

Notas Científicas

Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil

Alexandre Specht⁽¹⁾, Daniel Ricardo Sosa-Gómez⁽²⁾, Silvana Vieira de Paula-Moraes⁽¹⁾ e Silvia Akimi Cavaguchi Yano⁽²⁾

⁽¹⁾Embrapa Cerrados, Rodovia BR 020, Km 18, Caixa Postal 08223, CEP 73310-970 Planaltina, DF. E-mail: alexandre.specht@embrapa.br, silvana.moraes@embrapa.br ⁽²⁾Embrapa Soja, Rodovia João Strass, s/nº, Acesso Orlando Amaral, Caixa Postal 231, CEP 86001-970 Londrina, PR. E-mail: daniel.sosa-gomez@embrapa.br, silvia_akimi@yahoo.com.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi descrever métodos para a caracterização morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* e ampliar o registro de ocorrência da praga no Brasil. As mariposas foram obtidas de lagartas coletadas nas culturas de algodão, milho e soja, com uso de armadilhas luminosas. As coletas foram realizadas na Bahia, no Distrito Federal, no Mato Grosso e no Paraná. A identificação foi baseada na genitália masculina e nas análises das sequências dos genes mitocondriais do citocromo B e da região cox1-tRNA^{Leu}-cox2. A genitália masculina foi comparada com as descrições morfológicas na literatura, e as sequências de genes, com as depositadas no GenBank. Ambas as análises confirmaram a presença de *H. armigera* nos locais de coleta. Ampliou-se o registro de ocorrência da praga para a região Sul do país.

Termos para indexação: código de barras de DNA, lagarta polífaga, mtDNA, praga quarentenária.

Morphological and molecular identification of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and expansion of its occurrence record in Brazil

Abstract – The objective of this work was to describe methods for molecular and morphological characterization of *Helicoverpa armigera* and to extend the pest occurrence record in Brazil. Moths were obtained from larvae collected in cotton, corn, and soybean crops, using light traps. Collections were done in the states of Bahia, Distrito Federal, Mato Grosso, and Paraná, Brazil. Identification was based on male genitalia and on the analyses of mitochondrial gene sequences of cytochrome B and of the cox1-tRNA^{Leu}-cox2 region. The male genitalia were compared with the morphological descriptions in the literature, and the gene sequences with the ones deposited at GenBank. Both analyses confirmed the presence of *H. armigera* in the collecting locations. The pest geographic range was expanded to the South region of the country.

Index terms: DNA barcodes, polyphagous caterpillar, mtDNA, quarantine pest.

A ocorrência impactante de lagartas tem aumentado nas diferentes regiões do Brasil, especialmente nas culturas de milho, soja, feijão e algodão. Mesmo diante das particularidades de cada região, o relato mais frequente tem sido de ataques de lagartas do gênero *Helicoverpa* a estruturas reprodutivas das plantas. Esses ataques têm sido atribuídos às espécies *H. zea* (Boddie, 1850) e *H. gelotopoeon* (Dyar, 1921), com ocorrência já registrada no Sul do Brasil (Tood, 1955; Hardwick, 1965).

No entanto, também foi registrada a ocorrência de *H. armigera* em culturas de soja e algodão, nos

estados da Bahia, do Goiás e do Mato Grosso (Czepak et al., 2013). Além disso, coletas nas culturas de milho, soja e algodão, em diferentes regiões do país, têm mostrado a ocorrência de representantes de outra espécie de *Helicoverpa*, cujas características não correspondem à descrição de *H. gelotopoeon* ou de *H. zea*. Esta última espécie é muito próxima, morfológica e molecularmente, a *H. armigera* (Behere et al., 2007); há, inclusive, a possibilidade de formação de híbridos férteis entre elas (Hardwick, 1965). Dessa forma, é fundamental que sejam detalhados os métodos empregados na caracterização morfológica e

molecular de *H. armigera*, para que seja possível sua distinção das demais espécies que ocorrem no Brasil, especialmente *H. zea*.

O objetivo deste trabalho foi descrever métodos para a caracterização morfológica e molecular de *H. armigera* e ampliar o registro de ocorrência da praga no Brasil.

