permitiu obtenção de DNA dos fungos entomopatogênicos nativos de boa qualidade, integridade, pureza e adequado para amplificação, com 500 pares de base. Os testes de patogenicidade causaram alta mortalidade para *R. palmarum* em relação às testemunhas. O ciclo biológico completo no inseto *R. palmarum* para os isolados *Beauveria* CVAD01/CVAD06/CVAD02, *B. bassiana* CPATC/032 e *B. bassiana* comercial foram de 19, 20, 21, 23 e 25 dias, respectivamente. Os isolados CVAD01, CVAD02 e CVAD06 apresentaram alta patogenicidade entre os 7 e 21 dias com mortalidades entre 90 e 100%, o que os qualificam como um potencial controle biológico para desenvolver testes futuros em estufa e aplicação em campo, para o controle da do coqueiro da América do Sul e o potencial controle do bicudo vermelho na região costeira do Estado de Alagoas e no Brasil.

Palavras-chave: Coleoptera; Mortalidade; Sequenciamento; Diversidade genética; Fungos entomopatogênicos; *Rhynchophorus*.

IDENTIFICATION AND PATHOGENICITY OF NATIVE BRAZILIAN ISOLATES OF *Beauveria bassiana* ON *Rhynchophorus palmarum* (LINNEAUS, 1758) (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE)

ABSTRACT

The South American coconut borer, *Rhynchophorus palmarum* (Linnaeus, 1764), belongs to the family Curculionidae of the Order Coleoptera, feeds and lays eggs on plants of the family Arecaceae. This insect is a pest on coconut and oil palm plantations. This chapter aimed to identify the isolates of native entomopathogenic fungi (FENs) that parasitize *R. palmarum*; characterize the genetic diversity and analyze the pathogenicity of these isolates in adults *R. palmarum* as a potential control for the invasive species, the red boll weevil *R. ferrugineus*. For the morphological identification of FENs, the microculture technique in PDA medium was used, and for the molecular technique, the isolates were submitted to the DNA extraction, amplification and sequencing protocol, using the *ITS*-rDNA (Internal Transcript Spacer) and α -*TEF* markers (Translation Elongation Factor-1 α). In the pathogenicity bioassays, native isolates named CVAD01, CVAD02, CVAD06 were used in relation to *Beauveria bassiana* CPATC/032 and *Beauveria bassiana* commercial isolate, in a fungal suspension of 1.0×10^9 conidia/mL. The spores were scraped from the Petri dishes with the aid of a scalpel duly flamed and then transferred to test tubes. Successive dilutions were made for counting in a Neubauer chamber and quantification, and the adults of *R. palmarum* were immersed in 20 mL of fungal suspension at a concentration of 1.0 to 10^9 conidia/mL. The morphological and phylogenetic analyzes allowed the identification of FENs belonging to the species *Beauveria bassiana*. The use of the extraction protocol allowed obtaining DNA from native entomopathogenic fungi of good quality, integrity, purity and suitable for amplification, with 500 base pairs. Pathogenicity tests caused high mortality for *R. palmarum* compared to controls. The complete biological cycle in the insect *R. palmarum* for the isolates *Beauveria* CVAD01/CVAD06/CVAD02, *B. bassiana* CPATC/032 and commercial *B. bassiana* were 19, 20, 21, 23 and 25 days, respectively. The isolates CVAD01, CVAD02 and CVADO6 showed high pathogenicity between 7 and 21 days with mortality between 90 and 100%, which qualifies them as a potential biological control to develop future tests in greenhouse and field application for the control of coconut of South America and the potential control of the red boll weevil in the coastal region of the State of Alagoas and in Brazil.

Keywords: Coleoptera; Mortality; Sequencing; Genetic diversity; Entomopathogenic fungi; *Rhynchophorus*.

1. INTRODUÇÃO

O coqueiro, *Cocos nucifera* (L.), pertence à família Arecaceae, uma planta de clima tropical, de origem asiática, teve uma rápida disseminação pelo litoral nordestino, por encontrar na região características edafoclimáticas favoráveis para o cultivo, ocupando um ecossistema com poucas possibilidades de outras explorações comerciais, tendo um grande significado social para região, sendo base constituinte no artesanato, matéria prima para indústria de cosméticos e alimentícios, na construção de casas, no uso tradicional do coco *in natura*, gerando oportunidades de emprego e renda as comunidades (ELIAS; SANTOS, 2016; ELIAS et al. 2015).

Uma das limitantes na produção da cultura do coqueiro é a incidência de pragas e de doenças que constituem um problema na exploração e propiciam uma baixa produtividade, podendo ser observadas a presenças de insetos considerados pragas desde o início da implantação das mudas até a fase adulta (FERREIRA; WARWICK; SIQUEIRA, 1998). Dentre as pragas de importância econômica para região de Alagoas, a broca-do-olho-do-coqueiro, *Rhynchophorus palmarum*, causam danos consideráveis aos produtores e as dificuldades no controle é favorecido pelo hábito críptico da larva, formando galerias no interior do tronco das palmeiras. Este inseto é o vetor responsável na transmissão do nematoide *Bursaphelenchus cocophilus*, agente causador da doença conhecida como anel vermelho (FERREIRA; ARAUJO; SARRO, 2002).

A distribuição geográfica *R. palmarum* compreende desde Argentina até EUA, sob erradicação em Califórnia, Arizona e Texas (EPPO, 2020). Este inseto possui coloração preta, medindo de 2 a 4 cm de comprimento e com um rostró alongado, possui dimorfismo sexual, os machos têm uma série de pêlos em forma de pincel na região dorsal, ao contrário das fêmeas que também apresentam um rostró alongado sem pêlos. As larvas são esbranquiçadas, ficando mais amareladas nos últimos instantes larvais, com cabeças marrons escuras, curvadas até 7,5 cm de comprimento ao final de seu desenvolvimento, no décimo primeiro ínstar. As pupas são amareladas e permanecem alojadas em um casulo de 8 a 10 cm de comprimento, construído pelas larvas com fibras de coco (GALLO et al. 2002; FERREIRA et al. 2002).

Para tentar amenizar os prejuízos causados por *R. palmarum*, são utilizados o controle químico, com baixa eficiência na erradicação das populações do inseto, o cultural que consiste em erradicar e queimar as árvores afetadas, o que reduz a infestação, porém causa um impacto ambiental na emissão dos gases de efeito estufa e o uso do feromônio de agregação rincoforol

associados com pedaços de cana-de-açúcar (DUARTE et al. 2003; MOURA et al. 1990; ROCHAT et al. 1991).

Antes de qualquer aplicação de táticas de manejo agrícola para o controle de pragas um levantamento faunístico no local deve ser abordado para identificação de agentes microbianos (SANJUAN, 2014). As espécies de fungos entomopatogênicos com maior potencial para serem desenvolvidas como bioinseticidas são justamente aquelas que podem estar presentes no ambiente onde o microorganismo será aplicado (ALVES, 1998; GOETTEL et al. 1990; AHMED; FREED, 2021). Para Wakil et al. (2017), Yasin et al. 2017 e Shahina et al. (2009), o uso de FEs nativos podem ser usados como biopesticidas no controle de insetos do gênero *Rhynchophus* spp., minimizando a resistência a inseticidas. Os critérios de seleção dos isolados para fins de biocontrole baseiam-se nas taxas de mortalidade de insetos observadas em bioensaios, além da eficiência de produção dos conídios em meio de cultura (MCKINNON et al. 2018; AHMED; FREED, 2021).

Para a identificação dos fungos, são necessárias diferentes técnicas, dentre elas, a taxonômica clássica muito utilizada porque facilita a separação por grupos e assim possibilitando a realização de testes de patogenicidade (ALVES, 1998) e os estudos moleculares são de grande importância para identificação da variedade genética dos fungos entomopatogênicos (FEs) nativos.

O avanço das técnicas moleculares, principalmente aquelas baseadas na análise de DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR), tem permitido o desenvolvimento de metodologias rápidas, precisas e aplicáveis a um grande número de amostras para a detecção e identificação de diferentes fungos (KINDERMANN et al. 1998; SCHOCH et al. 2012; WANG; WANG, 2017). Nesse sentido, os perfis de DNA têm sido usados como ferramentas poderosas e sensíveis para identificar com precisão isolados de fungos que infectam uma população hospedeira (WANG; WANG, 2017). As técnicas moleculares são ferramentas úteis no estudo de identificação filogenética dos fungos, sendo importante o sequenciamento de várias regiões específicas para identificação da espécie.

