



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**INSETOS HELIOTÍNEOS ASSOCIADOS AO CULTIVO DE GRÃO-DE-BICO NO  
DISTRITO FEDERAL E REGIÃO DO ENTORNO, BRASIL.**

**CAROLINE PINHEIRO REYES**

**TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA, DF**

**OUTUBRO 2022**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**INSETOS HELIOTÍNEOS ASSOCIADOS AO CULTIVO DE GRÃO-DE-BICO NO**  
**DISTRITO FEDERAL E REGIÃO DO ENTORNO, BRASIL.**

**CAROLINE PINHEIRO REYES**

**ORIENTADORA: DRA. ROSE GOMES MONNERAT SOLON DE PONTES**

**TESE DE DOUTORADO EM AGRONOMIA**

**BRASÍLIA, DF**  
**OUTUBRO 2022**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**Insetos Heliotíneos Associados Ao Cultivo De Grão-De-Bico No Distrito Federal E  
Região Do Entorno, Brasil.**

**CAROLINE PINHEIRO REYES**

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO  
DO GRAU DE DOUTORA EM AGRONOMIA.**

**APROVADA POR:**

---

Rose Gomes Monnerat Solon De Pontes (Orientadora)  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Universidade de Brasília – Faculdade de  
Agronomia e Medicina Veterinária  
[rose.monnerat@embrapa.br](mailto:rose.monnerat@embrapa.br)

---

Fábio Gelape Faleiro  
Embrapa Cerrados  
[fabio.faleiro@embrapa.br](mailto:fabio.faleiro@embrapa.br)

---

Alexandre Specht (Examinador Externo)  
Embrapa Cerrados  
[alexandre.specht@embrapa.br](mailto:alexandre.specht@embrapa.br)

---

Paulo Roberto Queiroz  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia/Centro Universitário de Brasília  
[prqzqueiroz@gmail.com](mailto:prqzqueiroz@gmail.com)

**BRASÍLIA-DF  
OUTUBRO 2022**



## FICHA CATAOGRÁFICA

RR457i Reyes, Caroline Pinheiro  
INSETOS HELIOTÍNEOS ASSOCIADOS AO CULTIVO DE GRÃO-DE  
BICO NO DISTRITO FEDERAL E REGIÃO DO ENTORNO, BRASIL /  
Caroline Pinheiro Reyes; orientador Rose Gomes Monnerat  
Solon de Pontes. -- Brasília, 2022.  
56 p.

Tese (Doutorado em Agronomia) -- Universidade de Brasília,  
2022.

1. Identificação de Insetos. 2. PCR quantitativo. 3.  
Caracterização morfológica. I. Gomes Monnerat Solon de  
Pontes, Rose, orient. II. Título.

### REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

REYES, C. P. **Insetos Heliotíneos associados ao cultivo de grão-de-bico no Distrito Federal e região do entorno, Brasil.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2022, 56 p. Tese de Doutorado.

### CESSÃO DE DIREITOS

NOME DA AUTORA: Caroline Pinheiro Reyes

TÍTULO DA TESE DE DOUTORADO: Insetos Heliotíneos associados ao cultivo de grão-de-bico no Distrito Federal e região do entorno, Brasil.

GRAU: Doutorado ANO: 2022

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta tese de doutorado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. A autora reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito da autora. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

---

Caroline Pinheiro Reyes  
E-mail: carolinepireyes@gmail.com

## **DEDICATÓRIA**

Essa tese foi escrita durante a pandemia de Covid-19 que assolou o mundo nos anos de 2020 e 2021.

Diante de todos os desafios já impostos pela pós-graduação, eles foram incomensuravelmente maiores em função da pandemia, atrasando os experimentos e demais atividades corriqueiras na condução dessa tese.

O descrédito na ciência e nos cientistas que se espalhou de forma assustadora em nosso país nesse período, a redução drástica de recursos federais para a pesquisa em universidades públicas e empresas de pesquisas, e toda a idade das trevas que se instaurou no intelecto das pessoas e levou o Brasil à beira do precipício foi um motivo de encorajamento para que eu continuasse nessa jornada.

Fazer ciência no Brasil, hoje, é sinônimo de rebeldia. E fazer ciência básica é semente de resistência. Não vamos nos entregar e a ciência seguirá sendo feita por quem acredita nela.

Dedico esta tese a todos que perderam suas vidas para a Covid-19 e para todos os cientistas que não foram subjugados diante do horror.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Joeci e Rosemari Reyes, por tudo.

Ao meu marido, Sérgio, por sempre acreditar em mim e ter me apoiado de forma incondicional ao enfrentar todos os obstáculos encontrados nesse caminho.

Às minhas irmãs e cunhados, Vanessa e Filipe, Adrienne e Diego, pela amizade e união.

Aos meus avós, José (*in memoriam*), Hilda (*in memoriam*) e Altair (*in memoriam*), pelo amor e carinho a vida toda.

Aos meus sogros, Terezinha e Neivion, por serem minha segunda família.

Aos meus amigos Maurício Scalco e Cristine Vasconcelos, Ivana Cogno e Rodrigo, Renan Paz e William, Rita Machado, Fernanda e Rubem Bertolo, Paula Rodrigues e Alessandro Tagnin, Lenita Haber, Ítalo e Daniele Lüdke, Fabiana Cardoso, Antonia Veras de Souza, Eulina Lopes, Marcelo Hanashiro, Franklin Rabelo, Lucas e Ive, Jandir Carrè, Jader, Anton, Saymond e Jonas Graffunder.

À minha equipe da Embrapa Sede, Janaína Tomazoni, Simone Tsuneda, Clarissa Goldenberg, Milena Lisita, Isabel Vinhal, Francisco Noé, Paula Giovanna, Caroline Turazi que me apoiaram e deram todo o suporte e incentivo necessários para que eu terminasse esse trabalho.

A Reginaldo Guiraldelli, que foi um raio de luz no meio das trevas.

À minha orientadora, Dra. Rose, por ter aceito o meu pedido de orientação.

A Paulo Queiroz, por todo o treinamento e paciência.

A Alexandre Specht, por todo o apoio e conhecimento transmitido.

Ao Dr. Fabio Faleiro, por ter aceito o convite de participação na banca de defesa.

A Guilherme Queiroz, ex-secretário da Pós Graduação em Agronomia, na UnB, por ser sempre tão solícito.

À Universidade de Brasília, pela oportunidade.

À Embrapa Sede, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Embrapa Hortaliças e Embrapa Cerrados, por fornecerem toda a infraestrutura para a realização desta tese.

Às Fazendas Alvorada e Garbanzo, por permitirem que os experimentos fossem conduzidos em suas áreas.

Aos inúmeros bolsistas e estagiários que me ajudaram e sem os quais esse trabalho não se realizaria.

A todos que, de uma forma ou outra, fizeram este trabalho possível.

“A parte que ignoramos é muito maior  
que tudo quanto sabemos.”

-Platão

## RESUMO

O grão-de-bico é uma cultura com exploração comercial em escala relativamente nova no país e, por isso, há poucas informações disponíveis sobre as principais pragas, majoritariamente lagartas, com características morfológicas de heliotíneos, que têm surgido nas lavouras. Com o intuito de apontar as espécies desses insetos no grão-de-bico produzido no Distrito Federal e entorno, para auxiliar os produtores no manejo de pragas, este trabalho foi realizado para a identificação morfológica e molecular desses invertebrados. Foram realizadas coletas manuais de lagartas diretamente nas plantas e a coleta de mariposas com o uso de armadilhas luminosas nas áreas de produção. Entre a aquisição dos insetos e sua análise de DNA, houve um intervalo relativamente longo, cerca de três a quatro anos, o que causou deterioração em algumas amostras. Somente após esse período foi quando se obteve a possibilidade de fazer as identificações moleculares com o uso da enzima Citocromo Oxidase I através do uso da técnica de PCR quantitativo, o que resultou no desenvolvimento de um protocolo de extração de DNA eficiente e de baixo custo para o uso em amostras sob condições desfavoráveis de armazenamento. Os estudos morfológico e molecular resultaram na constatação da presença de *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, *Chloridea virescens* e *Chloridea subflexa*, com predominância de *Chloridea virescens* nas plantas de grão-de-bico. Foi registrada pela primeira vez *Chloridea subflexa* se alimentando em grão-de-bico no Brasil.

Palavras-chave: PCR quantitativo; Citocromo Oxidase I; manejo de pragas

## ABSTRACT

Chickpea is a crop with commercial exploration on a relatively new scale in the country and, therefore, there is little information available on the main pests, mostly caterpillars, with morphological characteristics of heliotes, which have appeared in the crop. In order to point out the species of these insects in chickpeas produced in the Federal District and surroundings, to assist producers in pest management, this work was carried out for the morphological and molecular identification of these invertebrates. Manual collections of caterpillars were carried out directly on the plants and the collection of moths with the use of light traps in the production areas. Between the acquisition of the insects and their DNA analysis, there was a relatively long interval, about three to four years, which caused deterioration in some samples. Only after this period was possible making molecular identifications using the Cytochrome Oxidase I enzyme through the use of the quantitative PCR technique, which resulted in the development of an efficient and low-cost DNA extraction protocol for use in samples under unfavorable storage conditions. Morphological and molecular studies resulted in the presence of *Helicoverpa armigera*, *Helicoverpa zea*, *Chloridea virescens* and *Chloridea subflexa*, with predominance of *Chloridea virescens* in chickpea plants. *Chloridea subflexa* was recorded for the first time feeding on chickpeas in Brazil.

Keywords: quantitative PCR; Cytochrome Oxidase I; pest management

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	14
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
<b>2.1 Origem e descrição botânica do grão-de-bico</b> .....	15
<b>2.2 Tipos de grãos</b> .....	16
<b>2.3 Produção de grão-de-bico</b> .....	17
<b>2.4 Fatores limitantes para a produção</b> .....	17
<b>2.4.1 Estresse Abiótico</b> .....	18
<b>2.4.2 Estresse Biótico</b> .....	18
<b>2.4.2.1 Plantas concorrentes</b> .....	18
<b>2.4.2.2 Doenças</b> .....	18
<b>2.4.2.3 Pragas</b> .....	19
<b>2.4.2.4 Identificação do complexo de pragas entre heliotíneos</b> .....	19
<b>2.5 O controle de pragas e a importância do presente trabalho</b> .....	21
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	22
<b>3 INSETOS-PRAGA HELIOTHINAE (LEPIDOPTERA NOCTUIDAE) ENCONTRADOS NO GRÃO-DE-BICO</b> .....	24
Resumo.....	24
Abstract .....	25
<b>3.1 Introdução</b> .....	26
<b>3.2 Material e métodos</b> .....	26
<b>3.2.1 Coletas de lagartas nos cultivos</b> .....	26
<b>3.2.2 Captura de mariposas em armadilhas luminosas</b> .....	29
<b>3.2.3 Identificação morfológica de adultos</b> .....	31
<b>3.3 Identificação molecular</b> .....	34
<b>3.4 Obtenção de ácidos nucleicos totais</b> .....	35
<b>3.5 Identificação molecular</b> .....	36
<b>3.6 Padronização da curva de qPCR</b> .....	36
<b>3.7 Resultados</b> .....	36

Coleta de lagartas .....	37
<b>Capturas em armadilhas luminosas .....</b>	<b>37</b>
<b>3.8 Identificação molecular.....</b>	<b>38</b>
3.9 Discussão .....	40
3.10 Identificação molecular .....	43
3.11 Conclusões.....	46
3.12 Referências .....	47
NOTA EXPLICATIVA: .....	50
4 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE <i>HELICOVERPA ARMIGERA</i> EM ESTADO DE CONSERVAÇÃO INADEQUADO .....	51
4.1 INTRODUÇÃO.....	51
4.3 RESULTADOS .....	54
4.4 DISCUSSÃO .....	54
4.5 CONCLUSÕES .....	55
4.6 REFERÊNCIAS .....	56

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O grão-de-bico, *Cicer arietinum* L. (Fabaceae), originário da Ásia Menor, disseminou-se para diversos continentes ainda na Antiguidade (NASCIMENTO *et al.*, 2016). Globalmente, o grão-de-bico aparece como terceiro no ranking entre as pulses (leguminosas de grãos secos), com 10,1 milhões de toneladas por ano, ficando atrás apenas dos feijões, que são produzidos na escala de 21,5 milhões de toneladas anualmente, e das ervilhas, que produzem cerca de 10,4 milhões de toneladas (MUEHLBAUER; SARKER, 2017). No Brasil, sua produção foi incipiente até recentemente, quando teve sua área de produção expandida, já na década de 2010, em função de acordos governamentais de exportação para países do oriente, aumentando a área cultivada em mais de 1000% no ano de 2018 (MAPA, 2018).