Os insetos foram obtidos inicialmente em coletas realizadas a partir de dezembro de 2012, com uso de armadilha luminosa, nos municípios de São Desidério, BA; Planaltina, DF; e Londrina, PR. Para complementar o inventário, foram realizadas coletas de 80 a 100 lagartas, a partir de fevereiro de 2013, em estruturas reprodutivas do algodão (São Desidério, BA; e Campo Verde, MT), do milho (São Desidério, BA; e Planaltina, DF) e da soja (São Desidério, BA). Essas lagartas foram individualizadas em frascos de plástico, alimentadas com dieta artificial (Greene et al., 1976) e mantidas em condições controladas de $25\pm 2^\circ\text{C}$ e $70\pm 10\%$ de umidade relativa, com 12 horas de fotofase, até a obtenção de adultos. Imagos representativos de cada local e cultura foram preservados a seco, em alfinetes entomológicos, como materiais testemunho, e depositados na coleção entomológica da Embrapa Cerrados, em Planaltina, DF.

Analisou-se a morfologia da genitália de indivíduos masculinos, coletados nas diferentes regiões. Os abdomens foram mantidos em solução aquosa de KOH (10%) por 24 horas. A genitália foi dissecada e o edeago foi removido. A vesica foi evertida com seringa para insulina (agulha de 6 mm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro), tendo-se utilizado álcool isopropílico 99% (Pogue, 2004). As estruturas mais importantes para a diferenciação da espécie, como oitavo urosternito, edeago e base da vesica, foram fotografadas e preservadas em lâminas permanentes, para documentação complementar aos espécimes mantidos na coleção.

Mariposas com morfologia da genitália de *H. armigera* (Hübner, 1809) foram armazenadas em recipientes lacrados com sílica gel, a -20°C . A caracterização molecular foi realizada no Laboratório de Entomologia da Embrapa Soja, pela amplificação de sequências parciais dos genes de citocromo oxidase c (subunidades I e II) e citocromo B. A extração de DNA foi realizada com base em sais de CTAB (Rogers & Bendich, 1988), e as amplificações foram feitas com os pares de iniciadores: LCO 1490-J-1514

(5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HCO 2198-N-2175 (5'TAAACTTCAGGGTGACCA AAAAATCA-3'); CytB-10933 (5'-TAGGATATGTTT TACCTTGAGGAC-3') e Cyt B 11388 (5'-TCCTCC TAATTTATTAGGAATTG-3'); e N3400 (5'-TCAATA TCATTGATGACCAAT-3') e C1-J-2797 (5'-CCTCGA CGTTATTCAGATTACC-3') (Folmer et al., 1994; Simon et al., 1994; Taylor et al., 1997; Muraji et al., 2001; Lee et al., 2009).

A reação de PCR para os pares de iniciadores LCO 1490-J-1514 e HCO 2198-N-2175, e CytB-10933 e Cyt B 11388 foi realizada com uso de termociclador Veriti 96-well (Life Technologies do Brasil, Ltda., São Paulo, SP), programado para 35 ciclos de 94°C por 1 min; 48°C para amplificar a região correspondente ao "barcoding" (50°C , para CytB), por 1 min; e 72°C por 1,5 min, com extensão final de 72°C por 5 min. Já para o par de iniciadores N3400 e C1-J-2797, o programa utilizado foi: 35 ciclos de 94°C por 1 min, 46°C por 1 min e 72°C por 1 min, com extensão final de 72°C por 5 min. Para purificar o DNA amplificado, utilizou-se o kit ExoSAP (USB Corporation, Cleveland, OH, EUA). Ambas as sequências "forward" e "reverse" foram analisadas com o sequenciador ABI Prism 3100 DNA Analyzer (Life Technologies do Brasil, Ltda., São Paulo, SP).

Os cromatogramas foram visualizados e editados com o programa Sequencher 4.1.4 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EUA), para avaliar a consistência dos dados. Os fragmentos de boa qualidade foram usados para construir as sequências consenso de cada amostra. As sequências consenso dos fragmentos dos genes foram alinhadas com Clustal W (Thompson et al., 1994), sem modificação dos seus parâmetros. As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, EUA) para *H. armigera*.

Entre os exemplares de *Helicoverpa* coletados, foram encontrados indivíduos cuja morfologia externa e, principalmente, da genitália correspondeu à de *H. armigera*, espécie mais abundante, e à de *H. zea* (Figura 1). As estruturas mais importantes para identificar *H. armigera* foram o formato da base do oitavo urosternito (Figura 1 C) e a presença de um lobo simples na base da vesica (Figura 1 D) (Pogue, 2004).

Os iniciadores correspondentes à região *cox1*, os de citocromo B e os da região *cox1-cox2* amplificaram

produtos de 615, 438 e 570 pb, respectivamente. As sequências resultaram em alinhamentos com 99 a 100% de identidade com as sequências de *H. armigera* presentes no GenBank, o que confirma a identificação feita por características morfológicas. As sequências de *cox1* corresponderam às posições 1502 a 2116 do genoma mitocondrial completo de *H. armigera* (acesso GU188273.1) presente no GenBank. Já as sequências do citocromo *b* corresponderam às posições 10491 a 11378, e as da região *cox1-tRNA^{Leu}-cox2*, às posições 2788 a 3358.

