

Identificação e avaliação do feromônio
sexual de *Helicoverpa armigera* e
atração cruzada entre espécies de
Noctuidae representativas do Brasil



***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento***

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
336**

**Identificação e avaliação do feromônio
sexual de *Helicoverpa armigera* e
atração cruzada entre espécies de
Noctuidae representativas do Brasil**

*Miguel Borges
Mirian Fernandes Furtado Michereff
Raul Alberto Laumann
Maria Carolina Blassioli-Moraes
Diego Martins Magalhães
Silvana Vieira de Paula-Morais
Alexandre Specht*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Parque Estação Biológica
PqEB, Av. W5 Norte (final)
70970-717, Brasília, DF
Fone: +55 (61) 3448-4700
Fax: +55 (61) 3340-3624
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Marília Lobo Burle

Secretário-Executivo
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Membros
Antonieta Nassif Salomão; Diva Maria Alencar Dusi; Francisco Guilherme V. Schmidt; João Batista Teixeira; João Batista Tavares da Silva Maria Cléria Valadares Inglis; Tânia da Silveira Agostini Costa

Supervisão editorial
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Revisão de texto
Marina Rito

Normalização bibliográfica
Ana Flávia do N. Dias Côrtes

Tratamento das ilustrações
Adilson Werneck

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Adilson Werneck

Foto da capa
Fabiano Bastos-CPAC

1ª edição

1ª impressão (ano): tiragem

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Identificação e avaliação do feromônio sexual de *Helicoverpa armigera* e atração cruzada entre espécies de Noctuidae representativas do Brasil. / Miguel Borges [et al.] – Brasília, DF : Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2018.

18 p. (Boletim de pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 336)

1. Agrotóxico. 2. Controle de praga. 3. Manejo Integrado. I. Borges, Miguel. II. Michereff, Mirian Fernandes Furtado. III. Laumann, Raul Alberto. IV. Blassioli-Moraes, Maria Carolina. V. Magalhães, Diego Martins. VI. Paula-Moraes, Silvana Vieira. VII. Specht, Alexandre. VIII. Título.

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução.....	9
Material e Métodos	11
Resultados e Discussão	17
Conclusões.....	24
Referências	25

Identificação e avaliação do feromônio sexual de *Helicoverpa armigera* e atração cruzada entre espécies de Noctuidae representativas do Brasil

Miguel Borges¹

Mirian Fernandes Furtado Michereff²

Raul Alberto Laumann³

Maria Carolina Blassioli-Moraes⁴

Diego Martins Magalhães⁵

Silvana Vieira de Paula-Morais⁶

Alexandre Specht⁷

Resumo – O uso de agrotóxicos para o controle de pragas agrícolas em áreas de agricultura intensiva no Brasil, vem aumentando ano a ano. A partir do ano de 2012, observaram-se populações de *Helicoverpa armigera* em altas densidade e em diferentes culturas do país, devido à falta de métodos eficientes e sustentáveis para o seu controle. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento autorizou a utilização de agrotóxicos até então não permitidos no país, apenas para o controle dessa espécie invasiva, e paralelamente determinaram-se uma série de ações de pesquisa para desenvolver um programa de manejo integrado que incluía métodos com menor impacto. Um método de manejo que tem potencial de minimizar o uso indiscriminado de agrotóxicos é a utilização dos feromônios sexuais para o monitoramento de pragas agrícolas no campo. Os feromônios sexuais são altamente especi-

¹ Biólogo, PhD, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Bióloga, Doutora, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Biólogo, Doutor, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Química, PhD, pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁵ Biólogo, Doutor, bolsista da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁶ Pesquisadora, West Florida Research and Education Center – WFREC, University of Florida

⁷ Biólogo, Doutor, pesquisador da Embrapa Cerrados

ficos, não atingem organismos não alvo, como os inimigos naturais, e tem alta sensibilidade para detecção de mariposas. Tais características permitem que o agricultor identifique infestações iniciais da praga no campo e possa tomar decisões de medidas de controle antes que a praga se estabeleça. O objetivo deste trabalho foi identificar o feromônio sexual de uma população de *H. armigera* coletada em campos de soja e algodão na região de São Desidério no oeste da Bahia e avaliar a eficiência do feromônio comercial na sua atração. Extratos de glândulas de *H. armigera* foram analisados por cromatografia gasosa com o detector de ionização de chamas (CG-DIC), cromatografia gasosa com detector de espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia gasosa acoplado a um detector de eletroantografia (CG-DEA). A ação dos compostos encontrados nas glândulas foi avaliada através de bioensaios em túnel de vento e eletrofisiologia. Experimentos de campo para avaliar o feromônio comercial e o indentificado na população de São Desiderio foram conduzidos em campo de algodão no estado da Bahia. Foram avaliados os seguintes tratamentos: (1) feromônio comercial de *H. armigera*; (2) septo preparado com os compostos identificados pelo grupo da Embrapa, contendo (9Z)-hexadecenal, (Z9-16:O), (Z11)-hexadecenal (Z11-16:O) e hexadecanal (16:O); (3) septo preparado com Z9-16:O e Z11-16:O; (4) duas fêmeas de *H. armigera*; e (5) septo controle com pentano. Três compostos foram identificados na glândula de fêmeas de *H. armigera*, sendo eles o Z9-16:O, o Z11-16:O e o 16:O, mas somente os dois primeiros aldeídos mostraram atração e induziram a resposta nas antenas de machos de *H. armigera* (CG-DEA). Nos bioensaios em túnel de vento, os machos confirmaram a resposta eletroantográfica, 38% respondeu para a mistura sintética contendo os dois aldeídos insaturados Z9-16:O e Z11-16:O (0.03:97). No entanto, quando se adicionou o aldeído saturado, nenhum inseto pousou na fonte de odor. O experimento de campo, mostrou que a mistura do feromônio comercial é atrativa para *H. armigera*. Atração cruzada interespecífica foi detectada durante o estudo e as misturas sintéticas não comerciais capturaram além de *H. armigera*, *Spodoptera frugiperda* e *Elaphria agrotina*. Esta atração cruzada, pode ser explicada devido a alguns dos compostos da mistura feromonal serem comuns entre diferentes espécies, embora em proporções distintas.