A Índia, maior produtor mundial de grão-de-bico, é responsável por mais de 70% da produção dessa leguminosa. As médias de produção ficam entre 500 a 600 kg/ha, atingindo até cerca de 900 kg/ha (MUEHLBAUER; SARKER, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2016). No Brasil, as produtividades podem chegar a 3 mil kg/ha, abrindo para o país excelente oportunidade tanto para consumo interno, pois até 2018 o Brasil importou em média 8 mil toneladas do grão por ano, como para exportação (MAPA, 2018).

Nos países que tradicionalmente cultivam grão-de-bico no Velho Mundo, as baixas produtividades decorrem de manejo inadequado da área, baixa tecnificação e pela ocorrência da principal praga, *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1809) (Lepidoptera: Noctuidae). Suas lagartas podem se alimentar das folhas, flores e frutos de diversos hospedeiros, causando sérias perdas econômicas aos produtores. (CUNNINGHAM e ZALUCKI, 2014). Antes uma praga exótica quarentenária, esta espécie foi detectada em diversas regiões do Brasil na safra 2012/2013 (CZEPACK *et al.* 2013, SPECHT *et al.* 2013).

Diferente dos países asiáticos, na América estudos relatam que outra espécie de Heliiothinae, *Chloridea virescens* (Fabricius, 1777) (Lepidoptera: Noctuidae) é praga importante de grão-de-bico (PÉREZ *et al.*, 2012; BLANCO *et al.*, 2007; SHARMA *et al.*, 2007; CHIANG *et al.*, 1999, SHAGARODSKY *et al.*, 2001). Estas duas espécies causam perdas significativas, especialmente por se associarem às plantas na época de florescimento e maturação das vagens (ZALUCKI *et al.*, 1986; NASERI *et al.*, 2010).

Em função da crescente expansão do plantio de grão-de-bico no Brasil, houve relatos do aumento de ataques de lagartas com características próprias dessas espécies, causando

perdas de mais de 30% nas lavouras da pulse. Assim, o presente trabalho objetivou o estudo exploratório dos insetos representantes de Heliiothinae associados ao grão-de-bico no Distrito Federal e nas áreas produtoras no estado de Goiás, Brasil, de forma a auxiliar na tomada de decisão dos produtores, contribuindo para a discussão de estratégias de manejo dessas pragas nessa cultura.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Origem e descrição botânica do grão-de-bico

O grão-de-bico, *Cicer arietinum* L., planta da família Fabaceae, é a segunda leguminosa mais consumida no mundo, sendo superada apenas pela soja (NASCIMENTO, *et al.*, 2016). Ele está entre os mais antigos alimentos cultivados e estima-se que foi domesticado há cerca de 10 a 12 mil anos. As mais antigas evidências do uso de grão-de-bico como alimento foram encontradas em sítios arqueológicos na Síria (8000 a.C.) e Turquia (7500 a 5450 a.C.). Nesses achados, nem sempre é possível distinguir as formas selvagens e domesticadas de *Cicer* (LANA, 2016). O cultivo é bem documentado a partir de 3300 a.C. no Egito e no Oriente Médio e a partir de 5500 a.C. A cultura se expandiu juntamente com as demais plantas fundadoras para a Europa e para o centro oeste da Ásia. O grão-de-bico foi trazido para a América no século XVI por portugueses e espanhóis, porém no Brasil sempre teve produção incipiente (LANA, 2016; NASCIMENTO *et al.*, 2016; SHARMA, 1984) até meados da década de 2010, quando acordos governamentais do Brasil com países do Oriente trouxeram como consequência o aumento em mais de 100% das áreas de produção (MAPA, 2018).

O grão é largamente consumido pelas populações da Índia, pela tradição vegetariana, Arábia, Espanha e México (NASCIMENTO *et al.*, 2016). No século XX, o grão foi introduzido na África tropical e Austrália (SHARMA, 1984).

SHARMA (1984) descreveu botanicamente o grão-de-bico como pertencente à família Fabaceae (Leguminosae). É uma planta de ciclo anual, ereta ou rasteira, podendo atingir mais de um metro de altura, com a presença de tricomas em toda a planta. A raiz principal é bem desenvolvida e as raízes laterais podem nodular, pois como leguminosa possui a vantagem de fixação de nitrogênio. Em cultivares tardias, o sistema radicular se estende mais que em cultivares precoces e eretas.

As folhas são imparipenadas, com cerca de 5 cm de comprimento, variam de tonalidade verde-amarelada para verde-azulado-escuro. As estípulas são ovaladas e sulcadas, com cerca de 8 mm de comprimento. Os folíolos são ovalados, elípticos ou obovados e serrilhados, com 0,8 a 2 cm, por 0,5 a 1,5 cm.

As flores são ligadas aos ramos por pedúnculos de 2,4 a 4 cm de comprimento. As flores são normalmente solitárias e pequenas, com botões pendentes que se expandem ao abrir. O cálice é unido com cinco dentes. A corola possui cerca de 1 cm de largura, de cor branca, esverdeada, rosa ou azul. O estandarte é largo, com unhas, asas livres e carena encurvada. O androceu é composto por 10 estames, sendo um livre e os demais unidos. As anteras são uniformes. O gineceu é composto por um ovário sésbil, estilete curvado, filiforme e não-pubescente, com estigma terminal. Na polinização, as flores mais baixas abrem primeiro em geral uma única aberta em cada ramo. Como as anteras são agrupadas acima do estigma, antes das flores abrirem ocorre autopolinização.

As flores são visitadas por abelhas e, ocasionalmente, ocorrem polinizações cruzadas naturais. Em dias nublados e úmidos, ocorre pouca polinização o que resulta em vagens vazias.

As vagens são infladas, oblongas, de 2 a 3 cm por 1 a 2 cm, com uma ou, no máximo, duas sementes. As sementes são angulares, de 0,5 a 1,0 cm de diâmetro, com bico pontiagudo e hilo pequeno; testa lisa, rugosa ou áspera, variando da cor branca, amarela, vermelha ou marrom, chegando a colorações até quase pretas. O peso médio de 100 sementes fica em torno de 17 a 27 g. A germinação é hipogeal, com as primeiras folhas uni-folioladas e semelhantes a escamas.

## **2.2 Tipos de grãos**

Existem dois tipos diferentes de grão-de-bico que são produzidos no mundo, cada um com uso e mercados distintos. O tipo Desi possui os grãos com cerca de 120 a 300g/1000 sementes, formato angular e tegumento mais grosso nas cores vermelha, verde, marrom e preta, com a cor amarela quando descascado. Pode ser consumido como grão inteiro, partido sem casca ou como forma de farinha (LANA, 2016). O tipo Kabuli possui os grãos maiores (260 a 600g/1000 sementes), mais arredondados e de cor mais clara, variando de bege a esbranquiçada. Entre 85% e 90% da produção mundial de grão-de-bico é do tipo Desi, porém no Brasil o tipo Kabuli (de cor mais clara e tamanho maior) é o mais consumido.

O potencial de uso do grão-de-bico é vasto. Ele pode ter sua planta usada como adubo verde e seus grãos tem um amplo uso culinário. Devido ao seu alto índice proteico, que pode chegar a 19%, o grão pode ser usado em pastas, com grão inteiro, em sopas, saladas, além de ser importante fonte de alimento vegano de um modo geral (LANA, 2016).

### **2.3 Produção de grão-de-bico**

Dados da FAO mostraram que em 2019 foram cultivados 13.721.962 hectares no mundo todo com grão-de-bico, sendo 9.547.030 hectares apenas na Índia, que atingiu produtividades de cerca de 1,041 t/ha. Para Turquia, na área produzida de 630.000 hectares, a produtividade foi de 1,217 t/ha. Para Rússia, Mianmar e Paquistão, as produtividades foram de 0,917 t/ha, 1,316 t/ha e 0,473 t/ha respectivamente para o período (FAOSTAT, 2021), sendo que o potencial produtivo natural da planta pode ultrapassar 5 t/ha.

No Brasil a produção de grão-de-bico sempre foi incipiente ao longo da história. Na década de 1980 houve o início das pesquisas de melhoramento com essa planta na Embrapa Hortaliças, em Brasília, de forma que se montou um banco ativo de germoplasma e novas cultivares vêm sendo desenvolvidas desde então. Com investimentos em pesquisa, produtividades acima de 3 t/ha foram alcançadas e assim passou a atrair a atenção de produtores interessados na cultura. Com os produtores conseguindo médias altas de produtividade, houve a expansão das áreas produtoras para atender às demandas de exportação (MAPA, 2018).

### **2.4 Fatores limitantes para a produção**

Nos países onde o grão-de-bico foi cultivado habitualmente ao longo do tempo, as baixas produtividades se dão em função de manejo inadequado da área, baixa tecnificação do campo e pela ocorrência de pragas. Em regiões mais áridas, por mais que a planta se desenvolva em sequeiro, seu potencial produtivo fica muito aquém do que poderia ser alcançado. Já no Brasil, com o aumento das áreas de produção, a tradição no cultivo de soja altamente tecnificado foi herdado para uso em grão-de-bico, como o uso de pivô central e colheita mecânica. As cultivares produzidas no Brasil já foram selecionadas para porte ereto, para que se adaptassem às colhedoras de soja. A expansão das áreas produtoras, entretanto, acabou consequentemente

trazendo problemas de ordem fitotécnica, na medida que foi se estabelecendo um microambiente nos mono cultivos.

#### **2.4.1 Estresse Abiótico**

O estresse abiótico é um problema que pode ocorrer nas lavouras da pulse em função da baixa precipitação, de forma que no Brasil as maiores produtividades são obtidas sob pivô central. Além da falta de chuva, o solo compactado pode causar má-drenagem, acumulando água na região do colo da planta, impactando o desenvolvimento de patógenos devido ao excesso de umidade (NASCIMENTO, *et al.*, 1998).

O excesso de calor é prejudicial à produção, sendo temperaturas amenas as melhores e indicadas para seu cultivo. Por esta razão, a época de outono/inverno no Brasil é a mais adequada para seu plantio (NASCIMENTO, *et al.*, 1998).

#### **2.4.2 Estresse Biótico**

##### **2.4.2.1 Plantas concorrentes**

As plantas que nascem espontaneamente nas entrelinhas das lavouras da leguminosa interferem de forma negativa por concorrerem por nutrientes, água e espaço físico. Além disso, essas plantas podem ser hospedeiras de doenças e pragas (NASCIMENTO, *et al.*, 1998).

##### **2.4.2.2 Doenças**

No Brasil, doenças de solo como podridões de colo e raiz são comuns devido à presença abundante de fungos nesse ambiente como *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. e *Sclerotium* sp., que possuem amplo ciclo de hospedeiras e alta capacidade de sobrevivência no solo. Essas podridões se manifestam em áreas agrupadas ou reboleiras que se destacam pelo amarelecimento das plantas no meio da lavoura verde (NASCIMENTO, *et al.*, 1998), sendo fáceis e comuns de serem detectadas.

Além dos fungos de solo, doenças da parte aérea podem afetar a planta. Geralmente são fungos como *Ascochyta* spp., *Botrytis* sp., *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp., entre outros. A

cultura também pode ser acometida de viroses (Tomato Spotted Wilt Virus – TSWV) e nematoides. (NASCIMENTO *et al.*, 1998).

#### 2.4.2.3 Pragas

REED *et al.*(1987), citado por PÉREZ e SURIS (2012) relatam que pelo menos 55 espécies de insetos se alimentam da pulse. Dentre esses insetos-praga que podem causar perdas significativas no grão-de-bico, especialmente por associarem-se à planta na época de florescimento e maturação das vagens, encontra-se a *Helicoverpa armigera* (ZALUCKI *et al.*, 1986; NASERI *et al.*, 2010). Essa espécie pertence à família Noctuidae, subfamília Heliiothinae e suas lagartas, de hábito polífago, são extremamente vorazes e capazes, inclusive, de perfurar recipientes plásticos (CUNNINGHAM e ZALUCKI, 2014).

