

**Agosto de 2013**  
Publicação periódica de difusão científica e tecnológica editada pelo Instituto Mato-grossense do Algodão (IMAmt) e dirigida a profissionais envolvidos com o cultivo e beneficiamento do algodão.

**Diretor executivo**  
Álvaro Salles

**Contato**  
www.imamt.com.br

**Email**  
imamt@imamt.com.br

**Tiragem**  
2000 exemplares

(1) Pesquisadores do Instituto Mato-Grossense do Algodão – IMAmt. Convênio IMAmt/Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF. Email: pauloqueiroz@imamt.com.br, ericmartins@imamt.com.br, carlosmarcelo@imamt.com.br.

(2) Pesquisadores do Instituto Mato-Grossense do Algodão – IMAmt. Primavera do Leste, MT.

(3) Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas. Prédio do Controle Biológico.

## Identificação molecular de *Helicoverpa armigera*: tecnologia a serviço dos cotonicultores de Mato Grosso

Paulo R. M. Queiroz<sup>1</sup>; Érica S. M. Queiroz<sup>1</sup>; Carlos M. Soares<sup>1</sup>; Leonardo B. Scoz<sup>2</sup>; Danielle Thomazoni<sup>2</sup>; Miguel F. Soria<sup>2</sup>; Rose G. Monnerat<sup>3</sup>

### Espécies do gênero *Helicoverpa*

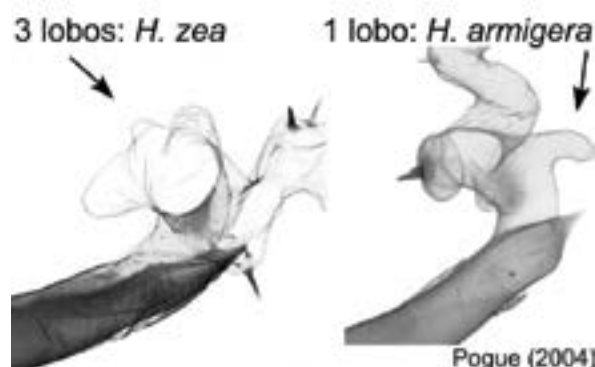
O gênero *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae: Heliethinae) é formado por aproximadamente 18 espécies, sendo que as espécies *H. armigera* (Hübner), *H. zea* (Boddie), *H. punctigera* (Wallengren) e *H. assulta* (Gueneé) são importantes pragas agrícolas e, coletivamente, provocam perdas econômicas superiores a dois bilhões de dólares por ano, especialmente em função do ataque de *H. armigera*. Outras espécies desse grupo são consideradas pragas, mas com limitado número de hospedeiros e distribuição geográfica. *H. armigera* é a espécie de maior distribuição, ocorrendo por toda a Ásia, África, Europa e Oceania. No Brasil, foi considerada praga quarentenária até o início de 2013, quando do seu relato oficial no país (EMBRAPA, 2013; Czapak et al., 2013). *H. zea* ocorre na América do Norte e do Sul e *H. punctigera* é endêmica da Austrália. A morfologia externa desses insetos, em todas as fases do ciclo biológico [ovo, larva (lagarta), pupa e adulto] (Figura 1), são muito semelhantes, o que dificulta a identificação a olho nu.

A identificação por meio de algumas características da morfologia interna é somente possível por taxonomistas especialistas nesse grupo de pragas (noctuídeos), utilizando-se para isso de equipamentos e reagentes específicos. Particularmente, a forma mais efetiva para esta identificação se dá pela análise da morfologia dos órgãos genitais (Figura 2) (Hardwick, 1965).

Cabe destacar que outra espécie da mesma subfamília, *Heliothis virescens* (F.), é difícil de ser diferenciada de *Helicoverpa* spp. a olho nu, especialmente o ovo e a



**Figura 1.** Morfologia externa de lagartas de *H. armigera* e *H. zea* em suas fases do ciclo biológico (ovo, larva e adulto).



**Figura 2.** Genitália masculina de *H. zea* e *H. armigera*. Detalhe da diferença pelo número de lobos na vesícula (canal ejaculatório que faz parte do pênis do macho) das duas espécies.

lagarta. Na fase adulta (mariposa) é facilmente diferenciada de *Helicoverpa* spp., pela presença de três listras oblíquas na asa anterior.

Dessa forma, a análise via DNA torna-se uma ferramenta rápida e precisa em um momento em que a invasão por *H. armigera* é fato no Brasil, em especial no Mato Grosso, maior produtor de algodão e soja do país.

