

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. Queiroz¹; Érica S. M. Queiroz¹; Carlos M. Soares¹; Leonardo B. Scoz²; Danielle Thomazoni²; Miguel F. Soria²; Rose G. Monnerat³

Espécies do gênero *Helicoverpa*

O gênero *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae: Heliiothinae) 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

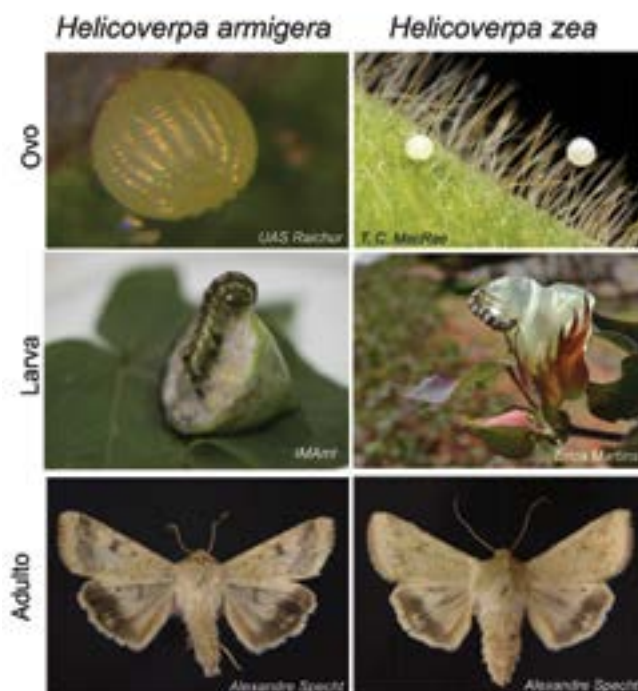


Figura 1. Morfologia externa de lagartas de *H. armigera* e *H. zea* em suas fases do ciclo biológico (ovo, larva e adulto).

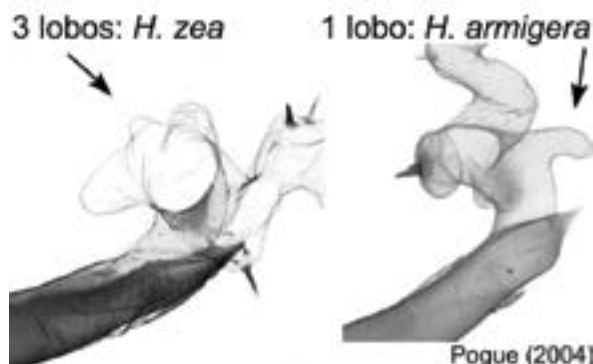


Figura 2. Genitália masculina de *H. zea* e *H. armigera*. Detalhe da diferença pelo número de lobos na vesícula (canal ejaculatório que faz parte do pênis do macho) das duas espécies.

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.

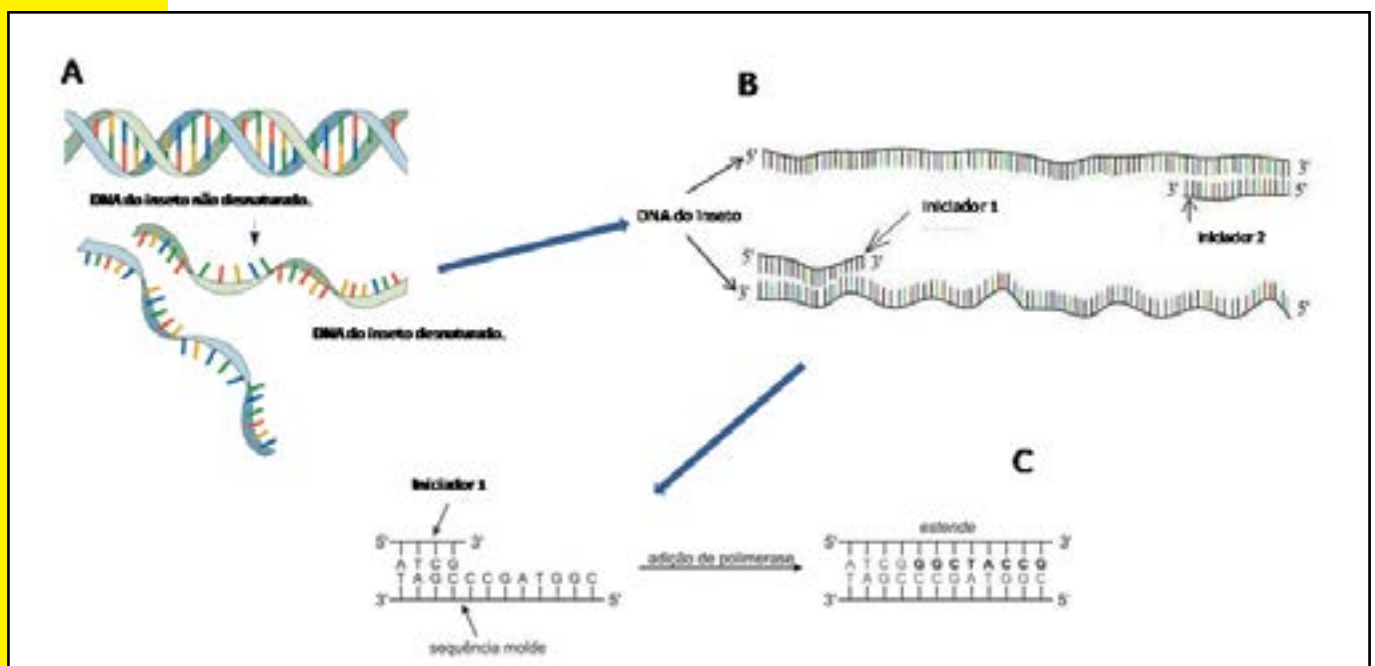
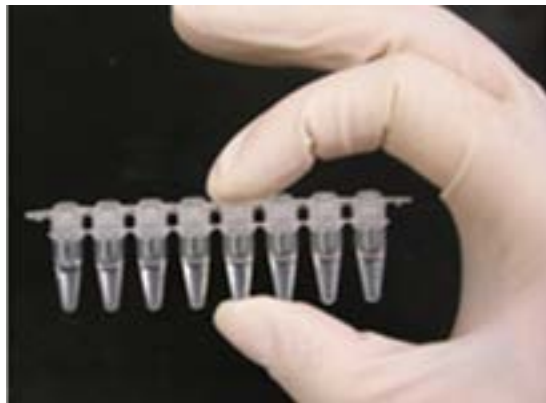