Termos para indexação: Iscas com feromônio, Agrotóxico, Controle de praga, Manejo Integrado, Cultura do algodão, *Spodoptera frugiperda*, *Elaphria agrotina*

Identification and evaluation of the *Helicoverpa armigera* sex-pheromone and cross attraction among Noctuidae representatives in Brazil

Abstract – The use of pesticides in large crops areas in Brazil to control agricultural pests has been increasing in the last years (Carneiro et al., 2015). Recently, there was a significant outbreak of *Helicoverpa armigera* in different crops, and due to the lack of efficient and sustainable methods of pest control, the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply authorised the use of pesticides, which were previously banned in Brazil, to control this pest. A management method that has the potential to minimise the indiscriminate use of insecticide is based on sex-pheromones from control and monitoring moths. Sex pheromones are highly specific, do not impact non-target organisms, as natural enemies, and have high sensitivity for moth detection. Sex-pheromone-baited traps allow the farmer to identify the location of the pest in the field at the beginning of the infestation, and thus to make control measures decisions before the pest is established. Therefore, the objective of this work was to identify the sex-pheromone of a *H. armigera* population collected in soybean and cotton fields in the São Desiderio – Bahia, Brazil, and to evaluate the efficiency of the commercial pheromone in its attraction. *H. armigera* gland extracts were analysed by gas chromatography with the flame ionization detector (GC-DIC), gas chromatography with mass spectrometry detector (GC-MS) and gas chromatography coupled to an electroantennography detector (GC-EAD). The role of the compounds identified in the females glands extracts was evaluated through wind tunnel bioassays and electrophysiology. Field experiments to evaluate the commercial and identified pheromone in the population of São Desiderio were conducted in a cotton field in Bahia. The following treatments were evaluated: (1) *H. armigera* commercial pheromone; (2) lure prepared with the compounds identified in this study (9Z)-hexadecenal, (Z9-16:O), (11Z)-hexadecenal (Z11-16:O) and hexadecanal (16:O); (3) lure with Z9-16:O and Z11-16:O; (4) two females of *H. armigera* and (5) septa impregnated with pentane as control. Two out of the three components were identified from samples extracts of *H. armigera* glands from São Desidério

– Bahia population: Z9-16:O, Z11-16:O and 16:O. Only the first two aldehydes induced male antenna response on GC-EAD experiments. Wind tunnel bioassays with *H. armigera* males corroborated the GC-EAD response, 38% of males responded to a synthetic mixture containing Z9-16:O and Z11-16:O (0.03:97). When the minor component C16:O was added to the blend, no insect landed on the odour source during the wind tunnel bioassays. The field experiment showed that the commercial pheromone evaluated is attractive for *H. armigera* males. The non-commercial synthetic mixtures trapped *H. armigera* and two other moths, *Spodoptera frugiperda* and *Elaphria agrotina*. *Cross-attraction is common when different species use the same compounds in their pheromone blend, as reported here*

Key words: pheromone-baited traps, cotton crops, *Spodoptera frugiperda*, *Elaphria agrotina*

Introdução

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) era listada como praga quarentenária no Brasil até sua presença ser registrada entre os meses de janeiro e fevereiro de 2012 no estado de Goiás em cultivos de soja, no estado do Mato Grosso em cultivos de algodão e no estado da Bahia em tiguera (plantas que nascem espontaneamente) de soja (Embrapa 2013, Czepak, et al., 2013). Sua introdução ocorreu há pelo menos cinco anos antes do surto de *H. armigera* que foi reportado em várias regiões do Brasil na safra de 2013-2014 (Sosa-Gomes 2016). Na Bahia, na safra de algodão de 2012-2013 os agricultores relataram perdas de até 80% da produção. Na tentativa de minimizar as perdas provocados por esta praga, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autorizou a EMBRAPA, em regime emergencial, a liberação de vários produtos químicos (agrotóxicos) para uso, sendo que os princípios ativos liberados incluíram: flubendiamida, zeta-cipermetrina, bifentrina, carbonosulfano e espinosade (Portaria do MAPA 1.109, de 06 de novembro de 2013). Adicionalmente ao uso de agrotóxicos, o MAPA induziu a ação de estudos para o desenvolvimento do MIP para a praga. Uma ferramenta para o manejo e controle de mariposas que vem sendo aplicado com sucesso em diferentes sistemas agrícolas é o uso dos feromônios sexuais (Witzgall, 2010). Uma vantagem do uso dos feromônios é que podem ser aplicados em campo associados a diferentes tecnologias, além de serem compatíveis com outras práticas de manejo integrado de pragas. Os feromônios podem ser usados para monitoramento em duas situações: para determinar a presença de insetos numa determinada área ou para estimar as densidades populacionais e níveis de dano (Borges et al., 2011). As vantagens de usar os feromônios para o monitoramento incluem menores custos, facilidade de uso, não são tóxicos, não deixam resíduos no meio ambiente, são específicos e agem somente sobre a espécie alvo, sendo usados em doses baixas (nanogramas a poucos miligramas) e têm alta sensibilidade de detecção. Outra técnica de aplicação dos feromônios sexuais para o manejo de mariposas é a confusão sexual, onde uma grande quantidade de feromônio sintético é distribuída no campo de forma a obter uma concentração homogênea de feromônio, interferindo nos gradientes naturais produzidos pelos insetos emissores. Desta forma, os insetos que seguem os rastros ficam confusos e não conseguem localizar os parceiros, portanto não acasalam e

a densidade populacional se mantém abaixo do nível de dano econômico. Outro método bastante disseminado para o controle de mariposas é a captura massal, na qual se aplica o feromônio sexual como um atrativo em armadilhas desenhadas para a captura de um grande número de insetos.

O feromônio sexual de *H. armigera* foi identificado em populações de diferentes origens geográficas e consiste de uma mistura de dois aldeídos (Z)-9-hexadecenal e (Z)-11-hexadecenal (Kevdaras et al.; 2007, Tamahankar et al.; 2003, Anju et al.; 2004 e Zhang et al.; 2012). Os trabalhos mostraram que as misturas feromonais de diferentes populações podem apresentar variações nas proporções desses dois componentes. As diferenças nas proporções dos componentes feromonais são importantes porque podem conduzir ao isolamento reprodutivo, uma vez que os indivíduos de uma determinada população podem não reconhecer a mistura feromonal de outras populações. As formulações comerciais devem levar em consideração essas diferenças na composição natural do feromônio. O feromônio sexual de *H. armigera* produzido comercialmente já é usado rotineiramente para monitoramento e confusão sexual dessa praga em países como Austrália, China e Índia (Kevdaras et al.; 2007, Tamahankar et al.; 2003, Anju et al.; 2004 e Zhang et al.; 2012). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar, em laboratório e campo, a mistura feromonal de *H. armigera* comercializada no Brasil e comparar sua composição com a do feromônio sexual isolado das glândulas de indivíduos coletados de populações brasileiras de *H. armigera*.