Dentre os marcadores moleculares, são comumente utilizados para filogenia de fungos entomopatogênicos a região *ITS* (do inglês Internal Transcrito Spacer) um marcador nuclear possui sequências altamente conservadas (IMOULAN, 2017) e α -*TEF* (Translation Elongation Factor-1 α) na diferenciação no nível de espécies (BUSTAMANTE et al. 2019). Portanto, o presente estudo objetivou caracterizar a diversidade genética dos fungos entomopatogênicos

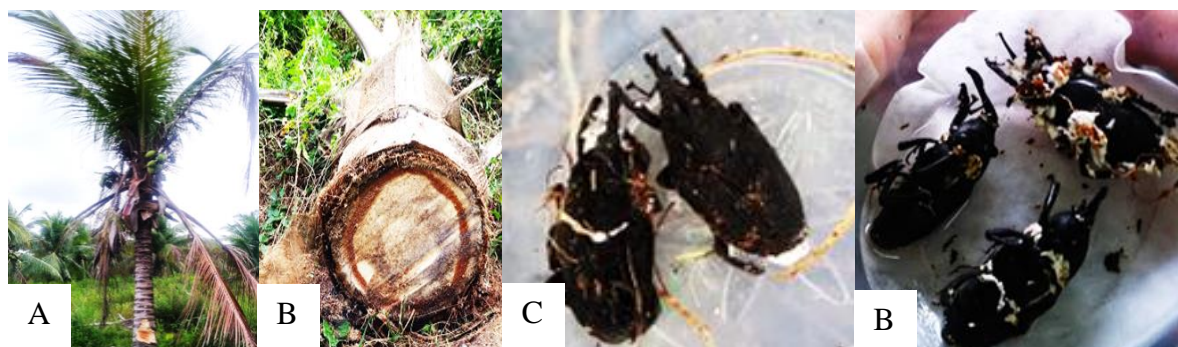
nativos que parasitam *R. palmarum* e verificar a patogenicidade destes isolados em relação aos insetos da ordem coleóptera *R. palmarum* como potencial controle para *R. ferrugineus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem e isolamento de fungos entomopatogênicos

As amostras de *R. palmarum* e de fungos entomopatogênicos utilizados neste estudo foram coletados na Fazenda São José (10° 08' 30.5" S, 36° 12' 00.7" W) povoado de Areas, Coruripe, Alagoas. Para o início das amostragens realizou-se uma entrevista com o proprietário da fazenda e seus trabalhadores, com a finalidade de entender a demanda local para o manejo agrônômico da cultura do coqueiro (Figura 1 A/B). Foram coletados num total de cem amostras de insetos com sintomas de ataque de fungos, seguindo a metodologia de esforço amostral " descrito por Sanjuan et al. (2014) (Figura 1 C). Amostras dos insetos identificadas e armazenadas em potes plásticos. Para a coleta de amostras de insetos (com sinais de ataque de fungos), foi seguida uma metodologia padronizada onde as amostras foram colocadas em câmara úmida e incubadas a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ para promover o desenvolvimento fúngico (TEXEIRA; FARIA, 2010) (Figura 1 D). Os conídios que carregam o corpo do inseto foram coletados e inoculados em placas com meio de cultura ágar com Dextrose de Batata e incubados a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5 a 21 dias. O crescimento do fúngico foi observado periodicamente nas placas e para a busca de possíveis colônias de fungos de interesse foram realizadas observações microscópicas (HUMBER, 2005).

Figura 1: Coleta a campo. (A) Plantação de coco da Fazenda São José, município de Coruripe – Alagoas, com infestação de *R. palmarum*; (B) Coqueiro com manifestação da doença do anel vermelho; (C e D) *R. palmarum* parasitados com fungos entomopatogênicos nativos.



Fonte: Autora, 2018

2.2 Caracterização morfológica dos fungos entomopatogênicos nativos.

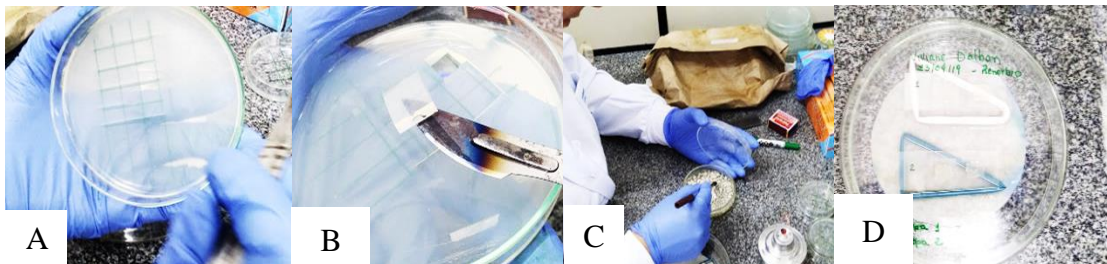
Para a identificação morfológica usou-se a técnica de microcultivo, segundo Koneman et al. (2001), caracterizada pelo crescimento fúngico numa superfície pequena de bloco de ágar 1 x 1cm disposto numa lâmina de vidro de 76 por 76 mm, colocados numa base de varetas em triângulo (Figura 2 A/B). Um bloco de Ágar foi colocado com auxílio de uma espátula sobre a superfície central da lâmina e nele inoculado nas bordas do bloco de ágar em quatro lugares uma porção da colônia, com auxílio de uma alça de inoculação, esterilizada em bico de Bunsen (Figura 2 C/D). Uma lamínula foi aquecida passando-a rapidamente pela chama de um bico de Bunsen e colocada de imediato sobre a superfície do bloco de ágar inoculado. A placa Petri foi tampada, lacrada e incubada a temperatura ambiente durante um período de 5 a 7 dias, quando o crescimento fúngico mostrou-se visualmente suficiente, a lamínula pode ser retirada com auxílio de um palito de madeira e feita uma nova montagem de lâmina com lamínula, colocou-se uma gota do corante azul-de-algodão e levada ao microscópio para análise onde foram observadas diariamente as estruturas de frutificação num microscópio óptico.

A análise macroscópica das colônias foi feita mediante observação direta, onde foram analisadas: a velocidade de crescimento no isolamento primário das colônias, a coloração do reverso das colônias, a topografia e a textura do micélio. Para a identificação microscópica foi utilizado o microscópio Zeis e feitas fotomicrográficas, onde foram observadas as estruturas das hifas, verificando a presença de septos, os conidióforos e fiálides.

A identificação taxonômica dos isolados dos FEs nativos foi realizada utilizando a chave para identificação de patógenos de insetos descrita por De Hoog (1972) e confirmada por Fernandes et al. (2011), Rehner et al. (2011) e Kepler et al. (2017). Após a identificação

taxonômica clássica, estes foram separados em grupos de gêneros para a realização dos testes de patogenicidades e para auxiliar na análise molecular.

Figura 2: Etapas para caracterização morfológica dos fungos entomopatogênicos nativos (A e B) Cortes do meio de cultura em blocos;(C) Repicagem dos isolados; (D) Montagem da placa com as lâminas para a microcultura.



Fonte: Autora, 2018

2.3 Avaliação da Mortalidade e Patogenicidade dos fungos entomopatogênicos nativos de *R. palmarum*.

2.3.1 Isolados de fungos entomopatogênicos

Os FEs encontrados parasitando os *R. palmarum* denominados CVAD01, CVAD02 e CVAD06, foram retirados os fragmentos dos corpos de frutificação dos insetos e cultivados em placa Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e incubados a 25°C para purificação dos isolados e mantido em observação por 20 dias.

Para a análise de mortalidade e patogenicidade utilizou-se como parâmetros de comparação os isolados *Beauveria bassiana* CPATC/032 da Embrapa Tabuleiros Costeiros e o isolado *B. bassiana* comercial® (Tabela 1). Todos os isolados dos fungos entomopatogênicos foram purificados e repicados em placas Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio de cultura BDA e incubados por 15 dias. Após o crescimento e esporulação os isolados foram re-inoculados no inseto *R. palmarum*, técnica denominada Postulado de Koch (MICHEREFF, 2012). Para a realização dos bioensaios de patogenicidade, foram utilizados insetos adultos de *R. palmarum*.

Tabela 1: Hospedeiros e procedência dos isolados de fungos entomopatogênicos utilizados nos experimentos

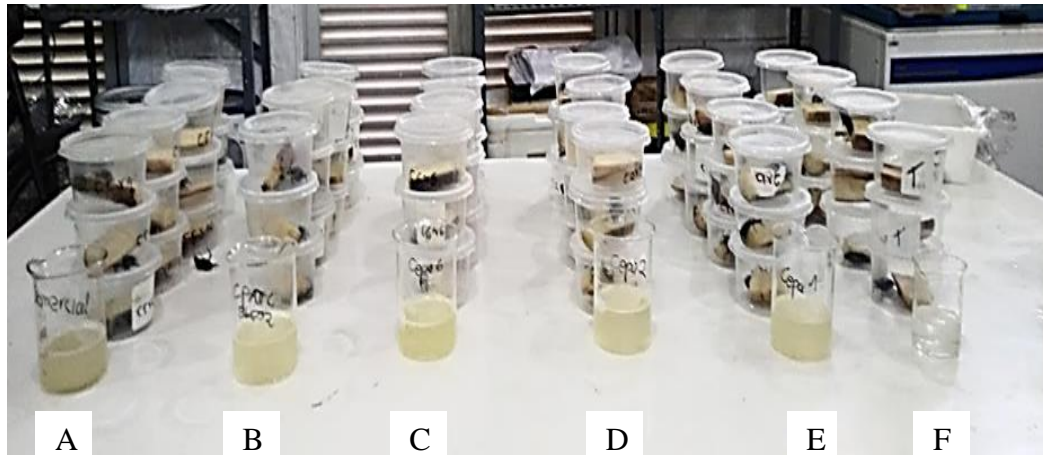
Isolados	Localidades	Hospedeiro
CVAD01	Coruripe, Alagoas	<i>R. palmarum</i>
CVAD02	Coruripe, Alagoas	<i>R. palmarum</i>
CVAD06	Coruripe, Alagoas	<i>R. palmarum</i>
<i>Beauveria bassiana</i> CPATC/032	Embrapa Tabuleiros Costeiros, Sergipe.	<i>R. palmarum</i>
<i>Beauveria bassiana</i> *Comercial®	Não aplica	Não aplica

