

NOTA TÉCNICA**Primer registro de ocurrencia de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) en soja, en Uruguay**

Castiglioni Enrique¹, Perini Clérison R², Chiaravalle Willy³, Arnemann Jonas A², Ugalde Gustavo², Guedes Jerson VC²

¹Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Departamento de Protección Vegetal, Centro Universitario Regional del Este (CURE). Rutas 9 y 15, 27000 Rocha, Uruguay. Correo electrónico: bbcastbb@gmail.com

²Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Defesa Fitossanitária, Centro Ciências Rurais, Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LabMIP), RS, Brasil.

³Consultora Entoagro, Uruguay.

Recibido: 13/5/15 Aceptado: 25/2/16

Resumen

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) es una especie polífaga, con estatus de plaga cuarentenaria en Uruguay, que ha sido registrada en Europa, Asia, África, Oceanía, y más recientemente, en los países vecinos de América del Sur. Este es el primer registro confirmado de *H. armigera* en cultivos de soja, en Uruguay. La identificación de esta especie es difícil por su proximidad taxonómica con otras especies de los géneros *Helicoverpa* y *Heliothis*. La confirmación de identificación se realizó mediante caracteres anatómicos externos y de las genitales, así como estudio de ADN, en machos adultos capturados en trampas de feromona sexual y larvas criadas en laboratorio, recolectadas en cultivos de soja en cuatro localidades de Flores, Lavalleja, Cerro Largo y Rocha.

Palabras clave: lagarta bolillera, plaga cuarentenaria, *Glycine max*

Summary**First Record of Occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) in Soybean in Uruguay**

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) is a polyphagous species, in quarantine pest status in Uruguay, that has been reported in Europe, Asia, Africa, Oceania, and more recently, in the neighboring countries of South America. This is the first confirmed report for *H. armigera* in soybean crops, in Uruguay. The identification of this species is difficult because of its taxonomic proximity with other species of *Helicoverpa* and *Heliothis* genera. The confirmed identification was made upon external morphological characteristics, male genitalia, and DNA analysis, on adult males captured with pheromone traps and larvae reared in laboratory, collected from soybean fields, from four locations from Flores, Lavalleja, Cerro Largo and Rocha.

Keywords: cotton bollworm, quarantine pest, *Glycine max*

La especie *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) tiene distribución geográfica registrada en Europa, Asia, África, Oceanía, y más recientemente, en América del Sur. En Uruguay, hasta el presente tiene categoría de plaga cuarentenaria. *H. armigera* es una especie polífaga, capaz de alimentarse de más de 130 especies vegetales (Cunningham y Zalucki, 2014), incluyendo cultivos de importancia comercial, como maíz, sorgo, algodón, leguminosas forrajeras, soja (Reed, 1965; Fitt, 1989; Moral

García, 2006), poroto negro, girasol y nabo-forrajero (Arnemann *et al.*, 2014), por lo que representa un riesgo para la agricultura. Por otra parte, los adultos de *H. armigera* pueden migrar largas distancias, lo que favorece su rápida dispersión geográfica (Kriticos *et al.*, 2015).

La ocurrencia de esta especie fue registrada recientemente en los países de la región. En Brasil fue confirmada para los Estados de Goiás y Bahía, en soja, y Mato Grosso, en algodón (Czepak *et al.*, 2013). Posteriormente Specht *et al.*

(2013) registraron su ocurrencia en Bahía, Distrito Federal, Mato Grosso y Paraná. En Rio Grande do Sul fue confirmada su ocurrencia en soja, en el municipio de Lagoa Vermelha (Guedes, 2013). En Paraguay fue informado su registro por la SENAVE (2013), mientras que Murúa *et al.* (2014) informaron de su registro en Argentina. Así, esta especie atravesó las fronteras entre los países del Cono Sur, poniendo en riesgo más de 50 millones de hectáreas de agricultura (Guedes *et al.*, 2014). Kriticos *et al.* (2015) relatan la dispersión de esta especie en América del Sur y Central y, utilizando el modelo CLIMEX, presentan una región de expansión potencial en función de las características climáticas y la disponibilidad de cultivos huéspedes, alertando que su detección en los sistemas productivos de Norte América es solamente una cuestión de tiempo. En el hemisferio sur, el territorio uruguayo está comprendido dentro del área en que se presentan dichas condiciones adecuadas.