Antes restrita ao Velho Mundo, *H. armigera* foi detectada em diversas regiões do Brasil em 2013 (CZEPACK *et al.* 2013, SPECHT *et al.* 2013) causando danos a diversas culturas e levando o Ministério da Agricultura do Brasil a autorizar o uso emergencial de inseticidas para tentar controlar o surto. Em estudo posterior, verificou-se que *H. armigera* já estava em território brasileiro desde 2008 (SOSA-GÓMEZ *et al.* 2016).

Além de *H. armigera*, *Chloridea virescens*, também conhecida como a lagarta-da-maçã-do-algodoeiro, é tida em vários países da América como a praga de maior incidência em grão-de-bico, sendo considerada a principal praga da cultura em Cuba (PÉREZ e SURIS, 2012). No Brasil, LOURENÇÃO *et al.* (1989) já haviam registrado a ocorrência de *C. virescens* nas plantas de grão-de-bico, assim como CASTELO BRANCO *et al.*, (1989).

#### 2.4.2.4 Identificação do complexo de pragas entre heliotíneos

Embora haja diferenças morfológica entre as lagartas de *Helicoverpa* e *Chloridea*, sua identificação em campo a olho nu é bastante complexa, tendo, por exemplo, diferenças nos tubérculos na região dorsal do primeiro segmento abdominal (ÁVILA *et al.*, 2013), como podemos ver abaixo nas Figuras 1 e 2.



Figura 1. Lagarta de *Helicoverpa* e suas características morfológicas utilizadas para identificação morfológica.



Figura 2. Detalhes das estruturas utilizadas para a identificação morfológica entre as lagartas de *Helicoverpa*, à direita, e *Chloridea*, à esquerda.

Entre *Helicoverpa armigera* e *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae), as diferenças morfológicas externas são praticamente inexistentes, sendo necessária a identificação com base na dissecação da genitália dos machos (SPECHT *et al.*, 2013). Para POGUE (2004) e BRAMBILA (2009), outras características para identificação entre as duas espécies pode ser o oitavo urosternito e um lobo simples na base da estrutura da vesica para *H. armigera* e três lobos na base da vesica para *H. zea*, como podemos ver nas Figuras 3

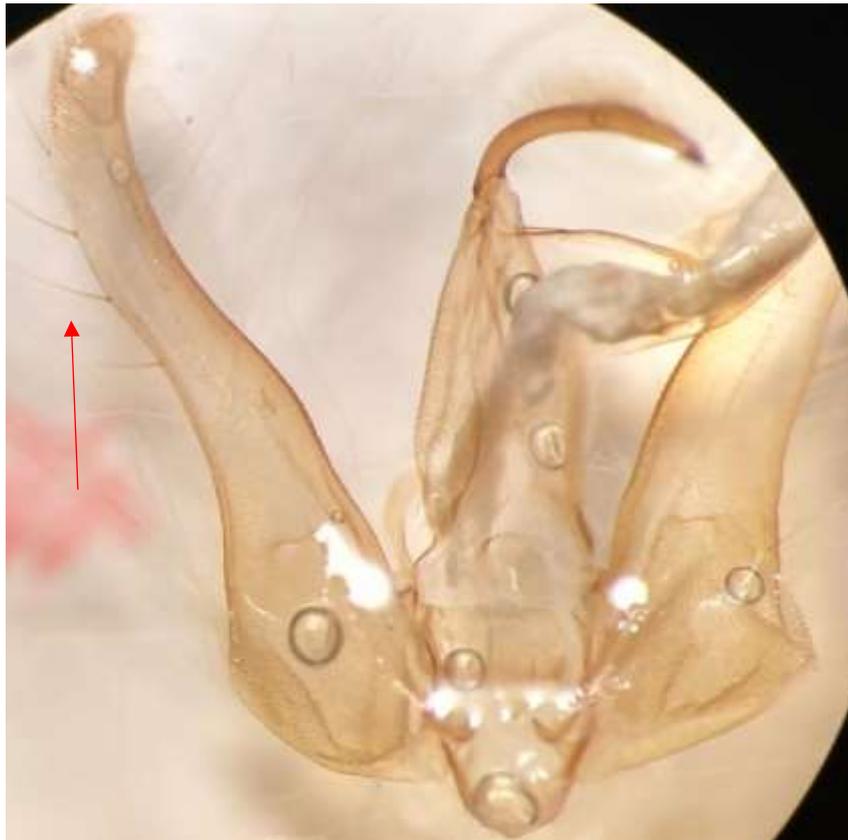


Figura 3. Genitália masculina de mariposa do gênero *Helicoverpa*, com destaque para os espinhos das valvas, estruturas usadas para a identificação da espécie.

## 2.5 O controle de pragas e a importância do presente trabalho

Pelas dificuldades encontradas na identificação dos insetos e pela grande necessidade de se encontrar ou desenvolver métodos de controle de pragas mais sustentáveis, na presente tese fez-se um estudo exploratório com a finalidade de identificar as espécies de heliotíneos mais frequentemente presentes nas lavouras de grão-de-bico nas áreas produtoras do DF e no entorno. Disponibiliza-se, assim, conhecimento para que o manejo dessas pragas seja feito de forma mais assertiva, reduzindo ou evitando o uso de produtos inadequados e contribuindo com informações para que sejam traçadas estratégias de manejo e controle mais eficiente das lagartas em campo, dando subsídios para a tomada de decisão dos engenheiros agrônomos responsáveis.

## REFERÊNCIAS

- ÁVILA, J.C.; 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. **Circular Técnica 23**, Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013. 12p.
- BLANCO, CA; TÉRAN-VARGAS, AP; LÓPEZ, JD; KAUFFMAN, JV; WEI, X. Densities of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in three plant hosts. **Florida Entomologist** 90, 742-750, 2007.
- BRAMBILA, J. Instructions for dissecting male genitalia of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae) to separate *H. zea* from *H. armigera*, 2009. Disponível em: [https://www.aphis.usda.gov/plant\\_health/plant\\_pest\\_info/owb/downloads/owb-screeningaids2.pdf](https://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/owb/downloads/owb-screeningaids2.pdf) . Acessado em 03 de março 2017.
- MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Plano Nacional de Desenvolvimento da Cadeia do Feijão e Pulses** – PNDCFP, 2018. 40p.
- CASTELO BRANCO, M; VILLAS BOAS, GL; LOPES, JF; GIORDANO, LB. 1989. Avaliação de grão-de-bico para resistência a *Heliothis virescens*. **Horticultura Brasileira** 7: 49. Resumo.
- CHIANG, ML; CRUZ, B; SHAGARODSKY, T. Entomofauna del garbanzo en Cuba. **Revista Cocuyo** 8, 21-22, 1999.
- CUNNINGHAM, JP; ZALUCKI, MP. Understanding Heliothinae (Lepidoptera: Heliothinae) pests: What is a host plant? **Journal of Economic Entomology** 107, 881-896, 2014.
- CZEPACK, C; ALBERNAZ, KC; VIVIAN, LM; GUIMARÃES, HO; CARVALHAIS, T. 2013. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 43: 110-113.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat>. Acesso em 10 jun 2021.
- LANA, M.M. Leguminosas: qualidade e uso. In: NASCIMENTO, WM (ed). **Hortaliças Leguminosas**. Embrapa, Brasília, 2016. p. 149-216.
- LOURENÇÃO, AL; BRAGA, NR; NAGAI, V. 1989. Comportamento de genótipos de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) em relação a *Heliothis* spp. (Lepidoptera: Noctuidae). In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 12, Belo Horizonte. Resumos, Belo Horizonte, Sociedade Entomológica do Brasil, v. 2, p. 381.
- MUEHLBAUER, FJ; SARKER, A. 2017. Economic importance of chickpea: production, value, and world trade. In: VARSHNEY, RK. *et al.* (eds.) **The chickpea genome**, Compendium of plant genomes p 5-12.
- NASCIMENTO, WM; SILVA, PP; ARTIAGA, OP; SUINAGA, FA. 2016. Grão-de-bico. In: NASCIMENTO, WM (ed). **Hortaliças Leguminosas**. Embrapa, Brasília, 2016. p. 89-118.

- NASCIMENTO, W.M.; PESSOA, H.B.S.V.; GIORDANO, L.B. Cultivo do Grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.). Instruções Técnicas da Embrapa Hortaliças 1. 1998, 11p.
- NASERI, B.; FATHIPOUR, Y.; MOHARRAMIPOUR S.; HOSSEININAVEH, V.; GATHEHOUSE AMR. 2010. Digestive proteolytic and amylolytic activities of *Helicoverpa armigera* in response to feeding on diferente soybean cultivars. Pest Management Science 66: 1316-1323.
- PÉREZ, JC; SURIS, M. 2012. Ciclo de vida y reproducción de *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) sobre garbanzo. Revista de Protección Vegetal 27: 85-89.
- POGUE, MG. 2004. A new synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiation of adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliiothinae). Annals of the Entomological Society of America 97: 1221-1226.
- PURSEGLOVE, J. W. Tropical Crops, Dycotyledons. London, Longman, 1977. 719p.
- REED, W., LATEEF, S.S., and S. SITHANANTHAM, 1980. Insect pest management on chickpea. Pages 179- 187 in Proceedings of International Workshop on Chickpea Improvement, 28 Feb-2 Mar, 1979, Hyderabad, AP, India: ICRISAT, India.
- SHAGARODSKY, T; CHIANG, ML; LÓPEZ, Y. 2001. Evaluación de cultivares de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. Agronomía Mesoamericana 12: 95-98.
- SHARMA, RD. 1984. Algumas informações sobre a cultura do grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.). Brasília: Embrapa Cerrados, 20p. (Circular Técnica 18).
- SHARMA, HC; GOWDA, CL; STEVENSON, PC; RIDSDILL-SMITH, TJ; CLEMENT, GV. 2007. Host plant resistance and insect pest management in chickpea. In: S. S. Yadav, R. R. Redden, W. Chen, & S. B., Chickpea Breeding and Management. (pp. 520-539). Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- SOSA-GÓMEZ, DR; SPECHT, A; PAULA-MORAES, SV; LOPES-LIMA, A; YANO, SAC; MICHELI, A; MORAIS, EGF; GALLO, P; PEREIRA, PRVS, SALVADORI, JR; BOTTON, M; ZENKER, MM; AZEVEDO-FILHO, WS. 2016. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliiothinae) in Brazil. Revista Brasileira de Entomologia, 60: 101-104.
- SPECHT, A; SOSA-GOMEZ, DR; PAULA-MORAES, SV; YANO, SAC. 2013. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira 48: 689-692.
- ZALUCKI, MP; DAGLISH, GJ; FIREMPONG, S; TWINE, P.H. 1986. The biology and ecology of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *H. punctigera* Wallengreen (Lepidoptera:Noctuidae) in Australia: what do we know? Australian Journal of Zoology 34:779-814.

### **3 INSETOS-PRAGA HELIOTHINAE (LEPIDOPTERA NOCTUIDAE) ENCONTRADOS NO GRÃO-DE-BICO**

(Artigo aceito no periódico Horticultura Brasileira)

#### Resumo

O grão-de-bico é uma cultura com exploração comercial relativamente nova no país e, por isso, há poucas informações disponíveis sobre as suas principais pragas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar as espécies de insetos Heliiothinae no grão-de-bico no Distrito Federal e entorno. Foram realizadas coletas de lagartas diretamente nas plantas e de mariposas com armadilha luminosa. Foi constatada a presença de *Helicoverpa armigera*, *H. zea*, *Chloridea virescens* e *C. subflexa*, com predominância de *C. virescens*. Nas armadilhas luminosas, *H. armigera* foi a espécie predominante, resultado confirmado pela análise de PCR em tempo real. Foi registrada pela primeira vez *C. subflexa* se alimentando em grão-de-bico no Brasil.

**Palavras-chave:** – armadilha luminosa; PCR quantitativo; Citocromo Oxidase I; manejo de pragas

## PEST INSECTS HELIOTHINA (LEPIDOPTERA NOCTUIDAE) FOUND IN CHICKPEA.

### Abstract

Chickpeas is a relatively new commercial crop in the country and, therefore, there is little information available on its main insect's pests. The objective of the present work was to identify the species of Heliiothinae insects in chickpeas in the Federal District and surroundings. Caterpillars were collected on the plants and moths were collected with a light trap. The presence of *Helicoverpa armigera*, *H. zea*, *Chloridea virescens* and *C. subflexa* was observed, with a predominance of *C. virescens*. In the light traps, *H. armigera* was the predominant specie, a result that was confirmed by the real-time PCR analysis. *C. subflexa* feeding on chickpeas was recorded for the first time in Brazil.