Fonte: Autora, 2020

2.3.2 Bioensaio de patogenicidade no inseto

Para a preparação das suspensões dos fungos, os esporos foram raspados das placas de Petri, com auxílio de um bisturi devidamente flambado e, em seguida, transferidos para tubos de ensaio. Foram realizadas diluições sucessivas para contagem em câmara de Neubauer e quantificação, sendo cada suspensão concentrada em 10^9 esporos/mL + espalhante adesivo Tween 80 (5 mL/L). Os adultos de *R. palmarum* foram imersos em 20 mL de suspensão fúngica (conídios do fungo + água estéril e Tween 80) na concentração de 1.0×10^9 conídios/mLm, durante dois ciclos de três segundos cada. A mesma metodologia foi adotada para a testemunha, porém sem o fungo. Após a imersão, os insetos foram individualizados em copos plásticos, contendo em sua base papel filtro, pedaços de cana ofertados como alimento e as observações foram diárias, até a morte dos insetos. Após a morte, procedeu-se à imersão dos insetos em álcool 70% e água destilada e posterior individualização em câmara úmida, para se observar a extrusão do fungo e a confirmação do agente causal (Figura 3).

Figura 3: Adultos de *R. palmarum* em potes plásticos com papel filtro e cana, imersos em 20 mL de suspensão fúngica (conídios do fungo + água estéril e Tween 80) na concentração de 1.0×10^9 conídios/mLm, durante dois ciclos de três segundos cada. Ordem do bioensaio: (A) Comercial; (B) CPATC032; (C) CVAD06; (D) CVAD02; (E) CVAD01 e (F) Testemunha.



Fonte: Autora, 2020

As avaliações ocorreram diariamente, e os insetos mortos foram transferidos para recipientes plásticos com um pedaço de algodão umedecido com água destilada, mantidas em BOD a $25,0 \pm 0,5^\circ \text{C}$, para a confirmação da morte causada pelo patógeno. O experimento foi conduzido em salas climatizadas e em BOD com temperatura de $25 \pm 2^\circ \text{C}$, UR de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

Se utilizou um delineamento experimental inteiramente casualizado, com 6 (seis) tratamentos e 12 (doze) repetições, sendo cada repetição constituída de um inseto adulto. Foi realizada uma ANOVA ($P \leq 0,05$) em caso de significância foi realizado um teste de comparação de médias Duncan ($P \leq 0,05$)

Durante o experimento, nos intervalos de tempo aos 7, 14, 21 e 28 dias, foram calculadas as (%) de mortalidades dos tratamentos, as quais foram corrigidas pela testemunha segundo a formula estabelecida por Shneider-Orelly (1947):

$$\%MC = \left(\frac{\% \text{Mortalidade Total} - \% \text{Mortalidade da Testemunha}}{(100 - \% \text{Mortalidade da Testemunha})} \right) \times 100$$

Onde: (MC) significa Mortalidade Corregida.

2.4 Caracterização molecular dos fungos entomopatogênicos nativos

2.4.1 Extração de DNA

Para obtenção da massa micelial dos três isolados dos fungos entomopatogênicos nativos (CVAD1, CVAD2 e CVAD6), provenientes de culturas puras de cada espécie de fungos foram repicados em placa Petri com meio BDA (Ágar-Batata-Dextrose) e mantidos para crescimento durante 7 dias em temperatura ambiente de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. Os micélios frescos, foram raspados e macerados, seguindo o protocolo modificado (DELLAPORTA et al. 1983).

A extração do DNA seguiu o protocolo descrito por Doyle; Doyle (1987), cujo micélio triturado foi transferido para tubos de micro centrifuga com capacidade de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se 1 mL de tampão de extração tampão de extração hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) 4% (CTAB 4%, NaCl 1,4M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, PVP 1%), 4 μL de β -mercaptoetanol (0,1% v/v), e depois, os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 12.000rpm por 15 minutos.

O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foi adicionado 600 μL de CIA (clorofórmio: álcool isoamílico 24:1) e 40 μL de CTAB 10% aquecido a 65°C . Após centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo e foi acrescentando 400 μL de etanol absoluto. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e seco em temperatura ambiente e, em seguida, ressuspendido com 40 μL de TE (Tris-EDTA; Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM) + RNase (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A qualidade do DNA foi estimada visualmente em gel de agarose 0,8% e corados com brometo de etídio e observados sob luz UV. O material foi armazenado sob temperatura de -20°C .

2.4.2 Amplificação, Purificação e Sequenciamento do DNA

Os três isolados do estudo foram amplificados com os primers *ITS-rDNA* (Internal Transcrito Spacer), α -*TEF* (Translation Elongation Factor-1 α) e ATP6 (ATP synthase complex) (Tabela 2).

Tabela 2: Primers utilizados para amplificação dos genes

Primer	Sequencia (5' - 3')	Referências
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al., 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
EF1-n8F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	Rehner; Buckley
EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCTTACC	(2005)
ATP6-C1A	AGAWCAATTYGAARTRAGAG	
ATP6-C2A	ACAAAYACTTGWGCTTGKATWAAIGC	Castlebury et al. 2004

Fonte: Autora, 2021

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 30 µl total, de acordo com a descrição na Tabela 3. O volume final das reações foi ajustado para 60µl com água Milli-Q autoclavada. As reações de PCR foram realizadas em termociclador Applied Biosystems (2720 Thermal Cycler) nas seguintes condições: (i) um ciclo a 94°C por 2 min (desnaturação inicial); 35 ciclos a 94°C por 45s (desnaturação), 55°C por 30s (anelamento), e 72°C por 35 s (extensão); e um ciclo final à 72°C por 10 min (WHITE et al., 1990); (ii) 95°C por 8 min; 35 ciclos a 95°C por 15 s, 55°C por 20s, 72°C por 60 s, um ciclo final à 72°C por 5 min; (iii) 94° - 4 min, com 4 ciclos de 94° - 1 min; 37° - 35 s, 72° - 1 min, 29 ciclos de 94° - 35 s, 45° - 55 s, 72° - 1 min, 72° - 10 min (CASTLEBURY et al. 2004). Após a amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídio e observados sob luz UV. Os produtos de PCR obtidos foram sequenciados na empresa Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul) (<https://dna.macrogen.com/eng/member/login.jsp>).

Tabela 3: Descrição das concentrações para a o PCR

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	Concentrações (vol.)
DNA genômica	1.0 µl
d-NTP's	2.4 µl
Primers	2.0 µl
MgCl ₂	0.9 µl
Tampão 10x	3.0 µl
Taq DNA polimerase	0.2 µl
H ₂ O	18.5 µl

Fonte: Autora, 2021

2.4.3 Edição de dados e análise filogenética

As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software CodonCode Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts, USA). Todas as sequências foram analisadas e o arranjo dos nucleotídeos em posições ambíguas foram corrigidos por comparação das sequências senso e anti-senso. As análises iniciais foram realizadas com o algoritmo BLAST n (ALTSCHUL et al. 1990) no banco de dados GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank). Sequências de referência para várias espécies do gênero foram recuperadas do GenBank (Tabela 4) e utilizadas para a reconstrução da árvore filogenética.

Para obtenção do alinhamento múltiplo das sequências de nucleotídeos utilizou-se o o programa MEGA X (KUMAR et al. 2018). As filogenias de Inferência Bayesiana (BI) para os dados de sequência de ITS e TEF, foram construídas individualmente no portal CIPRES (MILLER et al. 2010) usando MrBayes v. 3.2.3 (RONQUIST et al. 2012). O melhor modelo evolutivo para as análises foi realizado nas sequências concatenadas pelo MrModeltest v.2.3 de acordo com o Akaike Information Criterion (AIC) (POSADA; BUCKLEY 2004). As análises ocorreram por 10 milhões de gerações usando quatro cadeias e amostradas a cada 1.000 gerações, para um total de 10.000 árvores. As primeiras 2.500 árvores foram descartadas na fase de queima. Probabilidades posteriores (RANNALA; YANG 1996) foram determinadas a partir de uma árvore de consenso de regra da maioria gerada com as 7.500 árvores restantes.