### Identificação molecular de *Helicoverpa* spp. por DNA usando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

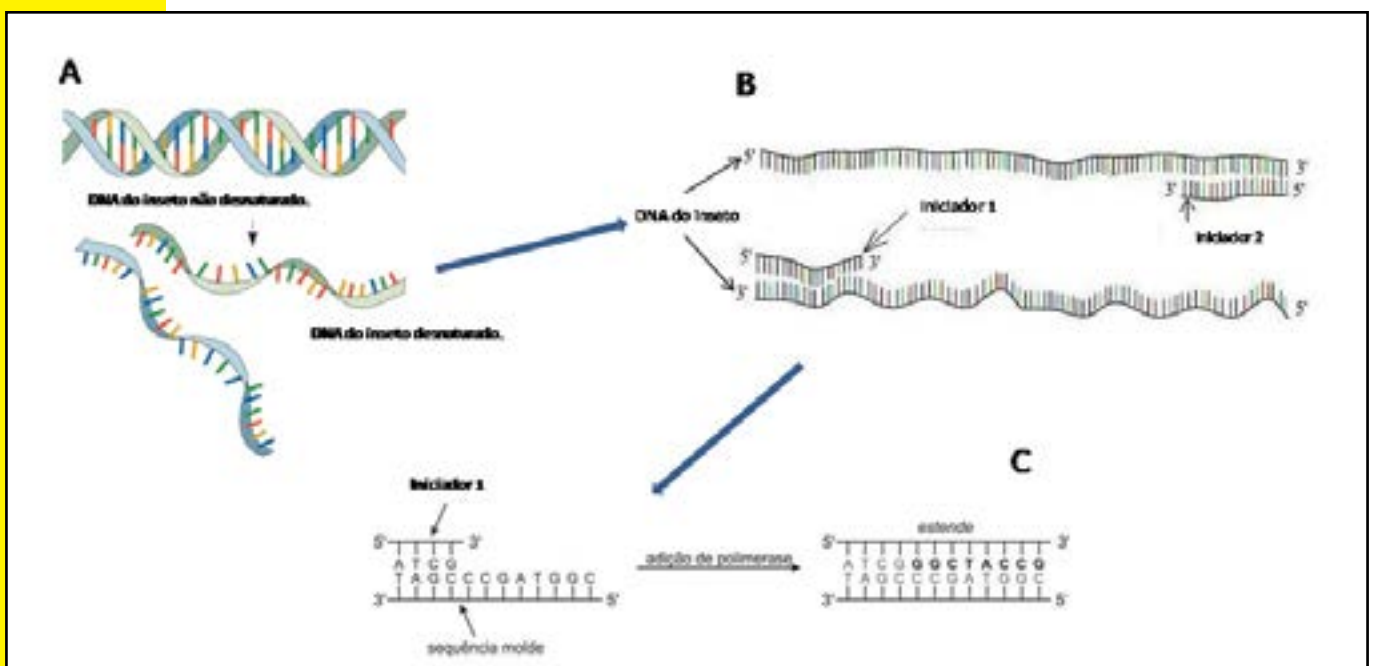
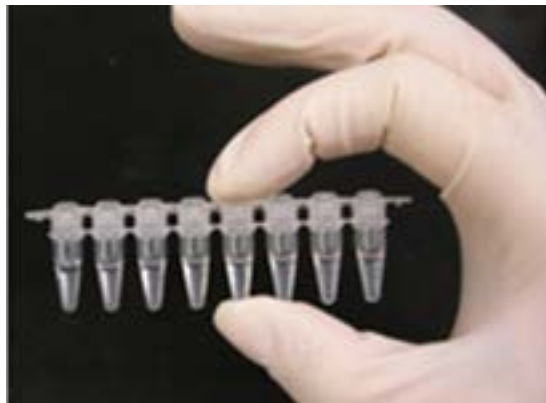
Vários métodos moleculares e bioquímicos têm sido propostos para o diagnóstico das espécies desse gênero. A partir das estratégias moleculares é possível distinguir as espécies

de *Helicoverpa* com maior precisão e rapidez, bem como identificar características de interesse (origem, resistência aos inseticidas químicos e bioinseticidas, tais como, as proteínas Cry de Bt) de diferentes populações da praga a partir da análise por DNA.

Uma técnica de biologia molecular muito usada para a identificação de insetos é a PCR – Reação em Cadeia da Polimerase, semelhante aos testes de identificação humana, como na determinação da paternidade. Nesta técnica uma região específica do DNA é multiplicada mais de um bilhão de vezes a partir da amostra de DNA do organismo que está armazenada dentro de um recipiente plástico específico (*Figura 3*), tornando possível o reconhecimento e a diferenciação de cada espécie.