**Keywords:** light trap, quantitative PCR; Cytochrome Oxidase I; pest management

### 3.1 Introdução

Com produção mundial de 10,1 milhões de toneladas por ano, o grão-de-bico é a terceira maior pulse (leguminosa de grão seco), ficando atrás das ervilhas (10,4 milhões ton/ano) e dos feijões (21,5 milhões de ton por ano) (Muehlbauer, Sarker 2017). A Índia é responsável por 70% da produção, com produtividade de 500 a 900 kg/ha (Muehlbauer, Sarker, 2017; Nascimento et al., 2016). No Brasil, a área de produção foi expandida cerca de 1000% no ano de 2018 e a produtividade chegou a 3 mil kg/ha (MAPA, 2018).

A baixa produtividade no Oriente decorre de manejo inadequado, baixa tecnificação e pragas como *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1809) (Lepidoptera: Noctuidae), subfamília Heliiothinae, na época no florescimento e maturação das vagens (Naseri et al., 2010; Ahmed, Khalique, 2012). Essa espécie que foi detectada em diversas regiões do Brasil em 2013 (Czepak et al., 2013; Specht et al., 2013), faz parte do Complexo *Helicoverpa*, reunião de diferentes espécies cuja identificação é baseada na morfologia externa, critério de difícil execução e precisão a campo (Behere et al., 2008).

Um complemento à identificação das espécies desse Complexo é o emprego de marcadores moleculares baseados em DNA, por genes mitocondriais como o citocromo oxidase I - COI (Arnemann et al., 2016). A identificação consiste na amplificação de um fragmento do gene por PCR seguindo-se de sequenciamento (Arnemann et al., 2016) ou digestão por enzima de restrição (Behere et al., 2008).

Em função da crescente expansão do plantio de grão-de-bico e relatos de aumento do ataque de lagartas, o presente trabalho objetivou identificar as principais espécies de Heliiothinae, do Complexo *Helicoverpa*, em grão-de-bico no Distrito Federal e entorno, com o emprego da PCR quantitativa para a rápida confirmação da identificação (Köppe et al., 2019).

### 3.2 Material e métodos

#### 3.2.1 Coletas de lagartas nos cultivos

Realizamos coleta manual de lagartas, no período da manhã, em ziguezague, nas safras de 2017 e 2018, em seis locais do Distrito Federal e entorno, Brasil. Os seis locais, identificados como LC (locais de coleta), foram: LC1- Embrapa Hortaliças, Pivô do campo experimental (15°56'11.1"S, 48°08'09.3"O), DF; LC2-Fazenda Garbanzo, Sob pivô, (16°10'03.4"S,

47°26'43.5''O), Entorno; LC3-Fazenda Alvorada, Pivô 1 (16°14'16.8''S, 47°25'44.5''O), Entorno; LC4-Fazenda Alvorada Pivô 2 (16°14'38.8''S, 47°23'19.4''O), Entorno; LC5-Feira Agrobrasília, Vitrine Tecnológica da Embrapa Hortaliças (16°00'46.8''S, 47°33'37.3''O) DF, LC6-Fazenda Sucupira de produção de sementes (15°54'53.0''S, 48°02'21.0''O), DF (Figura 4).

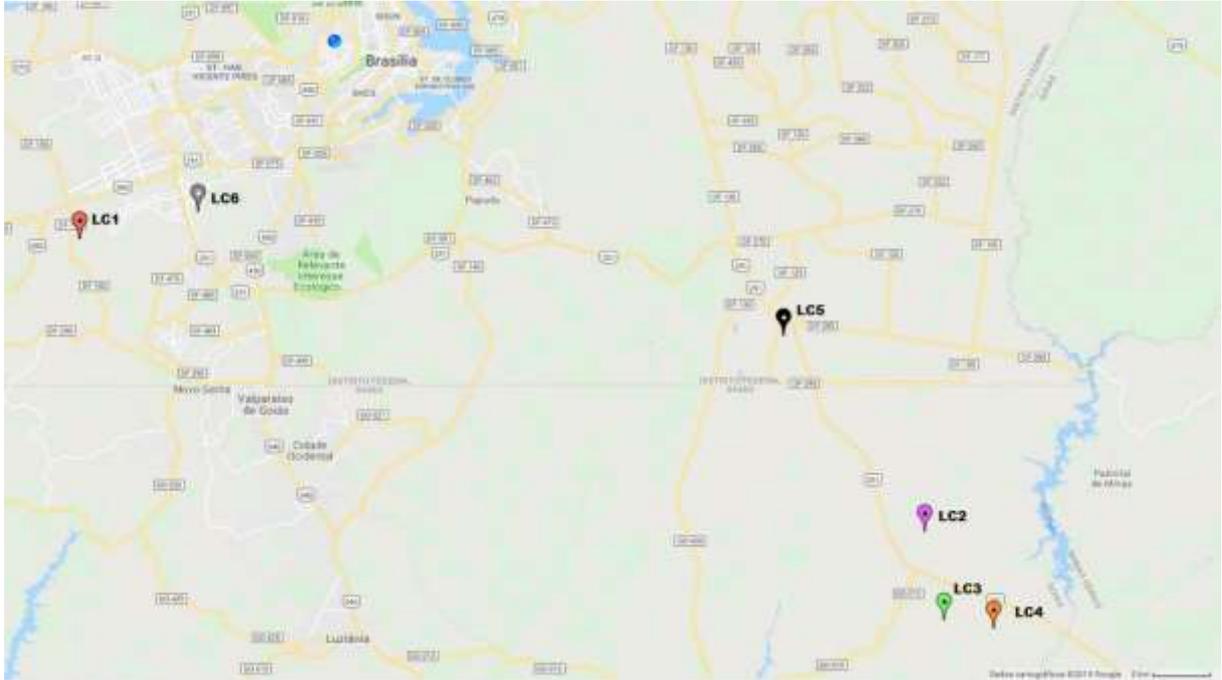


Figura 4. Mapa com os locais onde foram feitas as coletas manuais de lagartas e onde as armadilhas luminosas foram instaladas.

As lagartas foram individualizadas em potes de 30 ml com dieta artificial a base de levedo de cerveja e trigo (Greene et al., 1976), modificada (Montesano et al., 2013, 2014) (Figura 5, 6), mantidas nas condições  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $80\pm 2\%$  e fotofase de 12h. Após a metamorfose, as pupas ficaram em vermiculita umedecida até a emergência dos adultos, que foram mortos por congelamento e mantidos em álcool 90° GL (Figura 7).



Figura 5. Lagartas coletadas manualmente e individualizadas em potes plásticos com dieta artificial.



Figura 6. Detalhe da dieta artificial utilizada para a criação das lagartas até a fase adulta.



Figura 7. Lagarta transformada em pupa.

### 3.2.2 Captura de mariposas em armadilhas luminosas

Em quatro locais (LC1, LC2, LC3 e LC4) foram instaladas armadilhas luminosas do tipo “Luiz de Queiroz” (Biocontrole Ltda., SP, Brasil), a cerca de três metros da bordadura e a 1,50 m de altura. Elas eram acionadas ao entardecer e desligadas ao amanhecer, em dias consecutivos, na fase de lua nova de cada mês, entre março de 2017 e novembro de 2018 (Figura 8). A fase de lua nova, como é a mais escura do mês, foi utilizada para que não houvesse interferência na luminosidade da armadilha.



Figura 8. Conteúdo de armadilha luminosa sendo coletado para posterior triagem.



Figura 9. Conjunto de insetos coletados nas armadilhas luminosas antes de ser triado.



Figura 10. Processo de triagem em andamento do conteúdo das armadilhas luminosas.



Figura 11. Processo de triagem em andamento.

### 3.2.3 Identificação morfológica de adultos

Os insetos coletados manualmente e os capturados nas armadilhas foram separados e identificados por gênero, considerando características morfológicas, com base na Coleção de Referência da Embrapa Cerrados (Planaltina, DF). Os insetos foram sexados a partir do frênulo, um apêndice em forma de espinho presente nas asas anteriores de insetos adultos que serve para conectar as asas anteriores com as posteriores, influenciando na performance de voo. Para mariposas machos, o frênulo é composto de uma cerda única, mais espessa, enquanto que para as fêmeas, a cerda do frênulo é dupla e mais delgada (Figura 12).



Figura 12. A seta indica o frênulo simples, de uma cerda, presente em machos.

A identificação das espécies foi por comparação morfológica da genitália, conforme descrito por Hardwick (1965), Pogue (2004), Brambila (2009) e Bentivenha et al. (2016) e

Poole et al. (1993). As estruturas comparadas são a quantidade de espinhos nas valvas, nos machos, e o formato da Bursa copulatrix nas fêmeas (Figuras 13, 14, 15).

Os dados foram analisados pelo Software Bioestat 5.3 (Ayres et al., 2007).



Figura 13. Processo de sexagem de indivíduos adultos para a identificação morfológica.

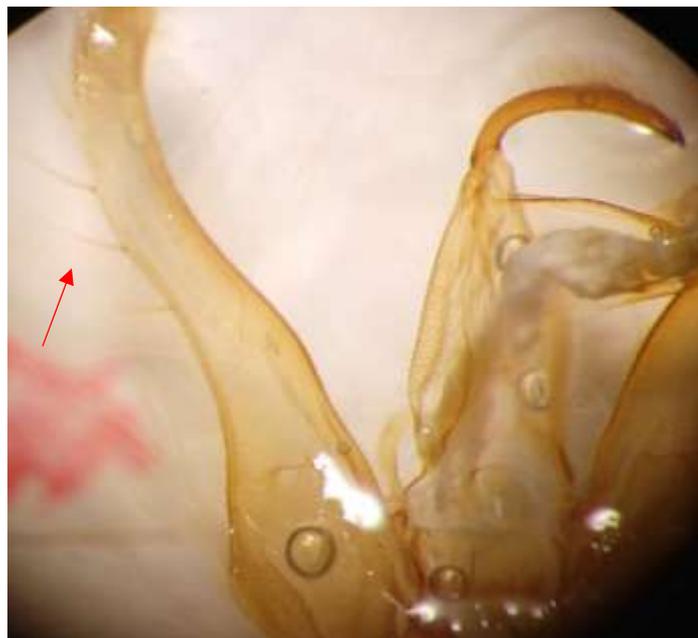


Figura 14. Detalhes das valvas, estruturas do aparelho reprodutor masculino em espécies de heliotíneos, que são usadas para a identificação das espécies a partir da quantidade de espinhos presentes, como indicado pela seta vermelha.



Figura 15. Aparelho reprodutor feminino de mariposa do gênero *Helicoverpa*. A diferença entre as espécies se dá pelo formato da ponta da *bursa copulatrix*, indicada pela seta vermelha.

### 3.3 Identificação molecular

Cento e cinco (105) insetos coletados, capturados nas armadilhas luminosas, foram processados individualmente através de método molecular para corroborar a presença de mariposas do gênero *Helicoverpa* no cultivo de grão-de-bico. As análises moleculares foram feitas no Laboratório de Bactérias Entomopatogênicas e Controle Biológico, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

### 3.4 Obtenção de ácidos nucleicos totais

Cada inseto foi processado para a obtenção dos seus respectivos ácidos nucléicos totais. O inseto era retirado do álcool e colocado para secar por 5 min. Cada inseto foi colocado em um tubo plástico de 1,5 ml e macerado (cabeça, tórax e abdômen) com bastão plástico (Figura 16).

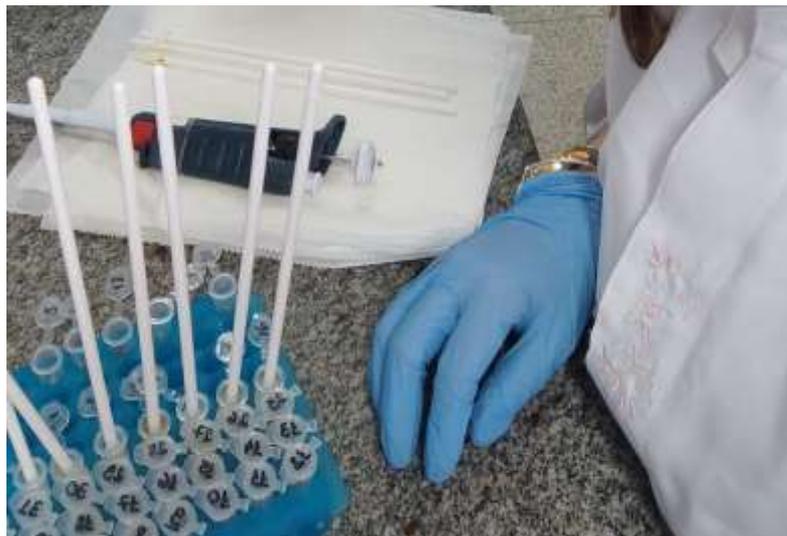


Figura 16. Os 105 insetos foram processados individualmente para extração de DNA.