Tabela 4: Isolados usados na análise filogenética

Isolado	Espécie	Local	Hospedeiro	Código GenBank	
				<i>ITS</i>	<i>TEF</i>
AESEF 7542	<i>B. amorpha</i>	EUA, Colorado	Hymenoptera: Formicidae	HQ880805	HQ881007
ARSEF 2641	<i>B. amorpha</i>	Brasil	Hymemoptera: Formicidae	AY532008	AY531917
ARSEF 4384	<i>B. asiatica</i>	China	Coleoptera: Scarabaeidae	AY532026	AY531935
ARSEF 4474	<i>B. asiatica</i>	China	Coleoptera: Scarabaeidae	AY531936	AY531936
ARSEF 4850	<i>B. asiatica</i>	Republica da Korea	Coleoptera: Cerambycidae	AY531936	AY531937
ARSEF 1040	<i>B. bassiana</i>	Japão	Lepidoptera: Bombycidae	AY531972	AY531881
ARSEF 1478	<i>B. bassiana</i>	Brasil	Hemiptera: Pentatomidae	AY531981	AY531890
ARESF 1811	<i>b. bassiana</i>	Marrocos	Coleoptera: Curculionidae	AY531992	AY531901
ARSEF 300	<i>B. bassiana</i>	Austrália	Hemiptera: Lygaeidae	AY532015	AY531924
ARSEF 1848	<i>B. bassiana</i>	Bélgica	Coleoptera: Rhizophagidae	AY531995	AY531904
CVAD01*	<i>B. bassiana</i>	Brasil: Alagoas	Coleoptera: Curculionidae	PR	PR
CVAD02*	<i>B. bassiana</i>	Brasil: Alagoas	Coleoptera: Curculionidae	PR	PR
CVAD06*	<i>B. bassiana</i>	Brasil: Alagoas	Coleoptera: Curculionidae	PR	PR
ARSEF 751	<i>B. bassiana</i>	Vietnam	Coleoptera: Chrysomelidae	AY532045	AY531954
ARSEF 2567	<i>B. caledonica</i>	Escócia	Solo	AY532006	AY531915
ARSEF 2567	<i>B. caledonica</i>	Suiça	Orthoptera: Gryllacrididae	AY532006	AY531915
ARSEF 2251	<i>B. caledonica</i>	Brasil	Coleoptera	AY532003	AY531912
IMI 228343	<i>B. malawiensis</i>	Malawi	Solo	NR_136979	DQ376246
ARSEF 3216	<i>B. pseudobassiana</i>	EUA, Wisconsin	Thysanoptera: Thripidae	AY532019	AY531927
ARSEF 3405	<i>B. pseudobassiana</i>	EUA, Kentucky	Lepidoptera: Tortricidae	AY532022	AY531931
ARSEF 4933	<i>B. pseudobassiana</i>	Franca	Coleoptera: Curculionidae	AY532029	AY531938
Outgroup					
ARSEF 4096	<i>Isaria tenuips</i>	Brasil	Lepidoptera: Noctuidae	HQ880827	HQ881018
ARSEF 4029	<i>Isaria farinosa</i>	Dinamarca	Coleoptera: Carabiidae	HQ880828	HQ881019
Gg-14	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Turquia	Orthoptera: Gryllotalpidae	KM215663	KM215656

Legenda: * Isolados nativos da região de Coruripe-AL; PR (Processo de Registro no GenBank).

Fonte: Autora, 2021

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização morfofisiológica dos fungos entomopatogênicos nativos

Estudos morfológicos são de suprema importância na caracterização de fungos entomopatogênicos, pois possuem a capacidade de orientar a identificação taxonômica e, além disto, direcionam a seleção de espécimes para a realização de testes de patogenicidade (ALVES, 1998). Entretanto, se faz necessário a associação com a engenharia molecular que auxiliará e complementa na diferenciação das espécies (REHNER et al. 2011).

Os três isolados nativos (CVAD01, CVAD02 e CVAD06) e as testemunhas (CPATC/032 e CComercial) em estudo apresentaram as mesmas características macroscópicas, com crescimento lento, coloração micelial de cor branca, com reverso amarelo claro, topografia do micélio cottonoso e textura pulverulenta (Figura 4).

Figura 4: Isolados dos fungos entomopatogênicos nativos repicados em meio BDA 1^a.) Linha são o verso dos diferentes isolados na ordem: (a) CVAD01, (b) CVAD02, (c) CVAD06, (d) Comercial e (e) CPATC/032; 2^a. e 3^a) Linha do reverso dos diferentes isolados.

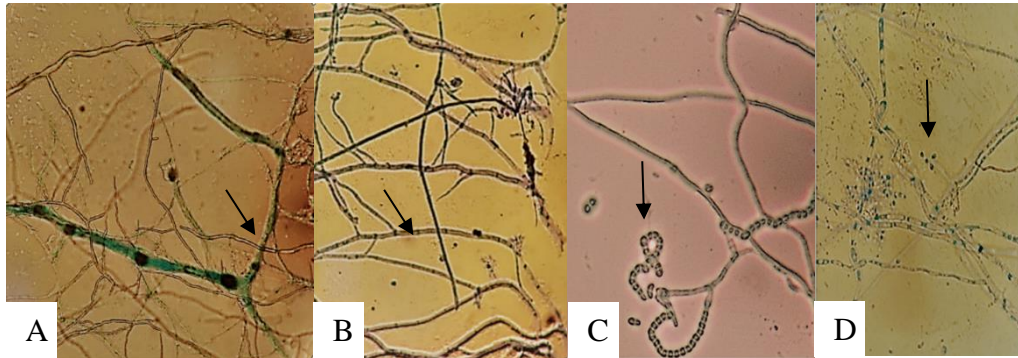


Fonte: Autora, 2020.

As análises microscópicas dos isolados foram realizadas mediante apreciação de fotomicrografias, os caracteres microscópicos apresentaram hifas septadas hialinas, com septos uniformes, conidióforos geniculadas, denticuladas em ziguezague, fiálides unicelulares aglomeradas e conídios com formato ovoide (Figura 5). No presente trabalho, todos os isolados,

apresentaram características morfológicas condizentes para o gênero *Beauveria* reportadas por De Hoog (1972), Fernandes et al. (2011), Rehner et al. (2011) e Kepler et al. (2017).

Figura 5: Características morfológicas dos isolados, apresentando aspectos semelhantes à espécie *B. bassiana*: (A-B) parte micelial e hifas septadas, (C-D) conídios; 40x.



Fonte. Autora, 2021

Segundo Varela e Morales (1996) relataram que a seleção de isolados somente em função das características morfológicas não devem ser utilizadas, principalmente quando se referem ao gênero *Beauveria* spp., considerando a ampla variação observada entre linhagens (IMOULAN et al., 2017; LIU et al. 2003), sendo necessários estudos moleculares para descrição a nível de espécie.

De acordo Bustamante et al. (2019) o gênero *Beauveria* é considerado cosmopolita de características anamórfico e teleomórfico, encontrados no solo e possui a função ecológica de causar patogenicidade em artrópodes, incluindo este fungo como espécies ecologicamente e economicamente importantes no controle de insetos-pragas (CHEN et al. 2018; KEPLER et al. 2017; REHNER et al. 2011). A identificação de espécies em *Beauveria* é difícil devido à sua simplicidade estrutural e à falta de características na variação fenotípica (IMOULAN et al. 2017). Portanto, o uso de dados de sequência de múltiplos *locus* é essencial para estabelecimento a nível de espécies.

De maneira geral, o processo de desenvolvimento no ambiente se inicia com a adesão e germinação dos conídios ao tegumento do hospedeiro, no qual envolve produção de enzimas e diferenciação celular para garantir uma colonização e dispersão eficazes (VALERO-JIMÉNEZ et al. 2016; ALVES, 1998).

Portanto, este estudo evidencia a importância de estudos morfológicos para fungos entomopatogênicos propiciando na otimização dos bioensaios de mortalidade e patogenicidade e separação dos grupos que referenciam os fungos, uma vez que as análises moleculares,

demandam um tempo maior para serem concluídas e de grande importância para identificação das espécies.

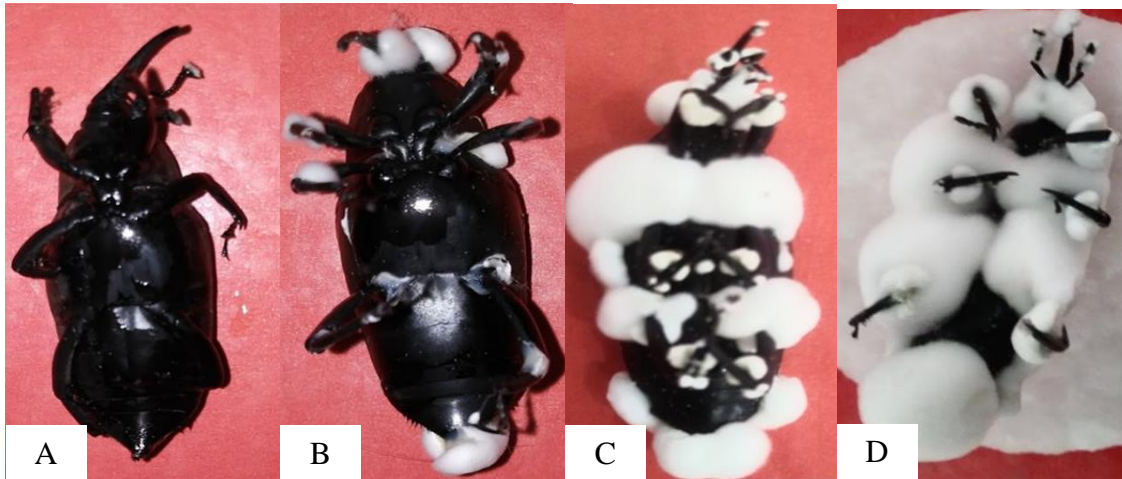
3.3 Avaliação da mortalidade e patogenicidade dos fungos entomopatogênicos nativos em *Rhynchophorus palmarum*.