Conforme a Instrução Normativa nº 2 (9/10/02), que estabelece a obrigatoriedade de notificação ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento antes da submissão de publicação de detecção de praga exótica, ou classificada como quarentenária ou exótica para o Brasil, os autores do presente trabalho protocolaram a solicitação (Documento nº

70570.000355/2013-42) para autorização de submissão deste manuscrito em 25/3/2013. A autorização foi concedida em 11 de abril (Ofício DSV/DAS Nº 160/2013). De forma independente, outro grupo de pesquisadores publicou o primeiro registro de ocorrência nas culturas de soja e algodão, nos estados da Bahia, do Goiás e do Mato Grosso (Czepak et al., 2013).

A variabilidade intraespecífica e as semelhanças interespecíficas entre *H. armigera* e *H. zea* demandam o desenvolvimento de estudos detalhados da morfologia, em todos os estágios de desenvolvimento (Leite et al., 2013), e da biologia molecular, para que seja possível avaliar variações interpopulacionais e identificar caracteres potencialmente úteis para a diferenciação precisa e rápida destas espécies, o que subsidiaria tomadas de decisão mais ágeis e apropriadas quanto ao manejo.

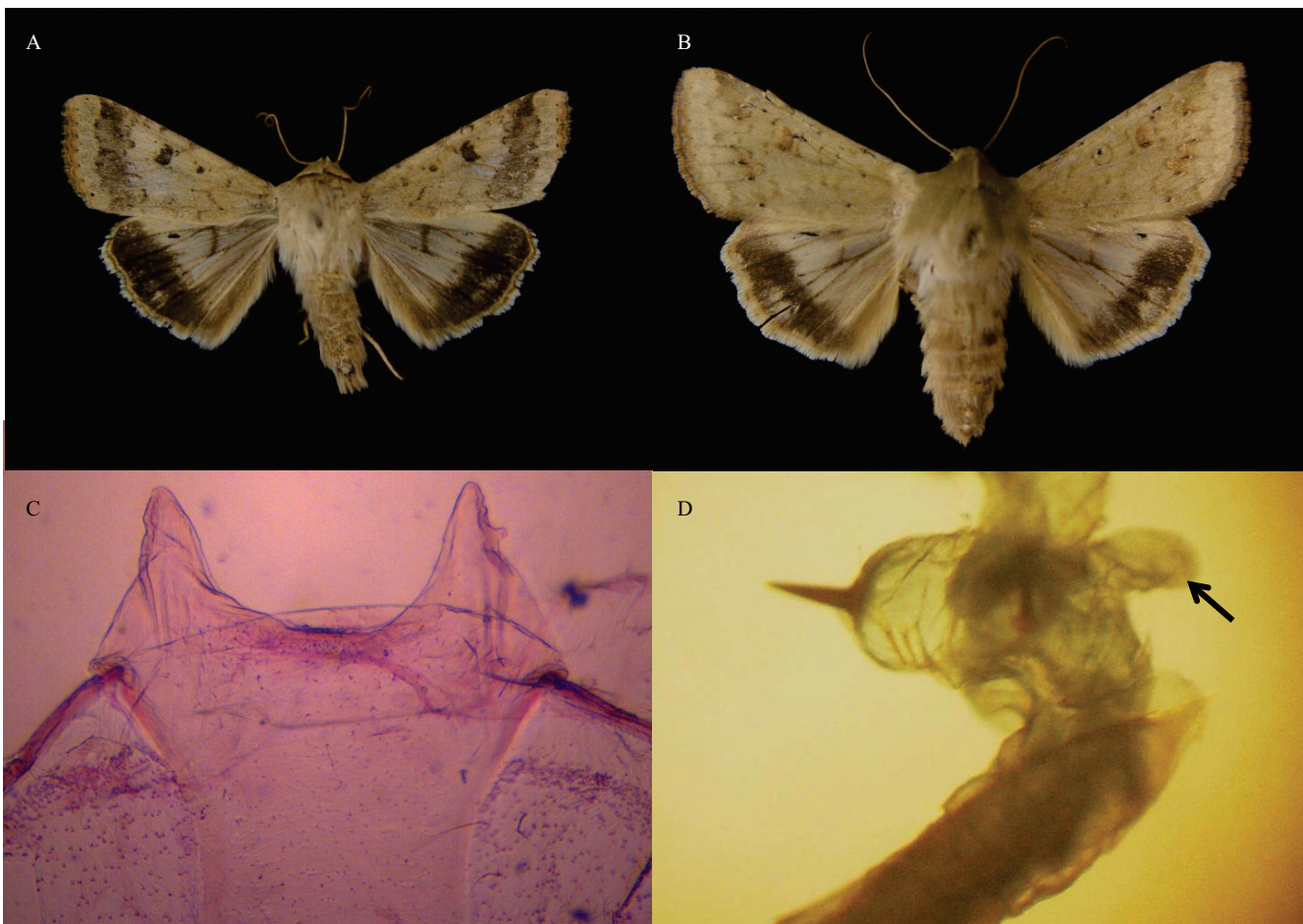


Figura 1. A, macho de *Helicoverpa armigera* (envergadura 36,04 mm); B, macho de *H. zea* (envergadura 41,18 mm); C, base do oitavo urosternito de *H. armigera*; e D, lobo simples (indicado pela seta) na base da vesica de *H. armigera*.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de Bolsa de Pós-doutorado Júnior à última autora (Proc. No 150327/2012-9); aos colegas Edson Hirose, Sebastião Pedro da Silva Neto, André Ferreira Pereira, Lourival Vilela, Amábilio Aires de Camargo, Rose Monnerat, Simone Martins Oliveira, Rodrigo Xavier, Márcia Bernardes, Vander Célio, José Jairo da Silva e Clóvis Ceolin, e à equipe do Grupo Horita – Tahishi Nicta, Cicero Silva, Vitor Yamagata, Israel Silva, George Ferreira e sua equipe de técnicos –, pelo apoio nos trabalhos de coleta.

Referências

- BEHERE, G.T.; TAY, W.T.; RUSSEL, D.A.; HECKEL, D.G.; APPLETON, B.R.; KRANTHI, K.R.; BATTERHAM, P. Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to *H. zea*. **BMC Evolutionary Biology**, v.7, p.1-10, 2007. DOI: 10.1186/1471-2148-7-117.