Adicionou-se 500  $\mu$ l da solução tampão de lise (Tris-HCl 100 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0, NaCl 1,4 M e Triton X-100 0,3%).

Cada tubo foi submetido a turbilhonamento por 5 s adicionando-se proteinase K na concentração final de 120  $\mu$ g/ml. Seguiu-se a homogeneização por inversão dos tubos por 5 vezes e incubação a 37 °C por 40 min. Ao final, adicionou-se, lentamente, 1 ml de álcool etílico gelado. O homogenato foi mantido a 4 °C por 48 h.

O DNA precipitado foi coletado com pipeta Pasteur descartável, centrifugado a 12.000 rpm por 5 min, descartando-se o sobrenadante. Foram realizadas duas lavagens com 500 ul de etanol 70% a 12.000 rpm por 5 min. O pellet com o DNA secava à temperatura ambiente e era ressuspenso em 20 ul de tampão TE 0,1X. As amostras foram quantificadas por fluorimetria no aparelho QUANTUS™ (Promega) calibrado para 1ng/μl. A pureza das amostras de DNA foi verificada utilizando-se o aparelho Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer.

### 3.5 Identificação molecular

A identificação das espécies foi feita a partir do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI) utilizando-se os oligonucleotídeos de PCR em tempo real HaF#4 (5'CCC TAT TAA ATT TAA ACT GGG A3') e HaR#4 (5'TAG ACG AAG TTT ATA CAT TAA TAA G3') para *H. armigera* e *H. zea*.

Cada reação foi preparada adicionando-se 10 ul do mix GoTaq qPCR Master Mix (Promega), 0,4 ul de cada primer na concentração de 10 uM, 0,2 ul de CXR Reference Dye (Promega), 2 ul de DNA (10 ng/ul) e água nuclease-free suficiente para completar 20 ul de reação.

A amplificação por qPCR durante a termociclagem seguiu o protocolo de desnaturação a 95 °C por 2 min, 44 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos e anelamento a 50 °C por 3 segundos, com etapa de polimerização de 72 °C no equipamento da marca AB Applied Biosystems Step One Plus Real Time PCR System®, no laboratório de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF).

### 3.6 Padronização da curva de qPCR

A partir da quantificação do DNA preparou-se uma solução estoque de 10 ng/ul tanto para *H. armigera* quanto para *H. zea*. Realizou-se uma diluição seriada (1:2) para obter valores e concentrações finais de 5 ng/μl, 2,5 ng/μl, 1,25 ng/μl e 0,625 ng/μl. Cada ponto foi feito em triplicata, determinando-se, então, os parâmetros de  $C_T$ ,  $R^2$ , eficiência (eff%), Y-intercept e Slope.

### 3.7 Resultados

## Coleta de lagartas

Foram coletadas e postas em dieta artificial 774 lagartas que estavam se alimentando diretamente em plantas de grão-de-bico, das quais 581 sobreviveram até a fase adulta e foram identificadas primeiramente em nível de gênero, como *Helicoverpa* e *Chloridea*. As demais (193) pereceram por parasitismo de Diptera (Tachinidae) e Hymenoptera, ou por fungos entomopatogênicos.

As lagartas *Chloridea* somaram 404 coletadas (69,54%), sendo que uma amostra de 40, após se tornarem adultas, foram dissecadas e identificadas morfológicamente, resultando 36 indivíduos *Chloridea virescens* e quatro *Chloridea subflexa* (Guenée, 1852).

Do gênero *Helicoverpa* foram coletadas 177 (30,46%), tendo sido uma amostra de 51 dissecadas, onde 33 foram identificadas como *H. armigera* e 18 *H. zea*.

Pelo teste Qui-quadrado de comparação, demonstrou-se que o número de lagartas de *Chloridea* coletadas diretamente em plantas de grão-de-bico foi significativamente maior que de *Helicoverpa* ( $\chi^2 = 87,91$ ; gl=1,  $p < 0,0001$ ).

A distribuição por data de coleta está representada na Figura 17. A razão entre *Chloridea* e de *Helicoverpa* coletadas em grão-de-bico foi de 7:3.

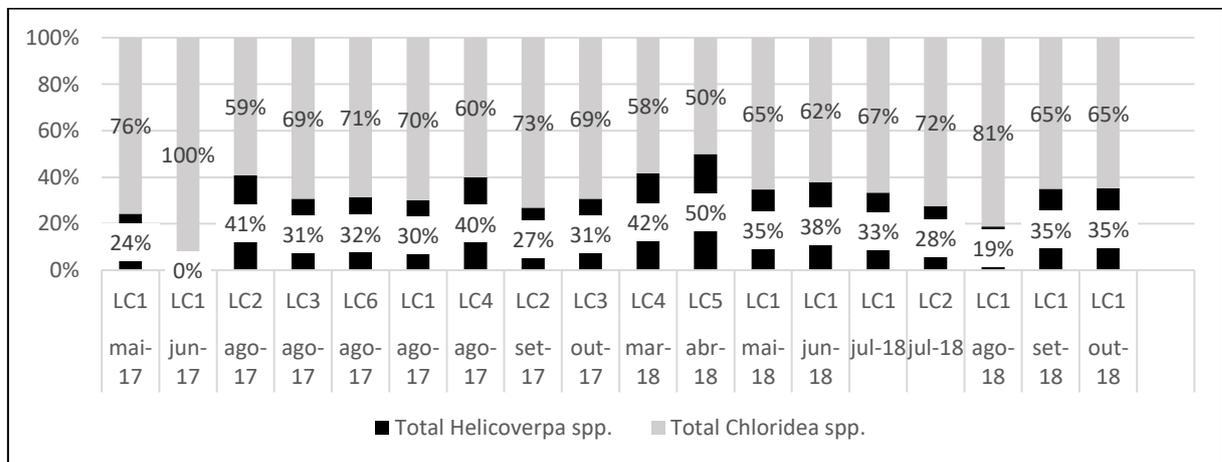


Figura 17. Proporção entre as espécies encontradas se alimentando diretamente no grão-de-bico, em lavouras do Distrito Federal e áreas produtoras adjacentes, nas diferentes datas de coleta.

## Capturas em armadilhas luminosas

Nas armadilhas luminosas foram capturadas 7.068 mariposas, das quais 1.411 pertenciam ao gênero *Helicoverpa* (19,96%), significativamente maior ( $\chi^2 = 1067$ ; gl=1;  $p <$

0,0001) que *Chloridea*, onde apenas 129 insetos foram capturados (1,82%). As demais 5.528 não se caracterizam como pragas, sendo um grupo composto por diversas outras espécies silvestres sem importância agrícola.

### 3.8 Identificação molecular

Os iniciadores de PCR em tempo real foram desenhados a partir da região correspondente ao gene citocromo oxidase I (COI) do isolado de *H. armigera* Ug32L (GenBank: MG437196.1). O desenho dos iniciadores foi feito pelo programa PrimerQuest Tool que está disponível no sítio de internet IDT Integrated DNA Technologies (<https://www.idtdna.com/pages>). Em seguida, foi feita a análise das condições de funcionamento dos iniciadores utilizando-se o programa PCR Primer Stats disponível no sítio Sequence Manipulation Suite (<https://www.bioinformatics.org/sms2/>). Uma vez avaliada a funcionalidade dos iniciadores de PCR em tempo real, foi analisada a sua capacidade de anelamento com a sequência alvo por meio do programa Geneious (Kearse et al., 2012) e por análise de identidade de sequência realizando-se o BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Pelo programa Geneious foi possível confirmar *in silico* o anelamento dos iniciadores com a região interna correspondente ao gene COI (Figura 18). A análise da identidade de sequência dos iniciadores de PCR mostrou alta identidade para *H. armigera* (Quadro 1).

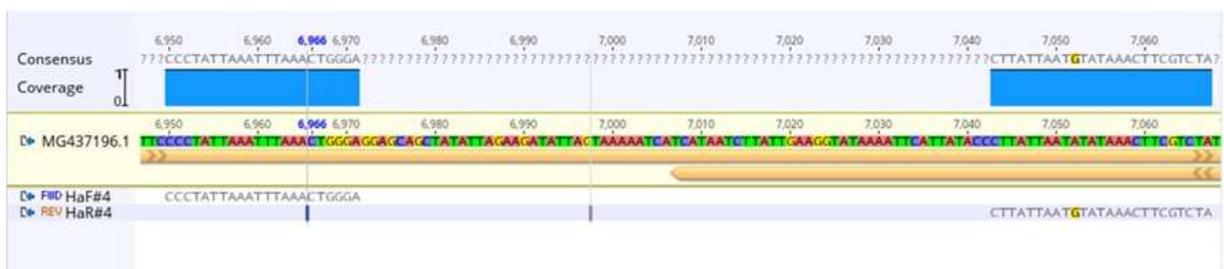


Figura 18 - Locais de hibridação dos iniciadores (HaF#4/HaR#4) de PCR em tempo real nas regiões internas correspondentes ao gene citocromo oxidase I (COI) de *H. armigera*.

Quadro1 - Análise da identidade de sequência dos iniciadores de PCR em tempo real utilizados na identificação de *H. armigera*.

Iniciador	Identidade	Descrição	Acesso
HaF#4	100%	<i>Helicoverpa armigera armigera</i> isolate Ug32L mitochondrion, complete genome	MG437196.1
HaR#4	100%	<i>Helicoverpa armigera armigera</i> isolate M0001 mitochondrion, complete genome	MG437193.1

As curvas de identificação foram determinadas a partir das diluições de DNA compreendidas entre 10 ng/ul até 0,625 ng/ul obtendo-se os parâmetros estabelecidos por Bustin et al. (2009). Surpreendentemente, o conjunto de iniciadores HaF#4/HaR#4 produziu perfis de amplificação capazes de discriminar *H. armigera* e *H. zea* (Quadro 2).

Quadro 2 – Parâmetros de amplificação dos iniciadores de PCR em tempo real HaF#4/HaR#4 para a identificação de *H. armigera* e *H. zea*.

Espécie	Slope	Y-inter	R <sup>2</sup>	Eff%	C <sub>T</sub> ± DP
<i>H. armigera</i>	-3,322	25,453	0,951	99,993	22,998 ± 0,065
<i>H. zea</i>	-3,292	31,652	0,958	101,264	29,105 ± 0,170

Obteve-se a curva padrão de amplificação dos iniciadores para *H. armigera* e *H. zea* (Figura 19).

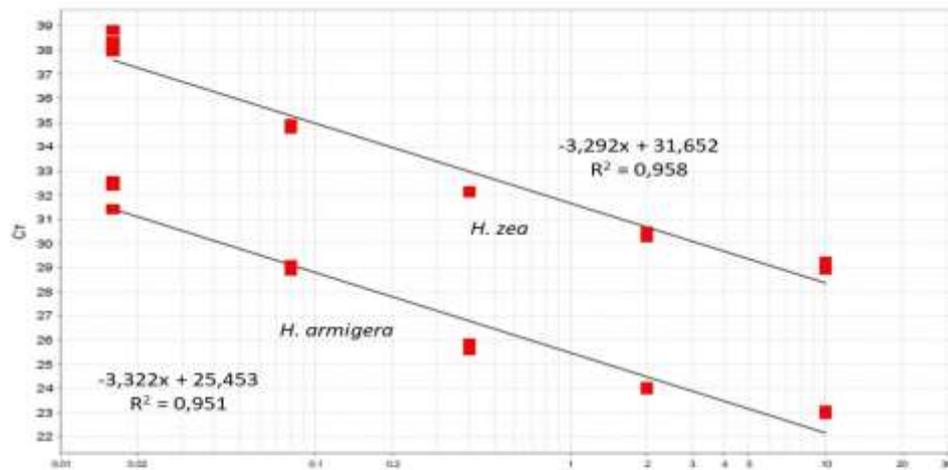


Figura 19. Curva padrão estabelecida para a identificação molecular por PCR em tempo real para as espécies de *H. armigera* e *H. zea*.