Material e Métodos

Criação de *Helicoverpa armigera*

Uma criação de *H. armigera* foi estabelecida na Embrapa Cerrados a partir de adultos e larvas coletados na cultura do algodão em São Desidério, BA (12°39'46.1"S, 45°30'33.7"W). Pupas de *H. armigera* foram separadas por sexo e colocadas em recipientes de plástico de 3 L. Após a emergência dos adultos, machos e fêmeas foram mantidos em recipientes separados, em sala climatizada (Lab-Line, Mellrose Park, Ill, USA) com fotoperíodo invertido de 12 h de luz e 12 h de escuro, a temperatura de 25°C e umidade relativa de 65%.

Extração do feromônio sexual

Para obter o feromônio sexual, mariposas fêmeas virgens com 2 - 4 dias, quando em posição de chamamento (período em que expõe a glândula de feromônio), tiveram o abdômen gentilmente pressionado para permitir a extrusão total da glândula abdominal, a qual foi excisada com uma tesoura de dissecação (modelo 15003-08, FST, Vancouver, CO, Canadá). Cinco a 12 glândulas, foram colocadas em recipientes de vidro cônico de 500 µL contendo 100 µL de hexano e mantidas por 20 min para a extração dos compostos presentes nas mesmas. Os extratos obtidos foram filtrados usando uma pipeta Pasteur contendo lã de vidro para remoção de resíduos sólidos. Os extratos (N = 20) foram concentrados a 50 µL sobre fluxo de N₂ e armazenados a -20°C.

Análise química dos extratos da glândula abdominal

Os extratos das glândulas foram analisados por cromatografia gasosa (CG) (Agilent 7890, coluna DB-5, 60 m x 0,32 mm ID, 1,0 µm filme, Supelco, Bellefonte, PA, EUA), com a coluna mantida a 50°C por 2 min, a temperatura programada para aumentar 5°C min⁻¹ até atingir 180°C, a qual foi mantida por 0,1 min, seguida por um aumento gradual de 10°C min⁻¹ até atingir 250°C por 20 min. O efluente da coluna foi analisado com o detector de ionização de chamas (DIC) a 270°C. Um microlitro de cada amostra foi injetado usando o

injetor no modo splitless, com hélio como gás de arraste. As amostras, também foram injetadas no CG-DIC em uma coluna polar DB-WAX, nas mesmas condições descritas acima, para calcular o índice de retenção e auxiliar na identificação química dos compostos. Os dados foram coletados e analisados com o software EZChrom Elite (Agilent, EUA). Para a identificação dos compostos, os extratos das glândulas foram selecionados e injetados no cromatógrafo gasoso com detector de espectrometria de massas (Agilent 5975C) com analisador quadrupolar, equipado com uma coluna apolar DB-5MS (30 x 0,25 mm ID, 0,25 µm de filme, Supelco, Bellefonte, PA, EUA) e com uma coluna polar DB-WAX (30 x 0,25 mm ID, 0,25 µm de filme, Supelco, Bellefonte, PA, EUA) e um injetor splitless, com hélio como gás de arraste. A ionização foi por impacto por elétrons (70 eV, temperatura da fonte 200°C) e os dados foram coletados e analisados no software ChemStation 2.01.4 (Agilent, EUA). As identificações foram confirmadas pela comparação do espectro de padrão de fragmentação de cada composto com espectros de massas da biblioteca NIST e Wiley (2008), com dados publicados na literatura, através do índice de retenção usando dados publicados (Pherobase e NIST Chemistry Web Book) e através da análise de padrões autênticos por coinjeção na coluna DB-5MS. Os padrões de (Z9)-9-hexadecenal (Z9-16:O), (Z11)-11-hexadecenal (Z11-16:O) e hexadecanal (16:O) foram adquiridos da Beudokian Pheromone (EUA).

Eletoantenografia com antenas de machos de *H. armigera*

A cromatografia gasosa acoplada a um equipamento de eletroantenografia (CG-DEA) foi usada para determinar quais compostos nos extratos das glândulas abdominais das fêmeas induzem a resposta eletrofisiológica dos receptores nas antenas. O sistema usado, consistiu de um CG-DIC Perkin Elmer Autosystem XL GC (NY, EUA) acoplado a um detector de eletroantenografia (Syntech, Inc., Hilversum, Holanda). No sistema, o fluxo da coluna cromatográfica foi dividido para o detector de ionização de chamas e para o detector de eletroantenografia. Para que o fluxo da coluna, após a divisão, chegasse sincronizado nos dois detectores, utilizou-se um make-up gás (nitrogênio ou hélio) (Figura 1). As análises foram conduzidas em uma coluna apolar DB-5 (30 m X 0,25 mm ID, 0,25 µm de filme, J&W Scientific, Folsom, CA, EUA), e injetor no modo splitless com hélio como gás de arraste (1 mL min⁻¹). A temperatura da coluna foi programada a 50°C (2 min), então aquecida até 250°C numa taxa de 15°C min⁻¹ e mantida nesta temperatura por

10 min. A temperatura do efluente do DEA foi mantida a 195°C. A antena do macho foi removida usando uma tesoura de dissecação (modelo 15003-08, FST, Vancouver, CO, Canadá) e imediatamente colocada sobre dois eletrodos de aço inoxidável. A conexão elétrica foi obtida através de um gel condutor. Os eletrodos foram conectados a um conversor de sinal (autospike interface-Syntech) AC/DC e amplificador IDAC-2 (Syntech, Inc., Holanda). As antenas, foram mantidas sobre um fluxo de ar umidificado (1 L min⁻¹) com um controlador de fluxo CS-55 (Syntech, Inc., Holanda). Antenas de machos de *H. armigera* foram avaliadas com o extrato das glândulas de fêmeas (N = 5) e soluções sintéticas contendo os compostos feromonais. Somente picos que mostraram as depolarizações e polarizações em 80% das análises foram considerados como resposta da antena.

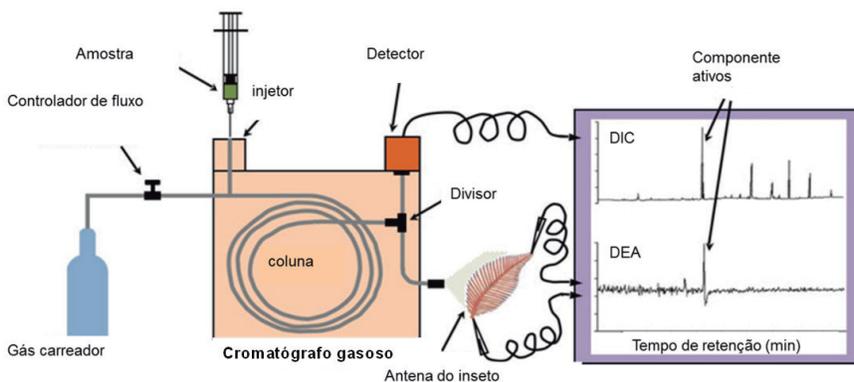


Figura 1- Desenho esquemático ilustrando o forno de GC-DIC com a coluna cromatográfica e a divisão do fluxo da coluna para o DIC e o detector de eletroantenoграфия (DEA). (Retirado e traduzido de Bradbury JW, Vehrencamp SL. Principles of animal communication 2011).