Desde su primer registro de ocurrencia en el continente americano, más específicamente en Brasil (Czepak *et al.*, 2013), *H. armigera* ha ocasionado pérdidas significativas en diversos cultivos, principalmente por sus hábitos polífagos, que se relacionan con una cantidad y diversidad de proteinasas presentes en su aparato digestivo y la consiguiente capacidad para degradar los alimentos ingeridos (Patankar *et al.*, 2001).

Una de las dificultades que presenta esta especie es la correcta identificación, debido a su proximidad taxonómica con otras especies de la subfamilia Heliiothinae. En esta familia, *Helicoverpa zea* y *H. armigera* eran antiguamente consideradas coespecíficas como *Heliiothis armigera* (Grote, 1863) y eran incluidas en *Heliiothis oschenheimer* (Pogue, 2004).

Common (1953), en uno de los primeros estudios de taxonomía de Heliiothinae, describió el género *Heliiothis* con los caracteres del aparato genital del macho y de la hembra, y separó la especie endémica de Australia, *H. punctigera*, de *H. armigera*, además de describir la genitalia de *H. assulta*. Este autor reconoció que la especie de *Heliiothis* del Nuevo Mundo era diferente de la *H. armigera* del Viejo Mundo, y sugirió que *H. umbrosus*, citado por Grote (1863), podría ser la especie del Nuevo Mundo. Posteriormente, Todd (1955) determinó, también por caracteres de la genitalia, que había dos especies importantes en América del Sur, *H. gelotopoeon* y *H. zea*. Este mismo autor relató que la especie *H. zea* ya había sido citada como *H. umbrosus* por autores anteriores. Álvarez y Abbate (2013) presentaron información relacionada a la ocurrencia de *H. gelotopoeon* y su importancia en los sistemas productivos de la región del Río de la Plata.

Hardwick (1965) publicó una clave de identificación detallada de larvas y de adultos, describiendo 11 nuevas especies y dos nuevas subespecies del género *Helicoverpa*, que estableció como un nuevo género, distinto de *Heliiothis*. Este autor utilizó los caracteres morfológicos de las alas, patas y genitalia de adultos machos y hembras para describir las especies nuevas y las ya descritas.

Hardwick separó las especies y subespecies de *Helicoverpa* en grupos con caracteres morfológicos semejantes, principalmente de la genitalia masculina. Así, el grupo *Armigera* fue conformado con las especies *H. armigera* y *H. helenae* (Hardwick, 1965), y las subespecies *H. armigera armigera*, *H. armigera conferta* (Walker, 1857) y *H. armigera commoni* (Hardwick, 1965). Por otro lado, quedaron separados los grupos *Zea* y *Gelotopoeon*.

Uno de los principales caracteres de identificación de las especies de *Helicoverpa* es la forma y el número de divertículos o tubérculos en la base de la vesica del edeago. Este carácter fue identificado después de que Hardwick (1965) utilizase la metodología de revertir la vesica, que no fue empleada por los autores anteriores, que publicaron las descripciones y dibujos del edeago en su forma natural. Ese fue un paso importante en la taxonomía de Heliiothinae, que resolvió dudas taxonómicas históricas de los estudios anteriores.

Entre las especies del género *Helicoverpa* hay pocas características morfológicas que permiten separarlas y que son significativas, además, generalmente poseen frecuencia variable (Passoa, 2007). *H. armigera* y *H. zea* son muy próximas genética y morfológicamente (Behere *et al.*, 2007) y comparten muchas características biológicas (Specht, 2014).

La identificación de los inmaduros es difícil e incierta y la identificación de los adultos de *Helicoverpa* es compleja, con una inversión de tiempo considerable en la verificación de los caracteres anatómicos. De esta forma, es importante encontrar otros caracteres de identificación, además de los de la genitalia, considerando todos los segmentos del cuerpo (cabeza, tórax y abdomen), incluyendo los órganos y apéndices, tales como antenas, palpos, patas y alas (Specht, 2014).