- 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, p.110-113, 2013. DOI: 10.1590/S1983-40632013000100015.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v.3, p.294-299, 1994.
- GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v.69, p.487-488, 1976.
- HARDWICK, D.F. The corn earworm complex. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.97, p.5-247, 1965. Supplement S40. DOI: 10.4039/entm9740fv.
- LEE, W.; KANG, J.; JUNG, C.; HOELMER, K.; LEE, S.-H.; LEE, S. Complete mitochondrial genome of brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae), and phylogenetic relationships of Hemipteran suborders. **Molecules and Cells**, v.28, p.155-165, 2009. DOI: 10.1007/s10059-009-0125-9.
- LEITE, L.A.R.; CASAGRANDE, M.M.; MIELKE, O.H.H. External morphology of the adult of *Dynamine postverta* (Cramer) (Lepidoptera, Nymphalidae, Biblidinae) and patterns of morphological similarity among species from eight tribes of Nymphalidae. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.57, p.133-148, 2013. DOI: 10.1590/S0085-56262013005000006.
- MURAJI, M.; KAWASAKI, K.; SHIMIZU, T. Nucleotide sequence variation and use of mitochondrial DNA for phylogenetic analyses in anthocorid bugs (Hemiptera: Anthocoridae). **Japan Agricultural Research Quarterly**, v.35, p.85-90, 2001.
- POGUE, M.G. A new synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiation of adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.97, p.1222-1226, 2004. DOI: 10.1603/0013-8746(2004)097[1222:ANSOZH]2.0.CO;2.
- ROGERS, S.O.; BENDICH, A.J. Extraction of DNA from plant tissues. In: GELVIN, S.B.; SCHILPEROORT, R.A. (Ed.). **Plant molecular biology manual**. Belgium: Kluwer Academic, 1988. v.A6, p.1-10.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECHENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v.87, p.651-701, 1994.
- TAYLOR, D.B.; PETERSON II, R.D.; SZALANSKI, A.L.; PETERSEN, J.J. Mitochondrial DNA variation among *Muscidifurax* spp. (Hymenoptera: Pteromalidae), pupal parasitoids of filth flies (Diptera). **Annals of the Entomological Society of America**, v.90, p.814-824, 1997.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, p.4673-4680, 1994. DOI: 10.1093/nar/22.22.4673.
- TODD, E.L. The distribution and nomenclature of the corn earworm. **Journal of Economic Entomology**, v.48, p.600-603, 1955.

Recebido em 11 de abril de 2013 e aprovado em 3 de junho de 2013