Bioensaios em túnel de vento

Os bioensaios comportamentais foram conduzidos em um túnel de vento com 1,5 x 0,5 x 0,5 m (C x L x A) (Figura 1) e fluxo de ar em 0,5 ms⁻¹. Foram usados como tratamentos fêmeas virgens em posição de chamamento ou soluções sintéticas contendo o feromônio sexual. No caso das soluções sintéticas, uma alíquota de 10 µL de cada solução foi adicionada a uma tira de papel de filtro (1,5 cm x 0,5 cm) (Whatman No 1), a qual foi colocada dentro de uma gaiola de metal. A gaiola foi suspensa em um suporte a 15 cm acima do piso do túnel de vento. Os machos foram liberados individualmente e antes de iniciar o experimento foram colocados por 5 min dentro do túnel de vento para aclimatação. O comportamento do macho foi observado e considerou-se resposta comportamental os indivíduos que se deslocaram em direção à fonte de odor através das três áreas do túnel de vento (áreas 1, 2 e 3) (Figura 2). Para estabelecer o melhor horário de resposta dos machos, foi conduzido um experimento inicial com fêmeas de *H. armigera* em chamamento. As fêmeas foram presas em uma gaiola de metal com malha de 10 mm e colocadas no final da área 3 do túnel de vento. Considerou-se como machos responsivos aqueles que mostraram voo direcionado para a gaiola e que pousavam na gaiola na área 3. A atração dos machos também foi avaliada em relação aos componentes principais do feromônio sexual da espécie em diferentes proporções, sendo os tratamentos: Z9-16:O + Z11-16:O (0,07:9,7 µg); Z9-16:O + Z11-16:O (1 : 9 µg), Z9-16:O + Z11-16:O +16:O (0,3 :8,7:1 µg), e para 16:O. A escolha das diferentes proporções avaliadas foi baseada na mistura identificada na população brasileira obtida neste trabalho e em proporções relatadas previamente para outras populações (Tabela 1). Todos os bioensaios foram conduzidos em condições de escuridão para qual os insetos foram mantidos em fotoperíodo invertido, com fotofase entre 21 h e 9 h, obtida com o auxílio de 4 lâmpadas de 14 W (Twister, Taschibra Indaial, SC, Brasil), sob temperatura de 27°C e 65% UR. Para cada tratamento, foram conduzidas 30 repetições e os machos foram usados somente uma vez. Todos os bioensaios foram realizados entre 6 a 9 h após o início da escotofase (fase de escuro do fotoperíodo).

Tabela 1 Proporção entre os componentes presentes em glândulas de fêmeas de *Helicoverpa armigera* de populações de diferentes países, da população de São Desidério, BA (identificada neste trabalho) e a do feromônio comercializado no Brasil .

Localidades	Proporção dos componentes do feromônio de <i>Helicoverpa armigera</i>				Referências
	Z9-16:O	Z11-16:O	Z11-14:O	16:O	
Israel	0,3	9,7	-	-	Kehat et al., 1980
China	0,3	9,7	-	Melhora a atratividade	Zhang et al., (2012) and Deny et al., 2004
Índia	0,4	9,6	-	Não tem efeito	Tamahankar et al., 2003, and Anju et al., 2004
Brasil (Bahia)	0,3	8,65	-	1,05	Este trabalho
Austrália	1,0	9,0	-	-	Kevdaras et al., 2007
Rússia	0	3	1	-	Konyukhov, et al 1978
Feromônio comercial Biocontrole	0,03	9,7	-	-	Este trabalho

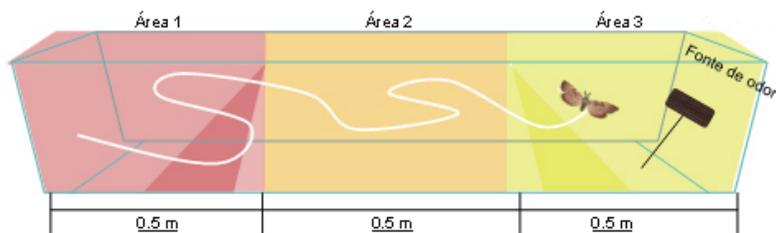


Figura 2. Desenho esquemático do túnel de vento utilizado para avaliar a resposta de machos de *Helicoverpa armigera* aos diferentes odores analisados.

Experimento de campo

O experimento foi conduzido em campo de algodão no estágio vegetativo, na fazenda Santana em São Desidério, BA ($12^{\circ}39'46.1''S, 45^{\circ}30'33.7''W$) no período de junho a julho de 2016. Cada tratamento foi colocado dentro de armadilhas tipo "Delta Traps" (AR905-Plastic Delta traps, Isca Tecnologia, Ijuí, RS, Brasil) que foram distribuídas em um desenho aleatorizado dentro de quatro blocos e separadas por 100 m, em uma cultura de algodão cultivada sobre pivot. As armadilhas foram monitoradas uma vez por semana e tiveram os liners removidos, acondicionados em coolers e levados para o laboratório para a identificação. A duração total do experimento foi de 30 dias. Quatro tratamentos ($N = 5/\text{tratamento}$) foram avaliados: (T1) septo impregnado com 1 mg Z9-16:O, Z11-16:O, 16:O na proporção de 0,02: 9,0: 0,08; (T2) septo contendo Z9-16:O e Z11-16:O (0,03:0,97); (T3) Bioarmigera, feromônio comercial (Biocontrole, São Paulo, SP, Brasil); e (T4) controle, septo impregnado com solvente pentano.

Análise estatística

As análises estatísticas foram conduzidas no software R 3.0.1 (R Development Core Team, 2007). Os dados do túnel de vento foram analisados usando MLG (modelos lineares generalizados) com distribuição binomial. A proporção e o intervalo de confiança (95%) dos insetos responsivos a cada tratamento foi calculada a partir dos parâmetros do MLG. O número total de machos de cada espécie capturados nas armadilhas nos experimentos de campo foi analisado com MLG com distribuição de erros de Poisson. As análises foram realizadas para cada espécie capturada por separado, considerando como fatores fixos o bloco, os tratamentos e o sexo. Quando foram identificados efeitos significativos dos tratamentos, o número médio de insetos/armadilha em cada tratamento foi comparado utilizando análise de contrastes.