Perini (2015) presentó una nueva clave pictórica de especies de Heliiothinae de interés agrícola en Brasil (*H. zea*, *H. armigera*, *H. gelotopoeon* y *Heliiothis virescens*) confeccionada en base a caracteres morfológicos de las alas anteriores y posteriores y el primer par de patas, con énfasis en la tibia y en la epifisis de los adultos. Según este autor, la tibia resultó ser un carácter útil para separar las especies morfológicamente muy próximas. En ese estudio se pre-

senta una clave pictórica con caracteres visibles con ayuda de una lupa de mano, con por lo menos 10 aumentos, y también las características de las genitalias de los machos que deben ser observadas bajo microscopio estereoscópico.

El primer registro de ocurrencia de *H. armigera* en Brasil se realizó en base a la identificación morfológica del órgano genital masculino de los insectos adultos (Czepak *et al.*, 2013). Además de la identificación morfológica, la identificación molecular por análisis de la secuencia de los genes mitocondriales también es utilizada para confirmación de la especie, según Specht *et al.* (2013).

El objetivo de este trabajo es notificar la ocurrencia *Helicoverpa armigera* (Hübner) en soja, con verificación realizada a partir del análisis morfológico de las genitalias y el ADN de adultos machos, provenientes de larvas recolectadas en el campo y de capturas con trampas de feromona sexual, en diferentes localidades de Uruguay, en los ciclos agrícolas 2013/14 y 2014/15.

En 2013/14 los adultos fueron obtenidos de dos formas: a) colecta de larvas en el campo, criadas en laboratorio hasta obtención de los machos adultos (sexados en estado de pupas), b) captura con trampa de feromona sexual Isca lure Armigera® [(Z)-9-hexadecenal (Z9OC16Ald; (Z)-9-tetradecenal (Z9-C14Ald); (Z)-11-C16Ald] (Figura 1). La trampa fue colocada en un cultivo de soja próximo al km 170 de Ruta 3, en el departamento de Flores, (S 33°51'10.3"; O 56°31'15.6"). Las larvas fueron colectadas en cultivos de soja de dos localidades: Paraje Garao, próximo al km 385 de Ruta 18, en el departamento de Cerro Largo (S 32° 38' 38.6"; O 53° 38' 38.9") y en la región noreste de Lavalleja, en un establecimiento próximo al poblado Colón (S 33° 50'

20.2"; O 54° 27' 05.1"). En 2015 se colocaron dos trampas de feromona sexual como las descritas anteriormente, en un cultivo de soja localizado en las proximidades de La Paloma, a la altura del km 13 de Ruta 15, departamento de Rocha (S 34° 33' 40.8"; O 54° 11' 31.5").

Los adultos obtenidos en ambas temporadas fueron enviados al Laboratorio de Manejo Integrado de Plagas (LabMIP) del Centro de Ciencias Rurales de la Universidad Federal de Santa María, RS, Brasil, donde todos los ejemplares adultos analizados (14 en 2014 y 43 en 2015) capturados en las distintas localidades de Uruguay, fueron determinados como *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Figura 2).

Estas capturas confirman la ocurrencia de *H. armigera* en soja, en Uruguay, en los departamentos de Flores, Lavalleja y Cerro Largo, desde la temporada 2013/14 y en Rocha, en 2014/15. Esto no significa que no se encuentre en otras localidades, en las que no se dispusieron trampas para capturas de adultos ni se realizó recolección de larvas en el campo.

Para la identificación de los machos adultos en este estudio, los ejemplares fueron colocados en una solución de KOH 10%, en baño maría durante 45 minutos. Después de esta preparación, las genitalias se limpiaron y disecaron; el edeago fue removido y la vesica evertida usando una jeringa con alcohol 70% (Pogue, 2004; Brambila, 2009). Las estructuras utilizadas para la identificación de la especie fueron el edeago y la base de la vesica con un lóbulo en forma de «dedo» y tubérculos basales.