Os iniciadores desenhados para a identificação de *H. armigera* discriminaram, também, *H. zea*, com ciclos de amplificação ( $C_T$ ) distintos, com valor de  $C_T = 22,998 \pm 0,065$  para *H. armigera* e  $C_T = 29,105 \pm 0,170$  para *H. zea*.

Com o estabelecimento das condições de amplificação e determinação das curvas padrão, procedeu-se a identificação molecular das 105 amostras das armadilhas luminosas. Obteve-se um perfil de amplificação com  $C_T = 23$ , correspondente ao estabelecido para *H. armigera* para 100% das amostras testadas.

### 3.9 Discussão

Em 2018 foi registrada pela primeira vez *H. armigera* se alimentando em grão-de-bico no Distrito Federal, conforme publicado por Reyes et al. (2018), a presente autora, como resultado das coletas de insetos executadas neste presente trabalho. Lourenção et al. (1989) haviam registrado *C. virescens* em grão-de-bico no Brasil, assim como Castelo Branco et al. (1989). *C. virescens* é praga importante de grão-de-bico em outros países da América conforme (Pérez et al., 2012; Blanco et al., 2007; Sharma et al., 2007; Shagarodsky et al., 2001). O padrão encontrado neste trabalho, onde *C. virescens* é a praga predominante nas plantas da pulse,

corroborar esses dados. O presente trabalho também é o primeiro registro de *C. subflexa* em grão-de-bico no Brasil. *C. subflexa* é uma mariposa considerada uma praga endêmica de tomateiro, aparecendo como uma praga secundária no grão-de-bico, porém com potencial para causar danos severos caso sua população venha a explodir.

*C. virescens* foi a espécie mais abundante encontrada nas plantas de grão-de-bico, porém com baixa captura de adultos nas armadilhas luminosas. Isso pode indicar que esta não é a melhor forma de monitoramento de adultos dessa espécie. Leppla et al. (1979) citam que alguns lepidópteros são menos ativos na escotofase (fase sem luz do sol), e a luz da armadilha não é eficaz em sua captura. Sugere-se que outras armadilhas sejam testadas para testar a eficiência de monitoramento dessa espécie nas lavouras de grão-de-bico.

Para *Spodoptera exigua* (Noctuidae:Heliiothinae), machos são mais ativos que fêmeas na escotofase, porque seu comportamento de voo é de procura e chamamento da fêmea e esses insetos podem ter uma percepção diferente à luz da armadilha. Para *S. exigua*, a atividade das fêmeas ocorre logo após o nascer do sol provavelmente para forrageamento e oviposição. Para Deslisle et al. (1998), fêmeas de mariposas da família Geometridae são mais capturadas em armadilhas luminosas se copuladas, indicando que o voo de fêmeas capturadas nessas condições pode estar relacionado à seleção de sítio de oviposição. A hipótese é que um comportamento similar ocorra com *C. virescens* e que a sua movimentação noturna seja baixa, conservando energia para a cópula e procura diurna de sítios de forrageamento e oviposição.

A maior quantidade de lagartas do gênero *Helicoverpa* foi encontrada na época de pleno florescimento ou maturação de vagens, por oferecerem sítio de forrageamento, reforçando resultados encontrados por Patel; Koshiya (1999), Naseri et al. (2010), Ahmed; Kalique (2012) e Damte; Ojiewo (2017) (Figura 20).

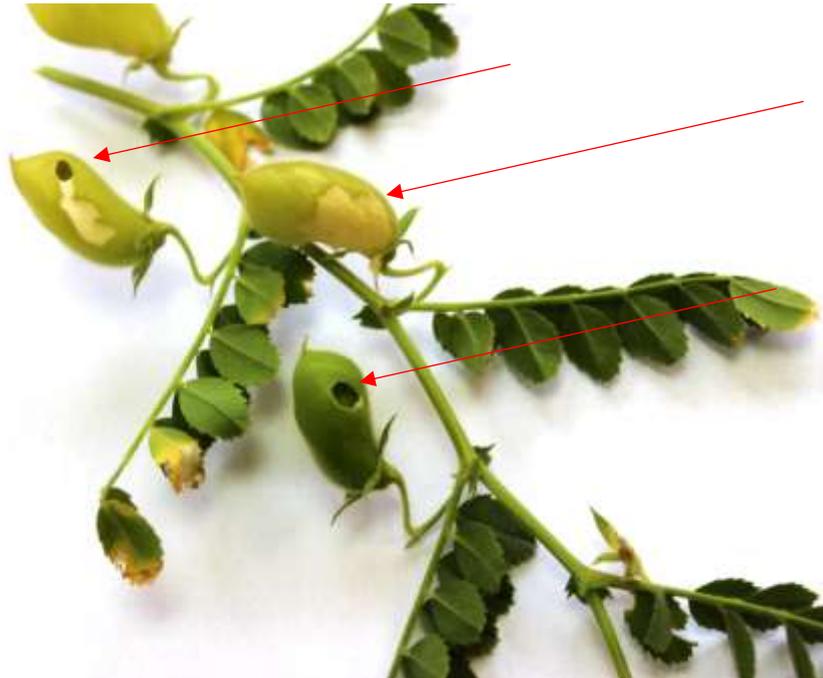


Figura 20. As setas vermelhas mostram os danos causados por lagartas em planta de grão-de-bico em época de maturação das vagens.

*H. armigera* migra curtas e longas distâncias entre as plantas hospedeiras (Feng et al., 2010). Para Blum et al. (2018) as migrações *H. armigera* ocorrem entre as culturas em maturação e as em desenvolvimento, em busca de sítios para postura. Para Damte e Ojiewo (2017), barreiras mecânicas podem restringir a dispersão, aumentando o tempo de procura por hospedeiro para a oviposição, o que pode ter favorecido o aparecimento de *H. armigera* no grão-de-bico, pois as áreas de cultivo nos locais de instalação das armadilhas luminosas eram cercadas por diversas outras culturas que também são hospedeiras de *H. armigera*. Para esses autores, o cultivo de plantas hospedeiras como sorgo e soja, antes do plantio do grão-de-bico no mesmo local e/ou áreas adjacentes, dá a oportunidade para a população do inseto crescer e aparecer mais cedo em lavouras secundárias em importância. Isso pode explicar os picos populacionais de *Helicoverpa* fora da época de cultivo de grão-de-bico, indicando que a população está estabelecida na área e migra para o grão-de-bico apenas quando oportuno.

Para Jallow et al. (1999) a presença de *H. armigera*, na fase reprodutiva das plantas, deve-se às fêmeas preferirem néctar e exsudatos de flores, pois eles influenciam as respostas olfativas e a oviposição pela ação de compostos químicos gerados pelo metabolismo secundário das plantas, um comportamento plausível em um inseto polígrafo. A explicação para a presença de *C. virescens* nas plantas pelo mesmo motivo também é plausível.

No presente trabalho, mesmo entre populações de insetos que foram atingidas por aplicações de inseticidas químicos, as plantas continuaram infestadas por lagartas. Para Damte e Ojiewo (2017), a explicação pode ser resistência dos insetos aos ingredientes ativos, pouco tempo de aplicação, baixa cobertura, tamanho da gota do pulverizador, má calibragem do equipamento e diferentes tamanhos de lagartas. A maioria das lagartas se alimentavam dentro das vagens, protegidas de aplicações superficiais. O tamanho das lagartas é um grande dificultador de aplicação de inseticidas, pois sua eficiência vai diminuindo quando a lagarta vai mudando de ínstaes e se desenvolvendo. Outros inseticidas que não de contato devem ser investigados para medir a maior eficiência para o uso dessa ferramenta de forma sustentável.

Para Barbosa et al. (2016), por *H. armigera* ser exótica, ela tem vantagens adaptativas, população em crescimento acelerado com o ciclo de vida 28% mais curto que *H. zea*, resultando em várias gerações por ano, insetos de diferentes espécies e estádios ao mesmo tempo no campo, sendo, portanto, um dificultador do manejo.

### 3.10 Identificação molecular

O gene citocromo oxidase I (COI) é um marcador molecular eficaz e tem sido utilizado para a identificação de espécies de diversos grupos taxonômicos (Dawnay et al., 2007; Pagès et al., 2009). Uma região da sequência desses genes apresenta diversidade, suas proteínas contêm domínios funcionais conservados e regiões variáveis (Miranda, 2019). De acordo com o mesmo autor, o gene COI é muito utilizado como “DNA barcode” e tem potencial para a descrição de espécies crípticas. Essa ferramenta molecular foi eficaz na identificação da espécie e confirmou a presença de *H. armigera* nas amostras analisadas.

As larvas de *H. armigera* e *H. zea* apresentam proximidade morfológica e molecular. A identificação por métodos moleculares de precisão como a PCR quantitativa torna possível a distinção de *H. armigera* das demais espécies de ocorrência no Brasil (Specht et al., 2013).

O sistema de PCR quantitativo (qPCR) foi utilizado para identificar as espécies de *Helicoverpa*. Mesmo o qPCR sendo um método mais oneroso, ele apresenta compensação pela velocidade na obtenção dos resultados e a alta sensibilidade para a detecção de marcadores genéticos a partir de amostras com pouco DNA ou em estado de degradação. Para as análises foram necessárias quantidades em torno de 10 ng/ul, o que permitiu estabelecer o perfil de identificação das amostras.

Um resultado surpreendente foi a amplificação das amostras de *H. zea*. Em condições de estabelecimento de reações de PCR, a co-amplificação apresenta-se como um problema de difícil solução. Mas neste caso as amostras de *H. zea* usadas como controle apresentaram um CT com diferença de 7 ciclos, garantindo uma amplificação independente e diferente das amostras de *H. armigera*. Isso permite usar apenas um conjunto de iniciadores de PCR em espécies diferentes, com economia de tempo e reagentes.

As relações entre as espécies de *Helicoverpa* e a natureza dos marcadores moleculares mitocondriais ajudam a levantar questões a respeito da dinâmica entre elas. Os dados sugerem uma curta distância genética entre as espécies (Behere et al., 2007). Os iniciadores de qPCR desenvolvidos nesse estudo foram baseados em regiões altamente conservadas do gene mitocondrial COI para a amplificação de fragmentos curtos (150 pb). Dessa forma, tem-se a vantagem de se obter maior eficiência de identificação a partir de fragmentos curtos de DNA (Muraji; Nakahara, 2002).

Entre a coleta dos espécimes em campo e sua análise molecular, passaram-se entre 3 e 4 anos por diversos motivos, entre eles a pandemia de Covid-19. Assim, quando as amostras puderam ser analisadas, algumas já estavam em avançado estado de decomposição, ausência de álcool por evaporação, entre outros motivos. Dessa forma, pensamos que não seria viável a extração de DNA em quantidade e qualidade suficientes para as análises moleculares.

Não foram usados Kits comerciais de extração de DNA e sim o protocolo descrito no Material e Métodos, de forma que as amostras ficaram 15 dias entre a maceração e a retirada do sobrenadante para as análises. O intervalo de 15 dias foi estabelecido para que conseguíssemos a maior quantidade possível de DNA das amostras.

O resultado foi animador pois obtivemos quantidade suficiente de DNA nas amostras para as análises moleculares. No processo de quantificação de DNA no aparelho QUANTUS calibrado para 1ng/μl, obtivemos os resultados mostrados no Quadro 03.