Figura 4. Exemplo das etapas para identificação dos insetos por PCR. A – Separação das fitas de DNA; B – Reconhecimento dos genes que diferenciarão as espécies; C – Polimerização das regiões identificadas.

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-

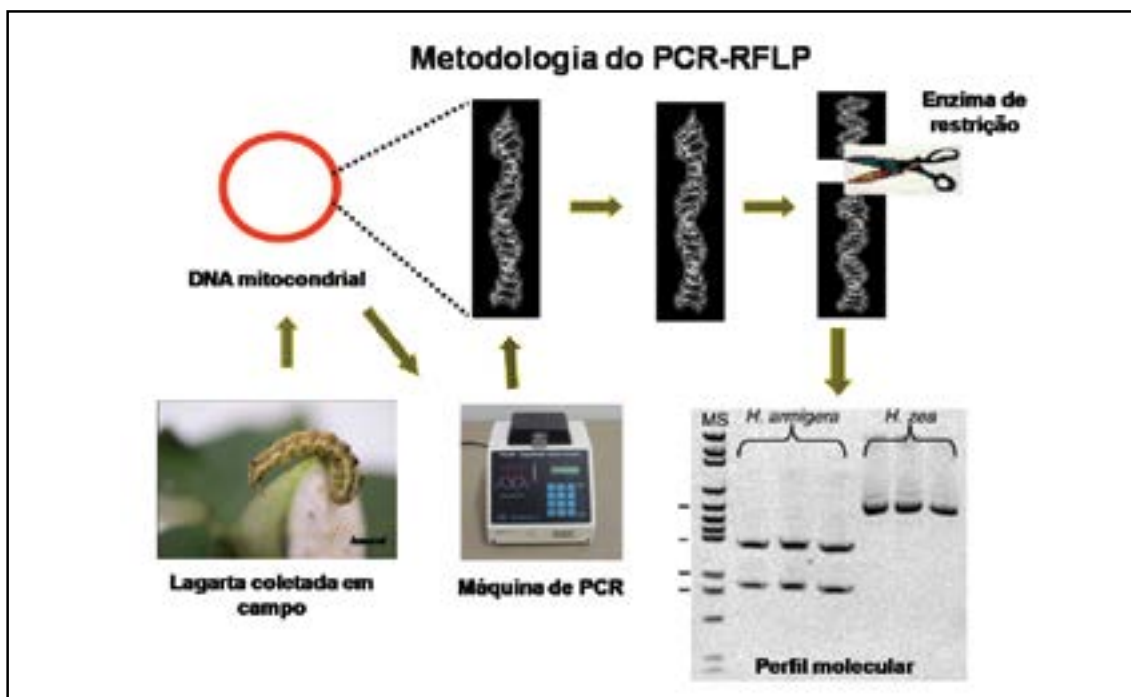


Figura 5. Etapas da PCR-RFLP. As lagartas coletadas em campo têm o seu DNA extraído e, em seguida, esse DNA é submetido à PCR. Ao final da PCR, o DNA sintetizado é digerido com uma enzima de restrição, resultando no aparecimento ou não de marcações específicas no gel de eletroforese. Dependendo do resultado (‘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