A obtenção dos isolados dos FEs nativos que parasitam *R. palmarum* foram realizadas no período de agosto a dezembro de 2018, para obtenção dos isolados, demonstrou-se que o fungo ocorre enzooticamente no município de Coruripe-AL, e que, segundo Alves (1998), as espécies de fungos entomopatogênicos com maior potencial para serem desenvolvidas como bioinseticidas são justamente aquelas cosmopolitas, ou seja, que podem estar presentes no ambiente onde o microorganismo será aplicado.

O estudo dos cinco isolados, denominados *Beauveria bassiana* isolados CVAD01/CVAD02/CVAD06, e as testemunhas *B. bassiana* CPATC/032 e *B. bassiana* comercial demonstraram que todos apresentaram germinação de esporos, indicando boa qualidade dos isolados, estando aptos a serem submetidos aos testes de patogenicidade. Segundo Gonzalez et al. (1993), a qualidade de germinação está diretamente relacionada com a viabilidade de conídios e com o tempo de sobrevivência dos isolados. Durante os bioensaios, observou-se na superfície do corpo dos insetos as etapas de proliferação dos fungos, compreendidos em: início da infecção, início do crescimento do micélio, cobrimento e esporulação micélio, confirmando o descrito por Valero-Jiménez et al. (2016); Fernandes, (2010) e Alves (1998) (Figura 6). Para os três experimentos, mantidos em BOD a 25 ± 2 °C, UR de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas, o ciclo biológico completo no inseto *R. palmarum* para os isolados *B. bassiana* isolado CVAD01/CVAD02/CVAD06, *B. bassiana* CPATC/032 e *B. bassiana* comercial foram de 19, 20, 21, 23 e 25 dias, respectivamente.

O processo de desenvolvimento da esporulação iniciou-se nos espiráculos, nos espaços intersegmentais da cutícula do corpo, das pernas, nas bases e antenas terminais e do rosto de *R. palmarum* (Figura 6). As mesmas observações para etapa de esporulação foram descritas por León-Martínez et al. (2019) ao analisarem a patogenicidade de isolados promissórios de *B. bassiana* sobre adultos de *R. palmarum*.

Figura 6: Ciclo biológico completo no inseto *Rhynchophorus palmarum* por *B. bassiana* isolados nativos CVAD01 (19 dias), CVAD02 (20 dias), CVAD06 (23 dias) versus as testemunhas *B. bassiana* CPATC/032 (23 dias) e *B. bassiana* comercial (25 dias). Representados por: (A) início da infecção; (B) Início do crescimento do micélio; (C) Cobrimento do Micélio e (D) Esporulação.



Na tabela 5, com relação a avaliação da mortalidade corrigida dos *R. palmarum* em relação aos cinco isolados de FEs nativos *B. bassiana* isolado CVAD01, *B. bassiana* isolado CVAD02, *B. bassiana* isolado CVAD06, *B. bassiana* Comercial e *B. bassiana* CPATC/32, observou-se que no primeiro experimento, durante os sete primeiros dias, o isolado nativo *B. bassiana* isolado CVAD06, alcançou 50% de mortalidade corrigida, sendo estatisticamente diferente ($P \leq 0,05$) aos demais isolados *B. bassiana* isolado CVAD01, *B. bassiana* Comercial, *Beauveria* sp. CVAD02

Em 14 dias, registrou-se um aumento na porcentagem de mortalidade corrigida dos isolados *B. bassiana* isolado CVAD06 e *B. bassiana* isolado CVAD01 de 70%, para 21 dias, observou-se uma mortalidade corrigida de 100% em todos os isolados *B. bassiana* isolado CVAD06, *B. bassiana* isolado CVAD01, *B. bassiana* isolado CVAD02 e *B. bassiana* CPATC/32, apresentando diferenças ($P \leq 0,05$) com relação a *B. bassiana* comercial, a qual apresentou um 70% de mortalidade corrigida.

Finalmente aos 28 dias de avaliação, os isolados nativos mantiveram 100% de mortalidade corrigida e o isolado *B. bassiana* Comercial incrementou a porcentagem de mortalidade corrigida em 91%. Estes resultados demonstram que principalmente os isolados nativos do 14° da avaliação ao 21° dia apresentaram uma mortalidade crescente de 70 a 100%, evidenciando que são isolados promissórios para o controle biológico de adultos de *R. palmarum*.

Tabela 5: Porcentagem de mortalidade dos FEs nativos sobre *R. palmarum*. PM (Porcentagem de Mortalidade); PMC (Porcentagem de Mortalidade Corrigida); T* (Testemunha); DP (Desvio Padrão).

EXPERIMENTO 1										
Dias	<i>B. bassiana</i> CVAD01		<i>B. bassiana</i> CVAD02		<i>B. bassiana</i> CVAD06		<i>B. bassiana</i> CPATC/32		<i>B. bassiana</i> Comercial	
	PM	PMC	PM	PMC	PM	PMC	PM	PMC	PM	PMC
	Media	*Media ± DP	Media	*Media ± DP	Media	*Media ± DP	Media	*Media ± DP	Media	*Media ± DP
7	25	10± 3,768 b	25	10 ± 3,768 b	50	40 ± 4,351 a	8,3	0	25	10± 3,768 b
14	75	70 ± 5,179 a	58,3	50± 4,291 c	75	70 ± 3,768 a	66,6	60± 4,103 b	66,6	60± 4,103 b
21	100	100± 3,553 a	100	100± 1,855 a	100	100± 1,855 a	100	100± 1,855 a	75	70± 3,768 b
28	100	100 ± 3,553 a	100	100± 1,855 a	100	100± 1,855 a	100	100± 1,855 a	91	90± 2,405 b
T	16,6									

* Médias seguidas de letras diferentes na coluna, diferem significativamente entre si, pelo Teste de Duncan a nível de 5% de probabilidade.

Na tabela 6, em um segundo experimento, baixo as mesmas condições de bioensaio e com uma multiplicação previa de todos os isolados em adultos de *R. palmarum*, para reativar a virulência, mostraram os seguintes resultados: o isolado nativo *Beauveria* sp. CVAD02, apresentou uma porcentagem de mortalidade corrigida de 50% sendo diferente ($P \leq 0,05$) para *B. bassiana* isolado CVAD01, *B. bassiana* isolado CVAD06, *B. bassiana* Comercial e *B. bassiana* CPATC/32, mas quando foi avaliado o experimento até o 14º dias, observou-se alta mortalidade dos diferentes isolados, se destacando *B. bassiana* isolado CVAD01, a qual, apresentou mortalidade corrigida de 100%, seguida *B. bassiana* isolado CVAD02 e *B. bassiana* isolado CVAD06, com mortalidade de 91.6%, sendo diferentes ($P \leq 0,05$) das mortalidades registradas por *B. bassiana* CPATC/32 e *B. bassiana* Comercial com 45 e 50% respectivamente.

Já para um tempo de avaliação de 21 dias, a mortalidade manteve-se constante, com diferença para *B. bassiana* isolado CVAD06 e *B. bassiana* Comercial, que incrementaram sua mortalidade em 58 e 54% (Tabela 14). Para o tempo de 28 dias, não houve diferenças na mortalidade registrada no tempo anterior de 21 dias. Desta forma, os isolados nativos *B. bassiana* isolado CVAD01, *B. bassiana* isolado CVAD02 e *B. bassiana* isolado CVAD06, confirmaram possuir uma alta patogenicidade no controle de adultos de *R. palmarum*.

Em referência a tabela 7, novamente com passagens de todos os isolados para reativação da patogenicidade em adultos de *R. palmarum*, continuaram apresentando respostas semelhantes as avaliações obtidas nos dois experimentos anteriores. Na avaliação de patogenicidade de 7 dias do tratamento, o isolado *B. bassiana* isolado CVAD06, apresentou uma mortalidade de 50%, sendo diferente ($P \leq 0,05$) aos demais tratamentos. Já para o tempo de 14 dias de avaliação, foi o isolado *B. bassiana* isolado CVAD01 que apresentou maior porcentagem de mortalidade registrada com 100%, seguidas *B. bassiana* isolado CVAD02 de 91%, mortalidades diferentes ($P \leq 0,05$), as mortalidades *B. bassiana* Comercial, *B. bassiana* isolado CVAD06 e *B. bassiana* CPATC/32 com mortalidades entre 72 a 75%. Para o tempo final de 21 dias, os dois isolados nativos apresentaram a maior mortalidade junto com *B. bassiana* CPATC/32 que incrementou sua mortalidade 91.6%.

Tabela 6: Porcentagem de mortalidade dos FEs nativos sobre *R. palmarum*. PM (Porcentagem de Mortalidade); PMC (Porcentagem de Mortalidade Corrigida); T* (Testemunha); DP (Desvio Padrão).