Quadro 03. Quantificação das amostras de DNA obtidas de insetos do gênero *Helicoverpa* no aparelho QUANTUS™ (Promega) calibrado para 1ng/μl

Nº da amostra	ng/μl	Nº da amostra	ng/μl	Nº da amostra	ng/μl
1	25	36	17	71	25
2	13	37	7,3	72	75
3	37	38	18	73	13
4	24	39	41	74	43
5	16	40	10	75	61
6	25	41	7,7	76	96
7	19	42	4,33	77	27
8	16	43	23	78	34
9	14	44	13	79	62
10	21	45	21	80	82
11	12	46	9,8	81	36
12	17	47	26	82	34
13	13	48	65	83	49
14	15	49	22	84	96
15	14	50	34	85	60
16	5,2	51	31	86	27
17	16	52	14	87	62
18	14	53	30	88	112
19	13	54	28	89	90
20	62	55	12	90	40
21	10	56	19	91	22
22	13	57	12	92	15
23	5,5	58	16	93	21
24	7,9	59	50	94	35
25	25	60	10	95	22
26	15	61	20	96	50
27	26	62	59	97	16
28	13	63	24	98	19
29	33	64	14	99	36
30	13	65	12	100	64
31	16	66	41	101	19
32	15	67	33	102	16
33	20	68	11	103	54
34	11	69	29	104	18
35	18	70	82	105	34

A obtenção de DNA viável em amostras comprometidas, através do protocolo desenvolvido, abre um horizonte importante. Tanto em coleções e museus entomológicos

quanto em amostras obtidas através da entomologia forense a obtenção de DNA viável às vezes pode se mostrar difícil de obter. Essa técnica, entretanto, com o tempo de descanso de 15 dias antes da coleta do sobrenadante, mostra-se com grande potencial para o uso nessas áreas.

### 3.11 Conclusões

Como conclusão, indicamos que foram identificadas quatro espécies de Heliothinae se alimentando em grão-de-bico no Distrito Federal e entorno: *H. armigera*, *H. zea*, *C. virescens* e *C. subflexa*, sendo predominante *C. virescens*. Apesar de termos encontrado *H. armigera* se alimentando em grão-de-bico, a proporção entre *C. virescens* e *H. armigera* é de 7:3 entre as espécies, de forma que *H. armigera* é praga presente, porém em segundo lugar. É provável que *H. armigera* apareça nas lavouras apenas por oportunismo, vinda dos campos ao redor, não sendo a pulse seu alimento principal.

Foi registrada pela primeira vez *C. subflexa* se alimentando de grão-de-bico no Brasil. Essa espécie é importante praga de tomate e é interessante fazer maiores observações antes que ela possa virar um problema.

As diferentes espécies formam um complexo, ocorrendo simultaneamente em estádios de desenvolvimento diferentes, impondo desafios ao seu manejo no campo principalmente pela diversidade de tamanhos das lagartas das espécies identificadas.

Desenvolveu-se um método de identificação molecular por qPCR para a identificação simultânea de *H. armigera* e *H. zea.*, utilizando os mesmos iniciadores, reduzindo trabalho e custo na identificação molecular através da extração de DNA.

### 3.12 Referências

- AHMED, K.; KHALIQUE, F. 2012. Oviposition and Larval Development of *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae) in Relation With Chickpea, *Cicer arietinum* L. (Fabaceae) Crop Phenology. **Pakistan J. Zool.**: 44(4) 1081-1089.
- ARNEMANN JA, JAMES WJ, WALSH TK, GUEDES JV, SMAGGHE G, CASTIGLIONI E, TAY WT. Mitochondrial DNA COI characterization of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Paraguay and Uruguay. *Genet Mol Res.* 2016 Apr 7;15(2). doi: 10.4238/gmr.15028292. PMID: 27173209.
- AYRES, M; AYRES JÚNIOR, M; AYRES, DL; SANTOS, A.S. 2007. **BioEstat 5.0**: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: MCT; IDSM; CNPq, 364 p. il. Acompanha CD-ROM.
- BARBOSA, TAN; MENDES, SM; RODRIGUES, GT; RIBEIRO, PEA; SANTOS, CA; VALICENTE, FH; OLIVEIRA, CM. 2016. Comparison of biology between *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) reared on artificial diets. *Florida Entomologist* 99: 72-76.
- BEHERE, G.T.; TAY, W.T.; RUSSELL, D.A. et al. 2007. Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to *H. zea*. *BMC Evol Biol* 7, 117. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-117>
- BENTIVENHA, JPF; PAULA-MORAES, SV; BALDIN, ELL; SPECHT, A; DA SILVA, IF; HUNT, TE. 2016. Battle in the New World: *Helicoverpa armigera* versus *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE* 11: e0167182.
- BLANCO, CA; TÉRAN-VARGAS, AP; LÓPEZ, JD; KAUFFMAN, JV; WEI, X. 2007. Densities of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in three plant hosts. *Florida Entomologist* 90: 742-750.
- BLUM, M; NESTEL, D; COHEN, Y; GOLDSHTEIN, E; HELMAN, D. 2018. Predicting *Heliothis (Helicoverpa armigera)* pest population dynamics with an age-structured insect population model driven by satellite. *Ecological Modelling* 369: 1-12.
- BRAMBILA, J. 2009. Instructions for dissecting male genitalia of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae) to separate *H. zea* from *H. armigera*. Disponível em: [https://www.aphis.usda.gov/plant\\_health/plant\\_pest\\_info/owb/downloads/owb-screeningguids2.pdf](https://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/owb/downloads/owb-screeningguids2.pdf). Acessado em 03 de março 2017.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- CASTELO BRANCO, M; VILLAS BOAS, GL; LOPES, JF; GIORDANO, LB. 1989. Avaliação de grão-de-bico para resistência a *Heliothis virescens*. *Horticultura Brasileira* 7: 49. Resumo.
- CHENG, WJ; ZHENG, XL; WANG, P; ZHOU, LL; SI, SY; WANG, XP. 2016. Male-biased capture in light trap in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae): results from the studies of reproductive activities. *Journal of Insect Behaviour* 29: 368-378.
- CZEPACK, C; ALBERNAZ, KC; VIVIAN, LM; GUIMARÃES, HO; CARVALHAIS, T. 2013. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 43: 110-113.
- DAMTE, T; OJIEWO, CO. 2017. Incidence and within field dispersion pattern of pod borer, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in chickpea in Ethiopia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 50: 868-884.
- DAWNAY N, OGDEN R, MCEWING R, CARVALHO GR, THORPE RS. Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Sci. Int.* 2007; 173: 1-6.

- DESLISLE, J.; WEST, RJ; BOWERS, WW. 1998. The relative performance of pheromone and light traps in monitoring the seasonal activity of both sexes of the eastern hemlock looper, *Lambdina fiscellaria fiscellaria*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 89: 87-98.
- FENG, H; GOULD, F; HUANG, Y; JIANG, Y; WU, K. 2010. Modeling the population dynamics of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) over a wide área in northern China. *Ecological Modelling* 221: 1819-1830.
- GREENE, G.L., LEPPLA, N. C., DICKERSON W. A. Velvetbean Caterpillar: A Rearing Procedure and Artificial Medium, *Journal of Economic Entomology*, Volume 69, Issue 4, 1 August 1976, Pages 487–488, <https://doi.org/10.1093/jee/69.4.487>
- HARDWICK DF. 1965. The corn earworm complex. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 97: 5–247.
- JALLOW, MFA; ZALUCKI, MP; FITT, GP. 1999. Role of chemical cues from cotton in mediating host selection and oviposition behaviour in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), *Australian Journal of Entomology* 38: 359–366.
- LEPPLA, NC; HAMILTON, EW; GUY, RH; LEE, FL. 1979. Circadian rhythms of locomotion in six noctuids species. *Annals Entomology Society of America* 72: 209-215.
- LOURENÇÃO, AL; BRAGA, NR; NAGAI, V. 1989. Comportamento de genótipos de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) em relação a *Heliothis* spp. (Lepidoptera: Noctuidae). In: Congresso Brasileiro de Entomologia, 12, Belo Horizonte. Resumos, Belo Horizonte, Sociedade Entomológica do Brasil, v. 2, p. 381.
- MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. 2018. Plano Nacional de Desenvolvimento da Cadeia do Feijão e *Pulses* – PNDCFP, 40p.
- MIRANDA, RAFAEL DE SOUZA. Filogenética dos Genes que Codificam as Subunidades I e II da Citocromo Oxidase de *Trypanosoma cruzi* – Belo Horizonte, 2019 – dissertação de mestrado, 61p.
- MUEHLBAUER, FJ; SARKER, A. 2017. Economic importance of chickpea: production, value, and world trade. In: VARSHNEY, RK. et al. (eds.) *The chickpea genome, Compendium of plant genomes* p 5-12.
- MURAJI, M; NAKAHARA, S. 2002. Discrimination among pest species of *Bactrocera* (Diptera: Tephritidae) based on PCR-RFLP of the mitochondrial DNA. *Applied Entomology and Zoology* 37, 437–446.
- NASCIMENTO, WM; SILVA, PP; ARTIAGA, OP; SUINAGA, FA. 2016. Grão-de-bico. In: NASCIMENTO, WM (ed). *Hortaliças Leguminosas*. Embrapa, Brasília, 2016. p. 89-118.
- NASERI, B.; FATHIPOUR, Y.; MOHARRAMIPOUR S.; HOSSEININAVEH, V.; GATHEHOUSE AMR. 2010. Digestive proteolytic and amylolytic activities of *Helicoverpa armigera* in response to feeding on different soybean cultivars. *Pest Management Science* 66: 1316-1323.
- PAGÈS N, MUÑOZ-MUÑOZ F, TALAVERA S, SARTO V, LORCA C, NÚÑEZ JI. Identification of cryptic species of *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) in the 55 subgenus *Culicoides* and development of species-specific PCR assays based on barcode regions. *Veterinary Parasitology*. 2009; 165(3-4): 298-310.
- PATEL, CC; KOSHIYA, DJ. 1999. Seasonal abundance of American bollworm, *Helicoverpa armigera* on different crop host at Junagadh (Gujarat). *Indian Journal of Entomology* 59: 396-401.
- PÉREZ, JC; SURIS, M. 2012. Ciclo de vida y reproducción de *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) sobre garbanzo. *Revista de Protección Vegetal* 27: 85-89.
- POGUE, MG. 2004. A new synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiation of adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliiothinae). *Annals of the Entomological Society of America* 97: 1221-1226.

- POOLE, RW; C. MITTER; M. HUETTEL. 1993. A revision and cladistic analysis of the *Heliothis virescens* species-group (Lepidoptera:Noctuidae) with a preliminar morphometric analysis of *Heliothis virescens*. Mississippi Agricultural and Forestry Experiment Station, Mississippi State University, Bost North, MS, USA.
- REYES, CP; NASCIMENTO, WM; MICHEREFF FILHO, M; SPECHT, A; CARDOSO, FR. 2018. *Helicoverpa armigera* e *H. zea* (Noctuidae: Heliethinae) em grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) no Distrito Federal, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 27.; CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE ENTOMOLOGIA, 10., Gramado. Saúde, ambiente e agricultura: anais. Gramado: SEB, 2018. p. 1044. Resumo.
- SHAGARODSKY, T; CHIANG, ML; LÓPEZ, Y. 2001. Evaluación de cultivares de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. *Agronomía Mesoamericana* 12: 95-98.
- SHARMA, HC; GOWDA, CL; STEVENSON, PC; RIDSDILL-SMITH, TJ; CLEMENT, GV. 2007. Host plant resistance and insect pest management in chickpea. In: S. S. Yadav, R. R. Redden, W. Chen, & S. B., Chickpea Breeding and Management. (pp. 520-539). Wallingford, United Kingdom: CAB International.
- SPECHT, A; SOSA-GOMEZ, DR; PAULA-MORAES, SV; YANO, SAC. 2013. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 48: 689-692.

**NOTA EXPLICATIVA:**

Ao conduzir a primeira parte deste trabalho, para a extração de DNA das mariposas, tentou-se diversos protocolos para obter DNA viável para as análises moleculares. Entretanto, nenhum dos protocolos vigentes na ocasião se mostraram eficientes para extração de DNA das amostras. Assim, no decorrer do trabalho, foi-se adaptando os protocolos já existentes até uma forma que atendesse a demanda.

O texto a seguir refere-se a esse protocolo que foi desenvolvido e mostrou-se bastante eficaz na obtenção de DNA das amostras que ficaram bastante comprometidas pelo decorrer dos anos de realização desse trabalho.

## 4 PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE *HELICOVERPA ARMIGERA* EM ESTADO DE CONSERVAÇÃO INADEQUADO

### 4.1 INTRODUÇÃO

Existem cerca de 365 espécies de mariposas da família Noctuidae, subfamília Heliiothinae (MATTHEWS, 1999) e entre elas estão *Helicoverpa armigera* e *H. zea*, espécies polífagas, que estão entre as principais pragas agrícolas do mundo (ZALUCKI *et al.*, 1986; NASERI *et al.*, 2010).