Resultados e Discussão

Análises químicas

A análise química das glândulas de fêmeas de uma população de *H. armigera* coletada na Bahia, mostrou a presença de três compostos que são típicos da família Noctuidae: (Z9)-9-hexadecenal, (Z11)-11-hexadecenal e hexadecanal (Figura 3). A proporção média entre os componentes foi calculada em 0,3: 8,63:1,05 (N=12 extratos), muito similar com o que já foi descrito na literatura para outras populações da espécie (Figura 4, Tabela1).

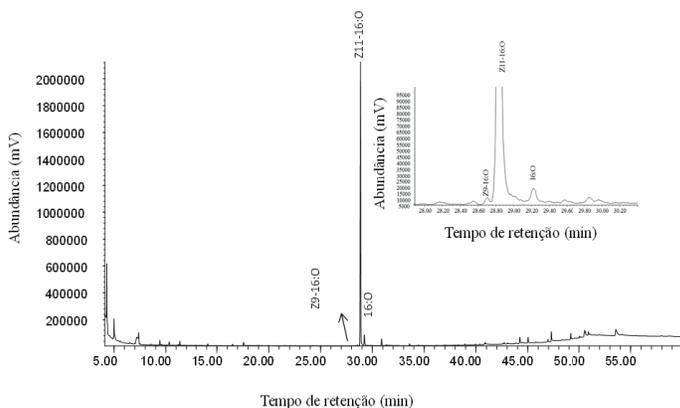


Figura 3. A. Perfil cromatográfico do extrato de 4 glândulas de fêmeas de *Helicoverpa armigera* de uma população do sul da Bahia. B. Detalhe da região entre o tempo de retenção 28 e 30 min.

Os picos no final do cromatograma, correspondem a compostos precursores do feromônio, tais como ácidos graxos de cadeia longa, com 18 a 20 carbonos, e que não têm função de feromônio sexual.

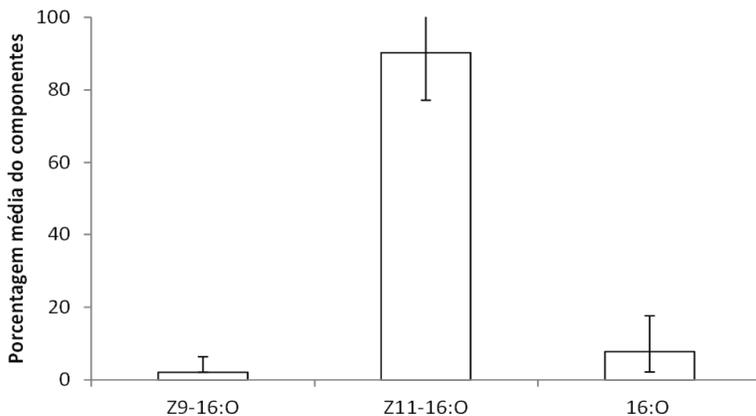


Figura 4. Porcentagem média e respectivo desvio padrão dos componentes feromonais de *Helicoverpa armigera*. (N=12).

A identidade dos três componentes encontrados nas glândulas de fêmeas de *H. armigera* foi confirmada através da coinjeção em coluna polar (DB-WAX) e apolar (DB-5) com padrões autênticos (Figura 5 A e B).

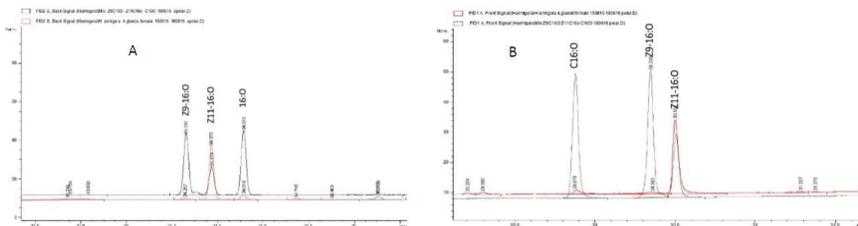


Figure 5. Perfil cromatográfico da mistura sintética (linha preta) coeluinto com os componentes presentes no extrato de glândulas de fêmeas de *Helicoverpa armigera* (linha vermelha). A Injeção em coluna apolar (DB-5) e B injeção em coluna polar (DB-WAX).

O perfil de fragmentação obtido no espectrômetro de massas para os três componentes confirmou a identificação quando comparado com o perfil de fragmentação de padrões sintéticos adquiridos comercialmente (Figura 6).

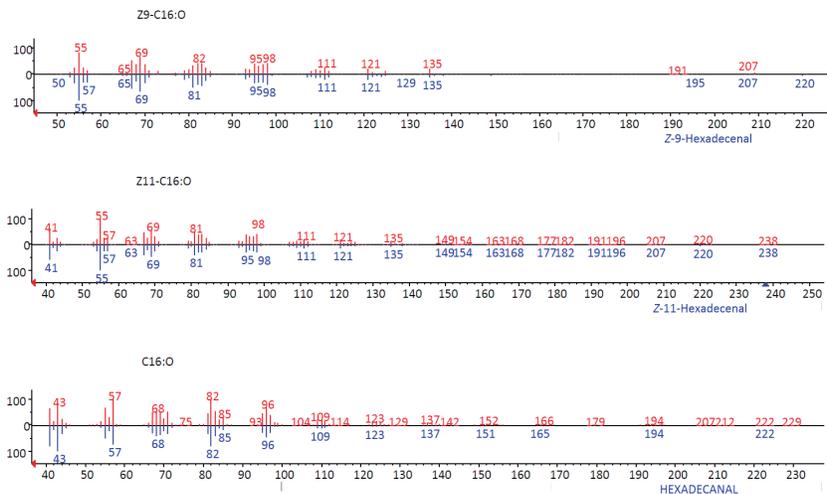


Figura 6. Espectro de massas dos compostos Z9-16:O, Z11-16:O e 16:O. Em azul o espectro de massas do padrão e em vermelho o espectro de massas do componente extraído das glândulas de fêmeas de *Helicoverpa armigera* da população de São Desidério, BA.

Estudos eletrofisiológicos

Os estudos por GC-DEA, mostraram que a antena de machos de *H. armigera* responde somente para os componentes Z9-16:O e Z11-16:O e que a resposta é dose dependente. Quando as antenas foram testadas com os extrato natural de glândulas de fêmeas, não se observou resposta para o composto Z9-16:O (Figura 7A) e para a mistura sintética com os componentes na mesma proporção produzida pela glândula (Figura 7B). No entanto, quando testou-se uma mistura sintética usando os componentes em quantidades próximas entre si, a antena respondeu aos dois compostos, Z9-16:O e Z11-16:O (Figura 7C).