EXPERIMENTO 2										
Dias	<i>B. bassiana</i> CVAD01		<i>B. bassiana</i> CVAD02		<i>B. bassiana</i> CVAD06		<i>B. bassiana</i> CPATC/32		<i>B. bassiana</i> Comercial	
	PM	PMC	PM	PMC	PM	PMC	PM	PMC	PM	PMC
	Media	*Media ± DP	Media	*Media ± DP	Media	*Media ± DP	Media	*Media ± DP	Media	*Media ± DP
7	33	3,3 ± 4,103 b	50	50 ± 4,351 a	25	25 ± 3,768 c	25	25 ± 3,768 c	25	25 ± 3,768 c
14	100	100 ± 1,86 a	91,6	91,6 ± 2,405 b	91,6	91,6 ± 2,405 b	50	50 ± 4,351 c	50	45,4 ± 2,51 d
21	100	100 ± 1,86 a	91,6	91,6 ± 2,405 b	91,6	91,6 ± 2,405 b	58,3	58,3 ± 4,291 cd	58,3	54,5 ± 4,291 c
28	100	100 ± 1,86 a	91,6	91,6 ± 2,405 b	91,6	91,6 ± 2,405 b	66,6	63,6 ± 4,103 d	83	81,8 ± 3,243 c
T	8,3									

* Médias seguidas de letras diferentes na coluna, diferem significativamente entre si, pelo Teste de Duncan a nível de 5% de probabilidade.

Tabela 7: Porcentagem de mortalidade dos FEs nativos sobre *R. palmarum*. PM (Porcentagem de Mortalidade); PMC (Porcentagem de Mortalidade Corrigida); T* (Testemunha); DP (Desvio Padrão)

EXPERIMENTO 3											
Dias	<i>B. bassiana</i> CVAD01		<i>B. bassiana</i> CVAD02		<i>B. bassiana</i> CVAD06		<i>B. bassiana</i> CPATC/32		<i>B. bassiana</i> Comercial		
	PM	PMC	PM	PMC	PM	PMC	PM	PMC	PM	PMC	
	Media	*Media ± DP	Media	*Media ± DP	Media	*Media ± DP	Media	*Media ± DP	Media	*Media ± DP	
7	33,3	33,3 ± 4,103 c	16,6	16,6 ± 3,243 d	50	50 ± 4,351 a	41,6	41,6 ± 4,291 a b	41,6	41,6 ± 4,291 ab	
14	100	100 ± 1,86 a	91,6	91,6 ± 2,405 b	75	72,7 ± 3,768 c	75	75 ± 3,768 c	75	75 ± 3,768 c	
21	100	100 ± 1,86 a	91,6	91,6 ± 2,405 b	75	75 ± 3,768 c	91,6	91,6 ± 2,405 b	75	75 ± 3,768 c	
28	100	100 ± 1,86 a	91,6	91,6 ± 2,405 b	75	75 ± 3,768 c	91,6	91,6 ± 2,405 b	75	75 ± 3,768 c	
T	8,3										

* Médias seguidas de letras diferentes na coluna, diferem significativamente entre si, pelo Teste de Duncan a nível de 5% de probabilidade.

3.4 Identificação molecular dos fungos entomopatogênicos nativos

Neste estudo, o uso do protocolo descrito permitiu a extração e a obtenção de DNA dos fungos entomopatogênicos nativos de boa qualidade, integridade, pureza e adequado para amplificação. Aproximadamente 544 bases foram determinadas para *ITS* e 329 bases para *TEF*.

As análises de congruência não revelaram conflito entre os conjuntos de dados das sequências *ITS* e *TEF*, portanto, eles foram combinados. As árvores ML (Maximum Likelihood) e IB (Inteferencia Bayesiana) geradas apresentaram a mesma topologia, portanto, apenas a árvore IB foi apresentada neste estudo. O conjunto de dados combinados dos dois locos incluiu 24 táxons com *Isaria farinosa* (ARSEF 4029), *Isaria tenuipes* (ARSEF 4096) e *Metarhizium anisopliae_Gg_14* como táxons de grupo externo possibilitando o enraizamento da árvore filogenética e a organização temporal das espécies analisadas. O alinhamento concatenado apresentou 953 caracteres, dos quais 111 eram sítios informativos parcimoniosos, 762 eram sítios conservados e 185 eram sítios variáveis. Os limites de locus nos alinhamentos foram: 1–544 para *ITS* e 545–953 para *TEF*. Para análises filogenéticas de IB, de acordo com AIC o modelo GTR + I + G foi selecionado para *ITS* e SYM + G para *TEF*, e para os dados combinados, o modelo foi usado GTR + I + G.

Análise filogenética para região *ITS* e *TEF* permitiram a delimitação para espécie *Beauveria bassiana* (Hypocreales) (Figuras 7; 8; 9). Rehner e Buckley (2005) compararam sequências da região *ITS1-5,8S-ITS2* obtida para cepas de *Beauveria* spp. e as sequências depositadas no banco de dados NCBI, confirmando sua posição taxonômica como pertencente a *B. bassiana*. Esses resultados são semelhantes aos obtidos neste trabalho, uma vez que, as três cepas analisadas foram agrupadas taxonomicamente como *B. bassiana*.

Para Rehner et al. (2011) é importante utilizar diferentes regiões gênicas quando se refere ao gênero *Beauveria* spp. devido a simplicidade das suas estruturas morfológicas e assim possibilitar a identificação a nível de espécie. Essa relação morfológica também foi descrita por Bustamante et al. (2019) descreveram que a identificação das espécies em *Beauveria* é difícil devido à sua simplicidade estrutural e à falta de variação fenotípica distinta, destacando a importância dos estudos de sequencias multilocus como cruciais no estabelecimento de limites de espécies em *Beauveria*.

Khalid et al. (2018) ao amplificarem os DNAs extraídos dos fungos nativos que parasitavam *R. ferrugineus*, os fragmentos da amplificação foram de 600 bp e homologia de 100% de similaridade para *B. bassiana* em relação as sequencias depositadas no GenBank.

Mergulhão et al. (2014) ao amplificarem regiões *ITS* dos isolados FEs nativos originados de diferentes insetos hospedeiros, obtiveram fragmentos de 800 pb e uma homologia de 99% para *B. bassiana*. A região *ITS* DNA tem sido amplamente utilizada na ecologia de fungos e em processos filogenéticos, porém outros locus deverão ser abordados para delimitação a nível de espécie (BUSTAMANTE et al. 2019; IMOULAN et al. 2017, 2016).

Para Serna-Domínguez et al. (2019) *Beauveria bassiana* são amplamente utilizados como agente de controle biológico contra uma ampla gama de pragas de insetos em todo o mundo, associados a diferentes tipos de habitat, hospedeiros e condições ambientais (MEYLING et al., 2009 GHIKAS et al., 2010; GASMI et al. 2021).

Os dados aqui apresentados demonstraram que os fatores: inseto hospedeiro, origem geográfica e patogenicidade possuem excelente relação de controle para os isolados dos FEs nativos que parasitam *R. palmarum* comprovados por bioensaios, possibilitando um melhor entendimento da estrutura populacional, ecológica e potencial impacto para serem usados na cultura do coqueiro na região de Coruripe-AL. Segundo Alves (1998), as espécies de fungos entomopatogênicos com maior potencial para serem desenvolvidas como bioinseticidas são justamente aquelas cosmopolitas, presentes no ambiente onde o microorganismo será aplicado.

As espécies exóticas de fungos entomopatogênicos utilizadas no biocontrole podem ser ineficazes em algumas pragas em decorrência da adaptação a diversidade climática e diferenças de isolados relacionadas ao hospedeiro, porém a identificação dos FEs nativos são considerado uma alternativa promissora principalmente no que se refere na adequação ecológica com espécies de pragas nativas e o menor efeito em organismos não-alvo em comparação com isolados exóticas (GOETTEL et al. 2010; IMOULAN et al. 2011; CLIFTON et al., 2019 ; HERNANDEZ-TREJO et al., 2019).

Figura 7. Árvore filogenética dos isolados dos isolados *Beauveria bassiana* através da análise Bayesiana da região intergênica ITS. Valores de probabilidade posteriores bayesianos $>0,55$ são indicados nos nós. *Isaria tenuipes* e *Isaria farinosa* foi utilizado como grupo externo. Os isolados obtidos neste estudo estão respresedados por CVAD2, CVAD1 e CVD6. A barra de escala (0,02) representa substituições de nucleotídeos por sítio. As análises ocorreram por 10 milhões de gerações usando quatro cadeias e amostradas a cada 1.000 gerações, para um total de 10.000 árvores.