Como são espécies vorazes, as perdas econômicas causadas por esses insetos chegaram a somas de US\$ 1 bilhão nos anos de 2012/2013 no mundo todo. Para reduzir esses danos econômicos, a identificação precisa das espécies, de forma a subsidiar a tomada de decisão pelos produtores é extremamente necessária (MASTRANGELO, 2014).

Análises moleculares têm sido utilizadas nas últimas décadas para confirmar a identificação de insetos, anteriormente era feita pelo método morfológico. Elas também podem ser importantes ferramentas para a manutenção de bancos genéticos de populações raras (MANDRIOLI *et al.*, 2006).

Para que as análises moleculares sejam efetivas, existem técnicas de armazenamento adequado dos espécimes para a extração de DNA e isso inclui temperatura e ambiente adequados, assim como meio líquido apropriado (FUKATSU, 1999). A extração de DNA para análises laboratoriais pode ser de custo extremamente elevado quando são usados kits comercializados por grandes empresas.

FUKATSU (1999) sugeriu que acetona é o melhor líquido para preservação de DNA de mariposas, porém o álcool 100% e o álcool 96° GL também mantêm a viabilidade das amostras, além de ter um custo mais baixo, tornando-o mais viável para a execução de pesquisas.

A falta de recursos, entretanto, pode afetar o ambiente da coleção de forma que os espécimes se deteriorem caso não sejam armazenados corretamente e a dificuldade de acesso a esse patrimônio genético e a raridade de alguns padrões, como espécies em extinção ou extintas, gera a necessidade de se desenvolver métodos de extração de DNA de baixo custo que

transforme essas amostras em rica fonte de material genético disponível para análises moleculares futuras (MOUSQUER et al., 2018).

Em muitos locais onde há restrições orçamentárias para pesquisas, as amostras são armazenadas de forma imprópria, e mesmo o uso de álcool 100% como meio líquido pode secar; pode haver contaminação e deterioração das amostras, além de outros problemas como falta de luz e desligamentos de B.O.D's.

O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial de um protocolo de extração de DNA de amostras comprometidas de mariposas.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 105 insetos adultos do gênero *Helicoverpa*. Os insetos foram coletados em armadilhas luminosas no Distrito Federal e Goiás, Brasil, em áreas de produção de grão-de-bico. Em cada local foi instalada uma armadilha luminosa modelo “Luiz de Queiroz” (Biocontrole Ltda., São Paulo, Brasil), com uma lâmpada fluorescente de luz negra, ligada a uma bateria automotiva. As mariposas foram coletadas em potes de polietileno cilíndricos de 500 ml, contendo álcool 96°GL, encaixado na extremidade inferior da armadilha. A armadilha foi instalada externamente ao cultivo, a cerca de três metros da bordadura e a 1,50 m de altura. As armadilhas foram acionadas ao entardecer e desligadas ao amanhecer do dia seguinte, considerando dias consecutivos na fase de lua nova de cada mês. Diariamente as mariposas foram retiradas do pote coletor e transferidas para outro recipiente com álcool 96°GL para preservá-las até a identificação da espécie. Eles foram armazenados entre 03 e 04 anos, em recipientes com álcool etílico 96 ° GL, e mantidos em temperatura ambiente por todo o período antes das análises. Eles foram numerados em sequência de 01 a 105, separados por lotes da seguinte forma:

01 a 10 – recolhidos na localidade Embrapa Hortaliças (15°56'11.1"S, 48°08'09.3"W), em 09/08/2018

11 a 50 – recolhidos na localidade Fazenda Garbanzo (16°10'04.5"S 47°26'46.3"W), em 19/11/2018

51 a 70 – recolhidos na localidade Fazenda Garbanzo (16°10'04.5"S 47°26'46.3"W), em 14/09/2017

71 a 90 – recolhidos na localidade Fazenda Alvorada -Pivô 1 (16°14'16.8"S 47°25'44.5"W), em 14/19/2018

91 a 105 – recolhidos na localidade Fazenda Alvorada – Pivô 2 (16°14'38.8"S 47°23'19.4"W), em 21/11/2018

Os lotes foram definidos de acordo com os períodos em que houve a maior captura de insetos com as armadilhas luminosas em campo na época de florescimento e enchimento de grãos. As mariposas analisadas foram escolhidas de forma aleatória dentro dos lotes e identificadas pelo método morfológico de comparação com espécimes da coleção entomológica da Embrapa Cerrados, DF.

Para as análises moleculares, os insetos foram retirados do álcool e colocados sobre um papel toalha para evaporação completa do álcool. Após secar, os insetos tinham as asas, pernas e antenas descartadas, de forma que a cabeça, tórax e abdome fossem as partes utilizadas. Cada inseto foi colocado em um tubo do tipo eppendorf onde foi completamente macerado. Foi adicionada 500 µl de uma solução tampão de lise composta por TRIS HCl (100 µM pH 8,0), EDTA (20 µM pH 8,0), NaCl (1,4 M), Triton X-100 (0,5%).

Cada tubo foi agitado por 2 s em vórtex e colocado em um agitador leve. Foi adicionado 20 µl de proteinase em cada amostra, levadas novamente ao vórtex por mais 5 s e em seguida as amostras foram postas em banho-maria a 37°C por 1 hora. A cada 20 minutos as amostras eram agitadas novamente no vórtex por cerca de 2 s. Em seguida, foram acrescentadas às amostras 1 mL de álcool etílico 100%, gelado, de forma lenta para não causar turbulência. As amostras foram armazenadas sob refrigeração a cerca de 4 °C por 15 dias.

Após esse período foi retirado com pipeta descartável e estéril o DNA suspenso no álcool de forma muito seletiva, evitando-se puxar resíduos sólidos do inseto. O DNA retirado foi colocado em novos frascos do tipo eppendorf e centrifugados a 12.000 RPM por 5 min. Após a centrifugação, o álcool suspenso no tubo foi descartado e novamente foram adicionados 500 µl de álcool 70%, gelado, e levado à centrifugação. Essa etapa foi repetida 2 vezes. Após a terceira centrifugação, o álcool 70% foi descartado e foram adicionados 20 µl de solução tampão TE 0,1X + 2 µl de RNASE em cada amostra.

As amostras de DNA foram quantificadas através de fluorimetria no aparelho QUANTUS™ (Promega) calibrado para 1ng/µl. As análises moleculares foram feitas utilizando o PRIMER de qPCR HaF/R#1, feito a partir do gene mitocondrial citocromo oxidase I (COI I), específico para identificação de *H. armigera*. A amplificação por qPCR durante a termociclagem seguiu o protocolo de desnaturação a 85°C por 4 min, 35 ciclos de desnaturação a 85°C por 30 segundos, anelamento a 45°C por 30 segundos, extensão a 72° C por 1 min e

uma extensão final a 72° C por 5 min no equipamento da marca AB Applied Biosystems Step One Plus Real Time PCR System®, no laboratório de Controle Biológico da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF).

### 4.3 RESULTADOS

A quantificação por fluorimetria do DNA antes de ser utilizado no PCR em tempo real mostrou a concentração obtida conforme Tabela 3.

A técnica de extração foi eficaz na obtenção de quantidade suficiente de DNA para confirmar a identificação molecular de cerca de 30% das amostras como sendo *Helicoverpa armigera*, mesmo sob condições inadequadas de armazenamento. O restante das amostras, apesar de conterem quantidades significativas de DNA viável, não identificou a espécie, pois os primers utilizados foram específicos para *H. armigera*.

### 4.4 DISCUSSÃO

Apesar das amostras terem sido armazenadas de forma inadequada por relativo longo tempo, os resultados obtidos mostram que é possível obter DNA viável para análises moleculares. O protocolo do presente trabalho tem potencial para ser usado em extração de DNA de amostras comprometidas, de coleções de museus ou mesmo em extração de DNA para análises forenses.

MILLER et al. (2013), relataram que quanto mais recente as amostras, maior quantidade de DNA está disponível para análises moleculares. Para os referidos autores, citando VINK et al. (2005), a conservação dos espécimes em álcool tem efeito oxidativo e hidrolítico que podem degradar o DNA ao longo do tempo. Para MILLER et al. (2013), as taxas de falha no sequenciamento de código de barras de DNA aumentam com o tempo desde a coleta, e o tamanho do corpo é um fator significativo, porém para espécimes recém-coletados em geral, o tamanho do corpo não é um preditor de sucesso ou falha de sequenciamento, pois espécies maiores têm uma vida útil mais longa para fornecer DNA do que as espécies menores.

Entretanto, em cenários onde a manutenção da coleção não foi possível, em casos de desastres naturais, guerras ou demais acontecimentos que fogem ao controle, assim como o mau

armazenamento, as técnicas destrutivas podem ser consideradas, de forma a montar uma biblioteca com DNA e a informação não ser perdida.

As análises moleculares podem fornecer informações importantes para o combate de pragas agrícolas e o avanço de técnicas moleculares de filogenia de Heliiothinae tem sido constante e fornecendo uma estrutura robusta para pesquisa sobre genômica e biologia dessa subfamília (MITCHEL & GOPURENKO, 2016).

#### **4.5 CONCLUSÕES**

O protocolo desenvolvido no presente trabalho foi viável para a obtenção de DNA de amostras comprometidas de espécimes de *H. armigera* e pode ser uma ferramenta usada nas análises moleculares de identificação dessa praga, subsidiando, assim, a tomada de decisão sobre qual controle deve ser utilizado nas lavouras onde o inseto se fizer presente. A identificação correta da espécie direciona os métodos de controle, contribuindo para a redução do uso indiscriminado de inseticidas químicos e contribuindo para uma agricultura mais sustentável.

#### 4.6 REFERÊNCIAS

BEHERE, Gajanan T., et al. "Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to *H. zea*." **BMC Evolutionary Biology**, vol. 7, 14 July 2007, p. 117. Gale Academic OneFile, link.gale.com/apps/doc/A167112526/AONE?u=capes&sid=bookmark-AONE&xid=3dc5be5b. Accessed 4 Jan. 2022.

FUKATSU, T. Acetone preservation: a practical technique for molecular analysis. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1935-1945, 1999.

MANDRIOLI, M; BORSATTI, F.; MOLA, L. Factors affecting DNA preservation from museum-collected lepidopteran specimens. **Entomologia Experimentalis at Applicata**, v.120, p. 239-244, 2006.

MASTRANGELO T, PAULO DF, BERGAMO LW, MORAIS EGF, SILVA M, BEZERRA-SILVA G et al. Detecção e diversidade genética de um invasor heliotínico (Lepidoptera: Noctuidae) do Norte e Nordeste do Brasil. *J Econ Entomol* 2014; 107: 970-980. 25026655

MATTHEWS M. Heliothine moths of Australia: a reference guide to pest bollworms and related noctuid groups. CSIRO Publishing, Melbourne; 1999.

MEGA, N.O.; REVERS, L.F. Developing a rapid, efficient and low cost method for rapid DNA extraction from arthropods. **Ciência Rural**, v. 41, n.9, p. 1563 – 1570, 2011.

MITCHELL, Andrew, and David GOPURENKO. "DNA Barcoding the Heliothinae (Lepidoptera: Noctuidae) of Australia and Utility of DNA Barcodes for Pest Identification in *Helicoverpa* and Relatives." *PLoS ONE*, vol. 11, no. 8, 10 Aug. 2016, p. e0160895. *Gale Academic OneFile*, link.gale.com/apps/doc/A460426914/AONE?u=capes&sid=bookmark-AONE&xid=ab216675. Accessed 24 Jan. 2022.

MILLER, Jeremy A., et al. "Which specimens from a museum collection will yield DNA barcodes? A time series study of spiders in alcohol." *ZooKeys*, no. 365, 30 Dec. 2013, pp. 245+. *Gale Academic OneFile*, link.gale.com/apps/doc/A541286781/AONE?u=capes&sid=bookmark-AONE&xid=558d7a00. Accessed 10 May 2022.

MOUSQUER, G.T; MACIEL L. P.; SARAIVA A. C. P., DALLA COSTA, E. R.; ROSSETTI, M.L.R., Validation of a quick and low-cost DNA extraction protocol applicable to long-stored blood samples, **Analytical Biochemistry**, Volumes 561–562, 2018, Pages 47-51, ISSN 0003-2697, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.09.006>(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326971830157X>)

VINK CJ, THOMAS SM, PAQUIN P, HAYASHI CY, HEDIN M (2005) The effects of preservatives and temperatures on arachnid DNA. *Invertebrate Systematics* 19: 99-104. doi: 10.1071/IS04039