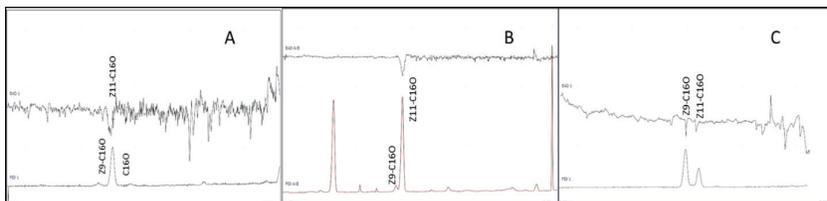


Figura 7. Resposta de antenas de machos de *Helicoverpa armigera* no CG-DEA. A. extrato de glândulas abdominais contendo três os componentes, Z9-16:O, Z11-16:O e C16:O, naturalmente produzidos por fêmeas da população de São Desidério, BA. B. Solução sintética contendo Z9-16:O e Z11-16:O na proporção em que o inseto produz. C. Mistura sintética contendo Z9-16:O e Z11-16:O em proporções similares.

Estudos comportamentais

Os machos de *H. armigera* responderam para as fêmeas em chamamento no túnel de vento preferencialmente no período da tarde, entre 15:00 e 18:30 (6 a 9 h após o início da fotofase) (Figura 8 A e B). Assim, todos os bioensaios com as misturas sintéticas foram conduzidas neste horário.

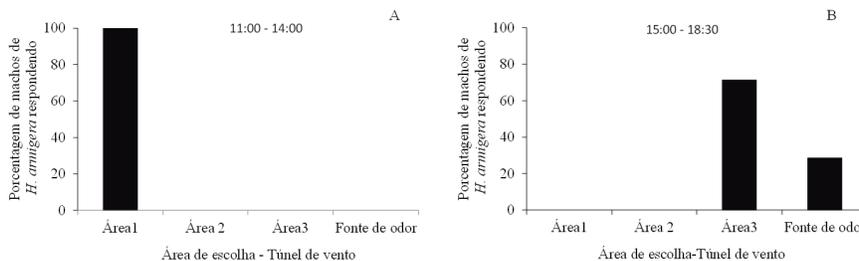


Figura 8. Resposta de machos em túnel de vento às fêmeas de *Helicoverpa armigera* em dois períodos diferentes. A. 11:00 às 14:00 e B. 15:00 às 18:30

Quando avaliada a resposta dos machos para uma mistura sintética contendo dois componentes do feromônio sexual (Z9-16:O e Z11-16:O, 97:0.3), 38% dos indivíduos pousaram na fonte de odor (Figura 9A). O mesmo foi observado quando avaliou-se a resposta comportamental de machos de *H. armigera* para os voláteis emitidos de uma formulação comercial, 39% dos indivíduos avaliados pousaram na fonte de odor (Figura 9B).

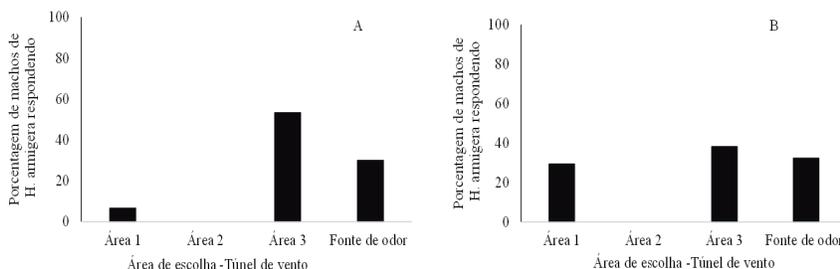


Figura 9. Resposta de machos de *Helicoverpa armigera* em túnel de vento no período das 15:00 às 18:30. A. Mistura sintética contendo os compostos (Z9-16:O e Z11-16:O (0.03:97). B. Mistura comercial contendo os compostos Z9-16:O e Z11-16:O (0.03:97).

Ao avaliar uma solução com os dois compostos (Z9-16:O e Z11-16:O), em proporção diferente da que o inseto produz naturalmente (10:90), 40% dos machos voaram até a área 3, área onde está a fonte de odor, e menos de 20% dos machos pousaram na fonte de odor (Figura 10A). Quando a resposta dos machos foi avaliada em túnel de vento com uma solução sintética contendo os três componentes identificados na glândula das fêmeas, um número maior de insetos (68%) mostrou voo direcionado, mas nenhum deles pousou na fonte de odor (Figura 10B.)

Para avaliar se o C16:O tem algum efeito atrativo para os machos, este composto foi avaliado individualmente no túnel de vento, uma vez que um maior número de indivíduos alçou voo quando este componente estava presente na mistura feromonal. De forma similar ao observado para a mistura com os três componentes, metade dos insetos avaliados alcançaram a área 3, mas nenhum deles pousou na gaiola (fonte de odor). Também foi observado um número considerável de insetos não responsivos (37.5%), indicando que este composto não é um componente atrativo (Figura 10C).

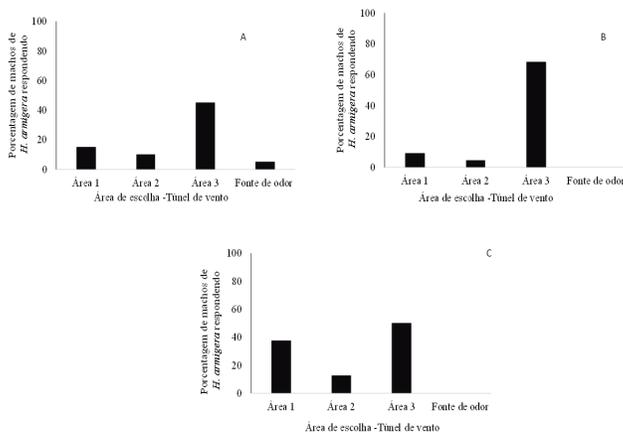


Figura 10. Resposta de machos de *Helicoverpa armigera* em túnel de vento. A. Solução sintética contendo Z9-16:O e Z11-16:O na proporção 10:90. B. Solução sintética contendo Z9-16:O, Z11-16:O e 16:O na proporção 0,3:8,7:1,0. C. Solução sintética contendo somente o 16:O.