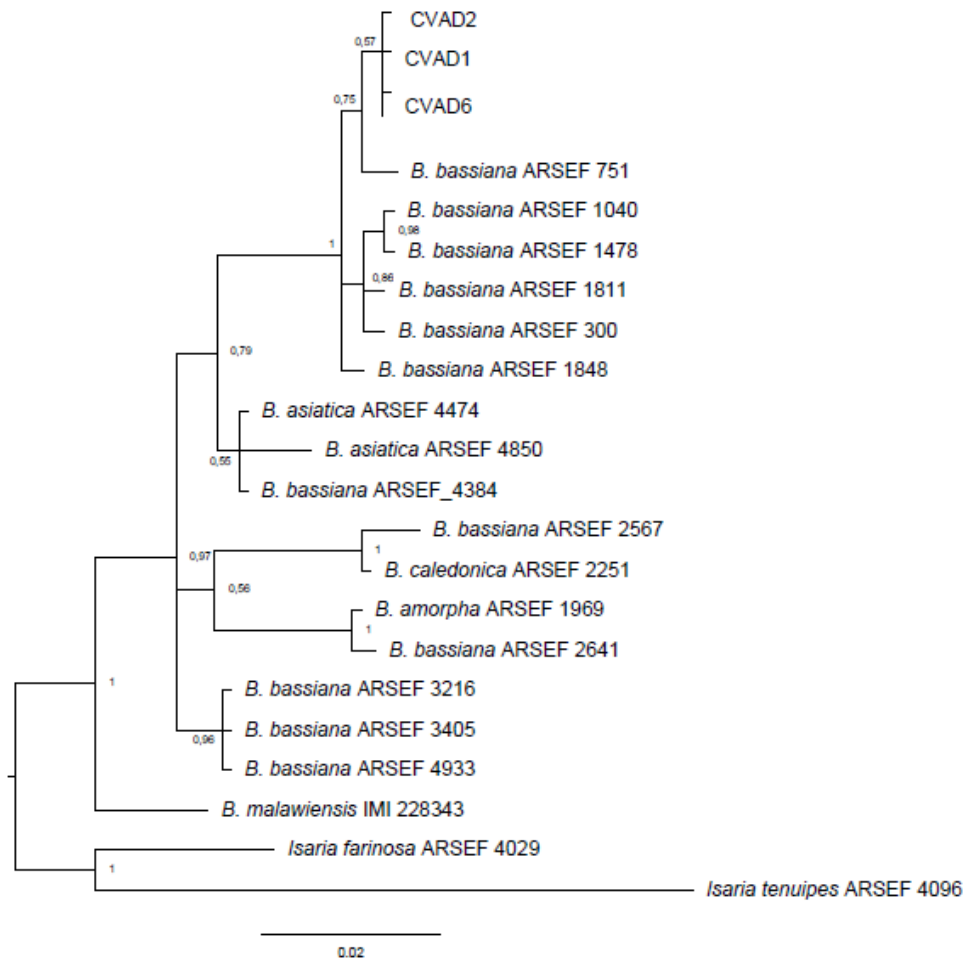
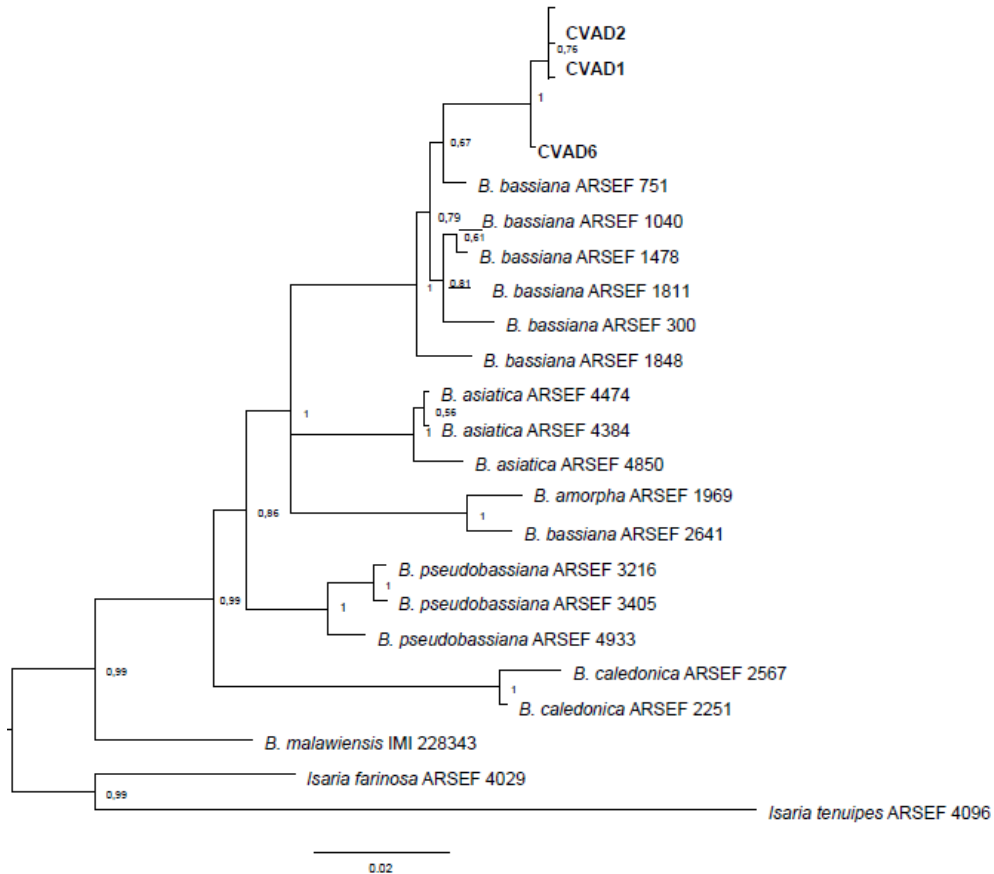


Figura 8: Árvore filogenética dos isolados dos isolados *Beauveria bassiana* através da análise Bayesiana da região intergênica TEF. Valores de probabilidade posteriores bayesianos $>0,82$ são indicados nos nós. *Metarhizium anisopliae* foi utilizado como grupo externo. Os isolados obtidos neste estudo estão respresedados por CVAD2, CVAD1 e CVD6. A barra de escala (0,05) representa substituições de nucleotídeos por sítioAs análises ocorreram por 10 milhões de gerações usando quatro cadeias e amostradas a cada 1.000 gerações, para um total de 10.000 árvores.usando MrBayes v. 3.2.3.



Figura 9: Árvore filogenética de inferência Bayesiana dos isolados *Beauveria bassiana* baseada em seqüências concatenadas dos genes *ITS* e *TEF*. Valores de probabilidade posteriores bayesianos $>0,55$ são indicados nos nós. *Isaria tenuipes* e *Isaria farinosa* foi utilizado como grupo externo. Os isolados obtidos neste estudo estão respresedados por CVAD2, CVAD1 e CVD6. A barra de escala (0,02) representa substituições de nucleotídeos por sítio. As análises ocorreram por 10 milhões de gerações usando quatro cadeias e amostradas a cada 1.000 gerações, para um total de 10.000 árvores.



4. CONCLUSÕES

- ✓ Os fungos entomopatogênicos nativos identificados neste estudo causaram alta patogenicidade e mortalidade para *R. palmarum* em relação as testemunhas;
- ✓ A análise morfológica clássica possibilitou a identificação dos isolados até o nível do gênero *Beauveria* spp;
- ✓ Análise filogenética para região *ITS* e *TEF* permitiram a delimitação para espécie *Beuaveria bassiana* (Hypocreales).

REFERÊNCIAS

- AHMED, R.; FREED, S. Virulence of *Beauveria bassiana* Balsamo to red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 31, n. 1, p. 1-4, 2021.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ALVES, S. B.; MORAES, S. A. Quantificação de inóculo de patógenos de insetos. **Controle Microbiano de Insetos**, v. 2, p. 765-778, 1998.
- BUSTAMANTE, D, E. et al. Phylogeny and species delimitations in the entomopathogenic genus *Beauveria* (Hypocreales, Ascomycota), including the description of *B. peruviansis* sp. **MycoKeys**, v. 58, p. 47, 2019.
- CASTLEBURY, L. A. et al. Multigene phylogeny reveals new lineage for *Stachybotrys chartarum*, the indoor air fungus. **Mycological research**, v. 108, n. 8, p. 864-872, 2004.
- CHEN, W. H. et al. *Beauveria majiangensis*, a new entomopathogenic fungus from Guizhou, China. **Phytotaxa**, v. 333, p. 243-250, 2018.
- DE HOOG G. S. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium*, *Paecylomicis* and *Acrodontium*. **Study in Mycology**. v.1, p. 1- 41, 1972.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, n. 4, p. 19-21, 1983.
- DOYLE, J.J; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

DUARTE, A. G. et al. Captura de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae) em armadilhas iscadas com o feromônio de agregação e compostos voláteis de frutos do abacaxi. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 25, n. 1, p. 81-84, 2003.

EDGAR, R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**, v. 5, n. 1, p. 1-19, 2004.

ELIAS, G. A.; SANTOS, R. Produtos Florestais Não Madeireiros e Valor Potencial de Exploração Sustentável da Floresta Atlântica no sul de Santa Catarina. **Ciência Florestal**. v. 26, n. 1, p. 235-248, 2016.

ELIAS, G. A. et al. Arecaceae: Análise bibliométrica das espécies nativas do estado de Santa Catarina. **Ciência e Natura**. v. 37, n. 1, p. 85-92, 2015.