No caso de ensaio via PCR no qual se deseja identificar a espécie *H. armigera*, dentro de cada tubo é colocada uma mistura que consiste em: (1) material genético do inseto a ser analisado, (2) moléculas de DNA sintético de determinada porção dos genes que diferenciarão as espécies e (3) dose da enzima DNA polimerase. A partir de um processo de aquecimento seguido de resfriamento, que se repete várias vezes, a reação provoca uma multiplicação exponencial de certa região do gene que é capaz de diferenciar as espécies (*Figura 4*).

**Figura 3.** Tubos plásticos, tipo eppendorf, nos quais são realizadas as reações de PCR.



**Figura 4.** Exemplo das etapas para identificação dos insetos por PCR. A – Separação das fitas de DNA; B – Reconhecimento dos genes que diferenciarão as espécies; C – Polimerização das regiões identificadas.

Pela técnica de PCR é possível identificar as espécies de *Helicoverpa* mais facilmente e praticamente sem erros, além de ser uma técnica altamente sensível, o que permite obter resultados a partir de quantidades mínimas de DNA e até de insetos coletados em campo em avançado estado de degradação (Pena, 2006).

### Identificação molecular de *Helicoverpa* spp. por DNA usando PCR - RFLP

Entre os métodos moleculares disponíveis para a identificação de insetos está a técnica de RFLP (ou polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição), que é baseada em um corte do DNA por enzimas específicas que separam esta molécula, gerando padrões que são usados para a diferenciação das espécies (Behere et al., 2008). Esta técnica tem mostrado resultados promissores para a identificação das espécies do gênero *Helicoverpa* (Figura 5).

A partir da parceria que foi estabelecida entre o Instituto Mato-grossense do Algodão (IMAmt) e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia foi possível validar, para o contexto brasileiro, a técnica de PCR-RFLP para a identificação das espécies *H. armigera* e *H. zea* nas regiões cotonicultoras de Mato Grosso. A análise molecular das lagartas coletadas de seis regiões de campos cultivados com algodão no estado de Mato Grosso, compreendendo 13 localidades, no período de 22 de maio a 20 de junho, na safra 2012/13, revelou uma expressiva prevalência de *H. armigera*, correspondendo a mais de 80% dos insetos identificados. Ape-

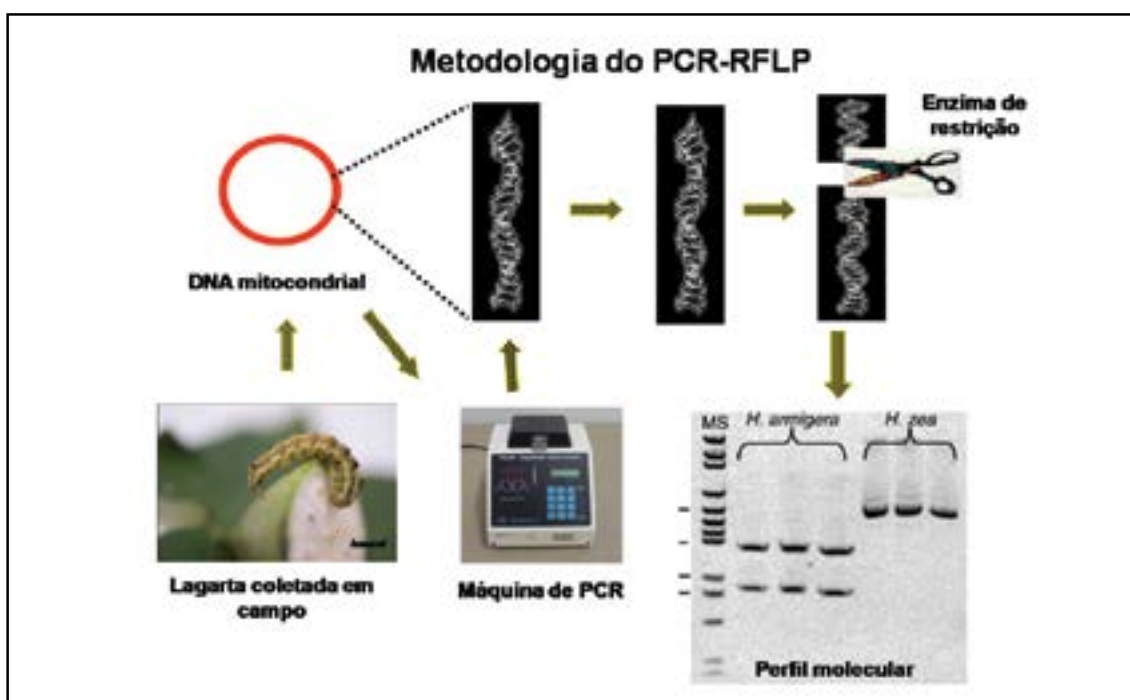
nas 20% das amostras analisadas foram confirmadas como *H. zea*. Desta forma, essa tecnologia validada pode servir como ferramenta complementar ao trabalho do entomólogo.