Experimentos de campo

Armadilhas com o feromônio comercial (T3: Z9-16:O e Z11-16:O (0.03:0.97)) capturaram um número significativamente maior de machos de *H. armigera* em relação aos outros tratamentos ($\chi^2 = 318$, $df = 3$, $P < 0.001$) (Figura 11A). A análise estatística mostrou que houve influência dos blocos sobre a captura ($\chi^2 = 48.69$, $df = 3$, $P > 0.001$), mas não houve efeito na interação bloco:tratamento ($\chi^2 = 12.36$, $df = 9$, $P = 0.194$). Quando se avaliaram as capturas de fêmeas, também observou-se um efeito do tratamento ($\chi^2 = 10.4$, $df = 3$, $P < 0.02$) (Figura 11A), mas não houve influência dos blocos sobre a captura ($\chi^2 = 0$, $df = 3$, $P = 1$) (Figura 11A), nem na interação bloco:tratamento ($\chi^2 = 8.99$, $df = 9$, $P = 0.437$) (Figura 11A). Ao considerar o total de adultos de *H. armigera*, o tratamento 3 capturou um número significativamente maior de indivíduos ($\chi^2 = 22.69$, $df = 3$, $P < 0.001$) (Figura 11B); No entanto, não houve efeito dos blocos na captura ($\chi^2 = 11.66$, $df = 3$, $P = 0.008$) (Figura 11A) nem na interação bloco:tratamento ($\chi^2 = 29.47$, $df = 9$, $P < 0.001$) (Figura 11A). Observou-se capturas de adultos de *Spodoptera* sp. nas armadilhas de todos os tratamentos. A captura de machos, fêmeas ou total de adultos/armadilha não mostrou efeitos significativos dos tratamentos, blocos ou interação em nenhum caso. Atração cruzada interespecífica também foi observada, com captura de adultos de *Elafria agratina* (Noctuidae: Lepidoptera) nas armadilhas dos quatro tratamentos avaliados. A maioria dos adultos desta espécie capturados nas armadilhas foram machos e comprovaram-se efeitos significativos dos tratamentos ($\chi^2 = 27.385$, $df = 3$, $P < 0.001$), dos blocos ($\chi^2 =$

8.683, $df=3$, $P=0.003$) (Figura 11C) e da interação bloco:tratamento ($\chi^2 = 26.18$, $df=9$, $P=0.002$) (Figura 11C). O mesmo ocorreu quando se avaliou o número total de insetos capturados: efeito do tratamento $\chi^2 = 22.689$, $df=3$, $P<0.001$; efeito dos blocos ($\chi^2 = 5.858$, $df=3$, $P=0.119$); e interação bloco:tratamento $\chi^2 = 29.478$, $df=9$, $P=0.002<0.001$ (Figura 11C). No entanto, o número de fêmeas capturadas não foi influenciado pelos fatores considerados no experimento (Figura 11C)

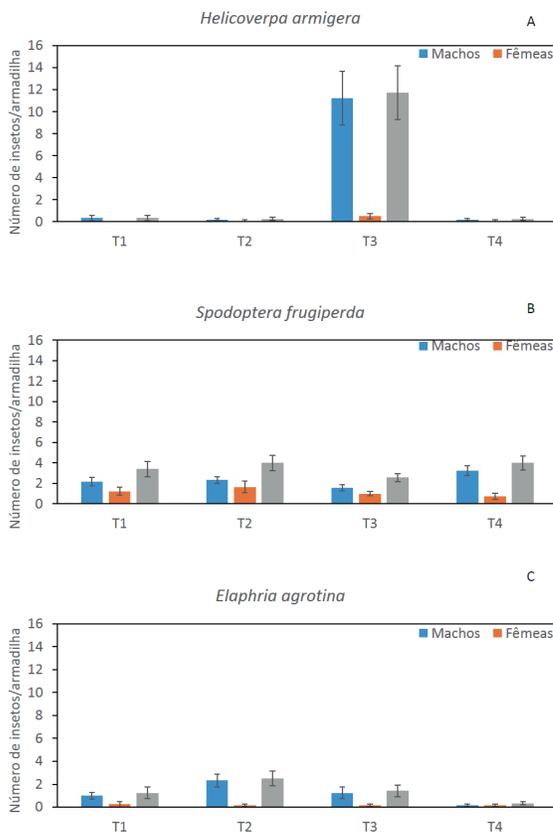


Figura 11. Número de insetos capturados nas armadilhas feromonais, avaliadas no campo de algodão. A. *Helicoverpa armigera*, B. *Spodoptera frugiperda* e C. *Elaphria agrotina*. Tratamentos: (T1) septo impregnado com 1 mg Z9-16:O, Z11-16:O, 16:O na proporção (0,02: 9,0: 0,08); (T2) septo contendo dois componentes Z9-16:O, Z11-16:O (0,03:0,97); (T3) Bioarmigera, um feromônio comercial, (Biocontrol, São Paulo, SP, Brasil); e (T4) controle, septo impregnado com solvente pentano.

Conclusões

A produção de feromônio sexual pelas fêmeas da população brasileira de *H. armigera* apresentou os três componentes já identificados em outras populações, como as da China e da Índia (Zhang et al., 2012, Anju et al., 2004). A proporção dos dois componentes ativos Z9-16:O e Z11-16:O identificados na população de *H. armigera* proveniente do oeste na Bahia, foi similar à encontrada nas populações coletadas na China e Índia (Zhang et al., 2012, Anju et al., 2004) e a uma população de Israel (Kehat et al., 1990), mas diferente das descritas para as populações da Rússia e da Austrália (Konyukhov, et al 1978, Kevdaras et al.; 2007). Assim, como o observado em outras populações, somente os dois aldeídos insaturados (Z9-16:O e Z11-16:O) foram fisiologicamente ativos e parecem influenciar o comportamento de resposta de atração de machos da espécie. Os bioensaios conduzidos em túnel de vento indicam que o composto 16:O não tem efeito atrativo.