EPPO. **European and Mediterranean Plant Protection Organization. Global Database**. 2020. Disponível em: <https://gd.eppo.int>. Acesso em: 21 fev. 2020.

FERNANDES, E. K. K. et al. An intensive search for promising fungal biological control agents of ticks, particularly *Rhipicephalus microplus*. **Veterinary Parasitology**. v. 182, p. 307-318, 2010.

FERREIRA, J. M. S.; ARAÚJO, R. P. C.; SARRO, F. B. Táticas de manejo das pragas. **Coco, fitossanidade**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p. 83-106, 2002.

FERREIRA, J. M. S.; ARAÚJO, R. P. C.; SARRO, F. B. Táticas de manejo das pragas. In: Ferreira, J. M. S. (Ed.). **Coco, fitossanidade**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p. 83, 2002.

FERREIRA, J. M. S.; WARWICK, D. R. N.; SIQUEIRA, L. A. (Ed.). **A Cultura do coqueiro no Brasil**. 2. ed. rev. e ampl. Brasília, DF: SPI; Aracaju: Embrapa – CPATC, 1998. p. 189-267.

FREELAND, J. R. et al. Genetic diversity and widespread haplotypes in a migratory dragonfly, the common green darner *Anax junius*. **Ecological Entomology**, v. 28, n. 4, p. 413-421, 2003.

GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, v. 10, p. 1-920, 2002.

GASMI, L. et al. Gene diversity explains variation in biological features of insect killing fungus, *Beauveria bassiana*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2021.

GHIKAS, D. V.; KOUVELIS, V. N.; TYPAS, M. A. Phylogenetic and biogeographic implications inferred by mitochondrial intergenic region analyses and ITS1-5.8 S-ITS2 of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *B. brongniartii*. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2010.

GOETTEL, M. S. et al. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents. p. 209-231. In: LAIRD, M.; LACEY, L. A.; DAVIDSON, W. (Eds.). **Safety of Microbial Insecticides**. CRC Press, Boca Raton, 1990.

GONZALEZ-GARCIA, M.T.; POSADA, F. J., BUSTILLO, P. A. E. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. **Cenicafé**. v. 44, n. 3, p. 93-102, 1993.

HUMBER R. **Entomopathogenic fungal identification**. USDA-ARS Plant Protection Research Unit; 2005.

IMOULAN, A. Entomopathogenic fungus *Beauveria*: Host specificity, ecology and significance of morpho-molecular characterization in accurate taxonomic classification. **Journal of Asia-Pacific Entomology**. v. 20, n. 4, p. 1204-1212, 2017.

IMOULAN, A. et al. *Beauveria medogensis* sp. nov., a new fungus of the entomopathogenic genus from China. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 139, p. 74-81, 2016.

KEPLER, R. M. et al. Phylogenetically-based nomenclature for Cordycipitaceae (Hypocreales). **IMA Fungus**. v. 8, n. 2, p. 335-353, 2017.

KINDERMANN, J. et al. Phylogeny of the Genus *Trichoderma* Based on sequence analysis of the internal transcribed spacer region 1 of the rDNA cluster. **Fungal Genetics and Biology**, v. 24, n. 3, p. 298-309, 1998.

KONEMAN, E. **Diagnóstico Microbiológico**. MEDSI, p. 996-1020, 2001.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LEON-MARTINEZ, G. A. Patogenicidad y autodiseminación de cepas promisorias de hongos entomopatógenos sobre *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Dryophthoridae). **Agron. Mesoamericana**, v. 30, n.3, pp.631-646, 2019.

LIU, H. Characterization of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates for management of tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). **Journal Invertebrate Pathology**. v. 82, n.1, p.139-147, 2003.

MCKINNON, A. C. et al. Detection of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the rhizosphere of wound-stressed *Zea mays* plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1161, 2018.

MEYLING, N.V. et al. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats. **Molecular Ecology**, v. 18, n. 6, p. 1282-1293, 2009.

MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de Fitopatologia**. Recife-PE; 2012.

MOURA, J. I. L. et al. Diferentes tipos de armadilhas de iscas no controle de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae). **Agrotrópica**. v. 2, n. 3, p. 165-169, 1990.

POSADA, D.; BUCKLEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic Biology**, v. 53, n. 5, p. 793-808, 2004.

RANNALA, B.; YANG, Z. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **Journal of Molecular Evolution**, v. 43, n. 3, p. 304-311, 1996.

REHNER, S. A. et al. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v. 103, p. 1055-1073, 2011.

ROCHAT, D. et al. Male-produced aggregation pheromone of the American palm weevil, *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae), collection, identification, electrophysiological activity and laboratory bioassay. **Journal of Chemical Ecology**. v. 17. n. 11. p. 2127-41, 1991.

RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539-542, 2012.

SANJUAN, T. Entomopathogens of Amazonian stick insects and locusts are members of the *Beauveria* species complex (*Cordyceps* sensu stricto). **Mycologia**, v. 106, n. 2, p. 260-275, 2014.

SCHOCH C. L. et al. Consorcio de códigos de barras para hongos. Región del espaciador transcrito interno (ITS) del ribosoma nuclear como marcador universal de código de barras de ADN para hongos. **Actas de la Academia Nacional de Ciencias**. v. 109, p. 6241-6246, 2012.

SERNA-DOMÍNGUEZ, M.G. et al. High genetic diversity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in Colima, Mexico. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 163, p. 67-74, 2019.

SHAHINA, F. et al. Rearing of *Rhynchophorus ferrugineus* in laboratory and field conditions for Malik: Efficacy of *Bacillus thuringiensis* and *Beauveria bassiana* against red palm weevil

carrying out various efficacy studies using EPNs. **Pakistan Journal of Nematology**, v. 27, p. 219-228, 2009.

TAKADA, H. M. et al. Flutuação populacional de *Rhynchophorus palmarum* no município de São Bento do Sapucaí. **O Biológico**. v. 73, p. 45-51, 2011.

TEIXEIRA, R. A.; FARIA, M. **Pequeno manual sobre fungos entomopatogênicos**. Planaltina (DF), Embrapa Cerrados, p. 26-31, 2010.

VALERO-JIMÉNEZ, C. A. et al. Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 133, p. 41-49, 2016.

VARELA, A.; MORALES, E. Characterization of Some *Beauveria bassiana* Isolates and Their Virulence toward the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 67, n. 2, p. 147-152, 1996.

WAKIL, W., YASIN, M.; SHAPIRO-ILAN, D. Effects of single and combined applications of entomopathogenic fungi and nematodes against *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier). **Scientific Reports**. v. 7, n.1, p. 59-71, 2017.

WANG, C.; WANG, S. Insect Pathogenic Fungi: Genomics. **Molecular Interactions and Genetic Improvements**, v.62, p.73-90, 2017.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

YASIN, M. Virulence of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier). **Entomological Research**, v. 49, p. 3-12. 2017.

CONCLUSÕES FINAIS

- ✓ O levantamento bibliográfico realizado nesta pesquisa possibilitou mapear e nortear a busca de novos métodos de manejo para o controle de *R. palmarum* e *R. ferrugnieus*;
- ✓ A extração de compostos orgânicos voláteis de fungos entomopatogênicos nativos por meio de aeração é uma técnica que deve ser realizada de maneira correta para que se obtenha o máximo rendimento;
- ✓ As análises cromatográficas obtidas das amostras dos extratos CVAD01 e CVAD02 permitiram a caracterização de dois álcoois, três hidrocarbonetos aromáticos, dois monoterpênicos, três cetonas e três hidrocarbonetos lineares, sendo necessário continuar com estudos mais específicos em relação ao comportamento de atração e/ou repelência dos gorgulhos da palma, tanto para a escolha dos sistemas de controle ideais para esses insetos;
- ✓ A identificação morfológica dos isolados denominados CVAD01, CVAD02 e CVAD06 confirmou as características para o gênero *Beauveria* sp.
- ✓ A extração e a obtenção de DNA dos fungos entomopatogênicos nativos permitiram análises moleculares dos isolados *Beauveria* sp. CVAD01/CVAD02/CVAD06 de boa qualidade, integridade, pureza e adequado para amplificação, obtendo resultados satisfatórios nas análises das sequências.
- ✓ As análises filogenéticas agruparam os isolados nativos para o grupo entre as espécies de *Beauveria bassiana*.
- ✓ Os isolados nativos de fungos entomopatogênicos nativos em relação ao primeiro experimento apresentaram uma mortalidade crescente de 70 a 100% para o 14º ao 21º dia avaliação apresentaram. No segundo e no terceiro experimento, baixo as mesmas condições de bioensaio e com uma multiplicação prévia de todos os isolados em adultos de *R. palmarum*, para reativar a virulência, confirmaram que os isolados nativos *Beauveria* sp. CVAD01, CVAD02 e CVAD06, possuem uma alta patogenicidade no controle de adultos de *R. palmarum*, que os qualifica como um potencial controle biológico para desenvolver testes futuros em estufa e aplicação em campo, para o controle da broca-do-olho do coqueiro na região costeira do Estado de Alagoas.