### Identificação molecular de *Helicoverpa* spp. por DNA usando a PCR em Tempo Real (qPCR)

Assim como PCR convencional e a PCR-RFLP, a qPCR é uma técnica com grande especificidade e elevada sensibilidade, que pode detectar “particularidades na sequência de DNA” de espécimes de *Helicoverpa* oriundas do campo. Dessa maneira, é possível a caracterização gênica de diferentes populações do inseto. Isso permite auxiliar a detecção do centro de origem da amostra analisada da espécie invasora – *H. armigera*, com base em registros já conhecidos de amostras de outras partes do mundo. Com esse tipo de análise será possível verificar a adaptação da espécie invasora no sistema agrícola mato-grossense ao longo das safras. Cabe destacar que o IMAmt conseguiu validar essa técnica no Brasil, para diferentes linhagens (haplótipos) de *H. armigera* presentes no país.

### Procedimento para identificação molecular de *Helicoverpa* spp realizado pelo IMAmt

O Instituto Mato-grossense do Algodão (IMAmt) disponibiliza aos cotonicultores de Mato Grosso a identificação das espécies *H. armigera*, *H. zea* e *H. virescens* via qPCR. Caso o produtor deseje identificar se alguma lagarta, pupa ou mariposa de *H. armigera* está presen-



**Figura 5.** Etapas da PCR-RFLP. As lagartas coletadas em campo têm o seu DNA extraído e, em seguida, esse DNA é submetido à PCR. Ao final da PCR, o DNA sintetizado é digerido com uma enzima de restrição, resultando no aparecimento ou não de marcações específicas no gel de eletroforese. Dependendo do resultado (“perfil molecular”) será possível discriminar as espécies de *H. zea* e *H. armigera*.

te em sua lavoura, ele poderá coletar até 50 lagartas por talhão e enviar para a Estação Experimental do IMAmt em Primavera do Leste para registro da coleta em um banco de dados (localização, hospedeiro, data, dentre outras informações) e posterior análise molecular, cujo resultado é possível de ser obtido em até 4 horas após o início do processamento das amostras.

Espera-se que do período de chegada, registro, preparação e análise das amostras, a apresentação do resultado poderá ser feita em até 72 horas, considerando-se os dias úteis de trabalho e o fluxo de amostras em processo de análise.

### **Como será o procedimento? 'Sistema de Diagnose de *Helicoverpa armigera* (SDHA) IMAmt'**

A proposta é que o produtor ao encontrar espécimes adultos e jovens (lagartas) de *Helicoverpa* em sua propriedade e quiser identificar qual espécie, dentre *H. zea*, *H. armigera* e *H. virescens*, possa fazer isso por meio de análise molecular utilizando a qPCR.

Sendo assim, na primeira solicitação de análise o proprietário ou corpo técnico da propriedade deverá entrar em contato com os laboratórios de Entomologia ou Biologia Molecular do IMAmt, na Estação Experimental em Primavera do Leste-MT, requerendo a ficha do Sistema de Diagnose de *Helicoverpa armigera* (SDHA). Nesse contato serão repassadas instruções sobre como realizar o armazenamento das amostras coletadas no campo, bem como a identificação e registro das informações do local de coleta para posterior envio ao IMAmt.

Com o resultado da análise em mãos, o produtor poderá decidir sobre a melhor tática de controle a ser empregada em seu algodão, como por exemplo, a escolha do princípio ativo mais adequado, sempre respeitando o registro e uso racional do produto, de acordo com as boas práticas do MIP (Manejo Integrado de Pragas).

### **Referências Bibliográficas\***

BRASIL. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Nota técnica sobre resultado do trabalho inicial de levantamento da lagarta do gênero *Helicoverpa* – detecção da espécie *Helicoverpa armigera* no Brasil. Nota técnica de 22 de março de 2013. Embrapa Cerrados, Planaltina DF, 2013, 2 p.

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*, v. 43, n. 1, p. 110-113, 2013.

*\*Referências adicionais e/ou com chamada no texto, mas que não foram citadas aqui poderão ser disponibilizadas via email sob solicitação.*

### **REALIZAÇÃO**



### **PARCERIA**



### **APOIO FINANCEIRO**