Os estudos de campo indicaram que o feromônio comercial, contendo os compostos Z9-16:O e Z11-16:O na proporção 0,03:0,97, atraiu significativamente mais machos do que os demais tratamentos avaliados. As misturas sintéticas não comerciais não mostraram a mesma eficiência na atração dos machos de *H. armigera*, o que sugere que diferenças nas quantidades totais dos componentes, suas proporções ou nas taxas de liberação entre a formulação comercial e a sintética produzida para os experimentos de campo sejam responsáveis pela atração diferenciada, conseqüentemente, pela diferença nas capturas nas armadilhas. A formulação do tratamento T2 continha dois componentes (Z9-16:O, Z11-16:O) na mesma proporção que a formulação comercial, logo, esperava-se que os insetos fossem atraídos para ambas as armadilhas de forma semelhante, o que não foi observado. Estudos envolvendo diferentes concentrações devem ser conduzidos para elucidar essas questões. Um aspecto que deve ser ressaltado, diz respeito às formulações não comerciais dos compostos sintéticos que atraíram mariposas da família Noctuidae (*Spodoptera spp.* e *E. agrotina*). Isto indica a possibilidade de utilizar armadilhas feromonais para monitorar a presença de mais de uma espécie no campo. Esta atração cruzada interespecífica ocorre porque alguns compostos da mistura feromonal são comuns entre diferentes espécies, embora em proporções diferentes. Atração cruzada por feromônio em Noctuidae é comum em espécies congênicas, relatada entre *Spodoptera triturrata* (Walker), *S. exempta* (Walker) e *S. littoralis* (Boisduval) (Khasimuddin e Lubega, 1984), *S. eridania* e *S. exigua* (Hübner) (Mithchell & Tumlinson, 1994) e *S. cosmioides* (Walker) e *S. frugiperda* (Blasioli-Moraes et al., 2016).

Agradecimentos:

Ao CNPq (processos N°. 403376/2013-0, 306601/2016-8), Embrapa (SEG MP2 n° 02.13.14.006.00.00), Fundação de Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF). Ao ICMBio, MMA pela Autorização para Atividades Científicas SISBIO n° 48218-3).

Referências Bibliográficas

ANJU, D.; KANAUIA, K. R.; SUDHA, K. Efficiency of different pheromonal blends to monitor *Helicoverpa armigera* (Hübner) moth catches. **Indian Journal of Plant Protection**, v. 32, p. 147-148, 2004.

AVILA, C. J.; VIVAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V. **Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hubner)(Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas.** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013. 12 p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Circular técnica, 23).

BLASSIOLI-MORAES, M. C.; BORGES, M.; VIANA, A. R.; LAUMANN, R. A.; MIRANDA, J. E.; MAGALHÃES, D. M.; BIRKETT, M. A. Identification and field evaluation of the sex pheromone of a brazilian population of Spodoptera cosmioides. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília v. 51, n. 5, p. 545-554, maio 2016.

BRADBURY, J. W.; VEHRENCAMP, S. L. **Principles of animal communication.** 2. ed. Reino Unido: Oxford University Press, 2011. Disponível em: <<http://sites.sinauer.com/animalcommunication2e/>>. Acesso em: jan. 2018.

BORGES, M.; MORAES, M. C. B.; PEIXOTO, M. F.; PIRES, C. S. S.; SUJII, E. R.; LAUMANN, R. A. Monitoring the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) with pheromone-baited traps in soybean fields. **Journal of Applied Entomology**, v. 135, n.1-2, p.68-80, 2011.

CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. da S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K; BÚRIGO, A. C. (Orgs.) **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde.** de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. 624 p. Disponível em: <http://www.abrasco.org.br/dossieagrototoxicos/wpcontent/uploads/2013/10/DossieAbrasco_2015_web.pdf>. Acesso em: nov. 2017.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C.; VIVAN, L. M.; GUIMARÃES, H. O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia-GO, v. 43, p. 110-113, jan./mar., 2013.

DENG, J. Y.; HUANG, Y. P.; WEI, H. Y.; DU, J. W. EAG and behavioral responses of *Helicoverpa armigera* males to volatiles from poplar leaves and their combinations with sex pheromone. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 5, n. 12, p. 1577-1582, 2004.

EMBRAPA. **Nota técnica sobre resultado do trabalho inicial de levantamento da lagarta do gênero *Helicoverpa*: detecção da espécie *Helicoverpa armigera* no Brasil.** Planaltina: Embrapa Cerrados. 2013. (material não publicado)

KEHAT, M.; DUNKELBLUM, E. Behavioral responses of male *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) moths in a flight tunnel to combinations of components identified from female sex pheromone glands. **Journal of Insect Behavior**, v. 3, p. :75-83, 1990.

KHASIMUDDIN, S.; LUBEGA, M.C. Quantitative bioassays for sex pheromone analysis in *Spodoptera exempta* (Wlk.) (Lepidoptera, Noctuidae), and laboratory evidence of cross-attraction among three species. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 5, p. 325 -328, 1984.

KVEDARAS, O. L.; DEL SOCORRO, A. P.; GREGG, P. C. 2007. Effects of phenylacetaldehyde and (Z)-3-hexenyl acetate on male response to synthetic sex pheromone in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Australian Journal of Entomology**, v. 46, p. 224-23, 2007.

KONYUKHOV, V. P.; KOVALEV, B.G.; MINYAILO, V.A.; STAN, V.V.; OPRUNENKO, YU.F. The synthesis of cis-9-tetradecenal and cis-11-hexadecenal and the determination of their effect on the cotton bollworm using the electroantennogram method. **Khemo. Nasek.** v. 3, p. 37-40, 1978.

MITCHELL, E. R., TUMLINSON, J. H. Response of *Spodoptera exigua* and *S. eridania* (Lepidoptera: Noctuidae) males to synthetic pheromone and *S. exigua* females. **Florida Entomologist**, v. 77, p. 237-247, 1994.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; SPECHT, A.; PAULA-MORAES, S. V.; LOPES-LIMA, A.; YANO, S. A. C.; MICHELI, A.; MORAIS, E. G. F.; GALLO, P.; PEREIRA, P. R. V. S.; SALVADORI, J. R.; BOTTON, M.; ZENKER, M. M.; AZEVEDO-FILHO, W. S. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, p. 101-104, 2016.

TAMHANKAR, A. J.; RAJENDRAN, T. P.; RAO, N. H.; LAVEKAR, R. C.; JEYAKUMAR, P.; MONGA, D.; BAMBAWALE, O. M. Variability in response of *Helicoverpa armigera* males from different locations in India to varying blends of female sex pheromone suggests male sex pheromone response polymorphism. **Current Science**, v. 84, p. 448-450, 2003.

WITZGALL, P.; KIRSCH, P.; CORK, A. Sex pheromones and their impact on pest management. **Journal of Chemical Ecology**, v.36, n. 1, p. 80-100, 2010.

ZHANG, J. P.; SALCEDO, C.; FANG, Y. L.; ZHANG, R. J.; ZHANG, Z. N. An overlooked component: (Z)-9-tetradecenal as a sex pheromone in *Helicoverpa armigera*. **Journal of Insect Physiology**, v. 58, p. 1209-121, 2012.



**Recursos Genéticos e
Biotecnologia**

Agradecimentos



MINISTÉRIO DO
MEIO AMBIENTE

MINISTÉRIO DA
**AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO**