Al mismo tiempo, muestras de ADN fueron extraídas para realizar un análisis comparativo con poblaciones de

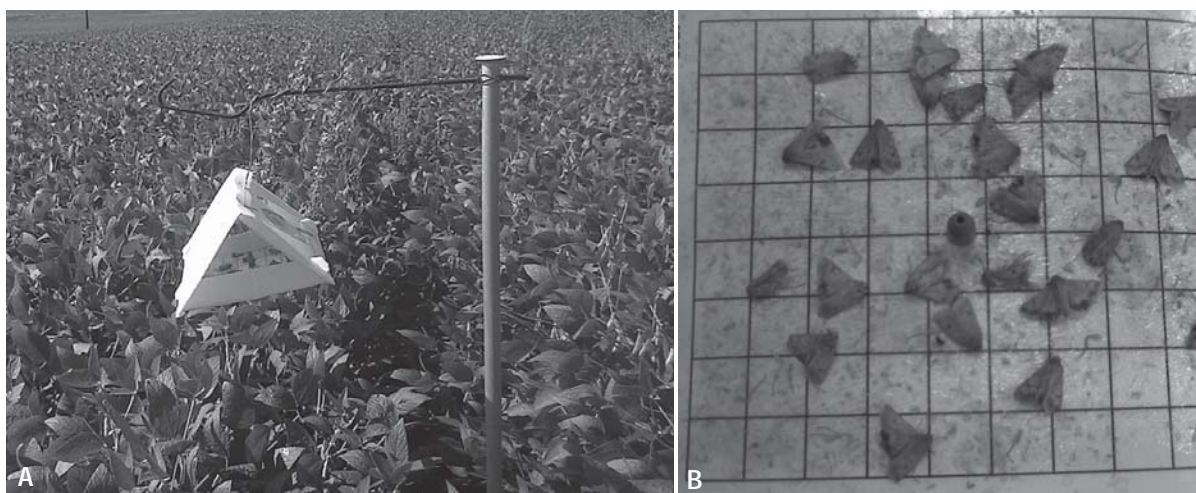


Figura 1. A) Trampa tipo Delta conteniendo la feromona sexual de *Helicoverpa armigera* en cultivo de soja. B) Vista del piso adhesivo, mostrando las mariposas de *Helicoverpa armigera* capturadas y el septo liberador de la feromona sexual.

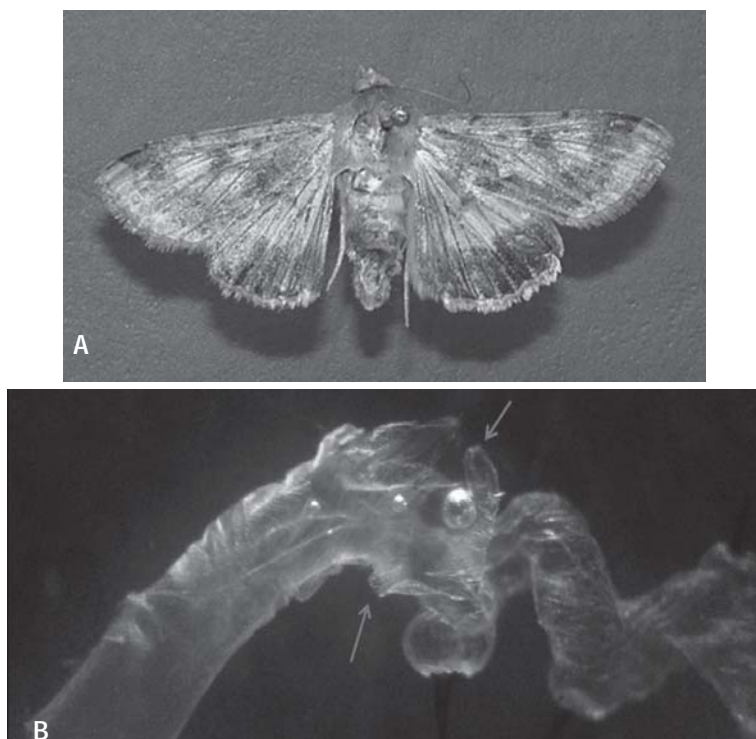


Figura 2. A) Macho adulto de *Helicoverpa armigera*, B) Detalle de la genitalia del macho (vesica del edeago evertida, evidenciando los tubérculos basales).

Argentina, Paraguay y sur de Brasil, con el objetivo de conocer su similitud genética. El ADN total de los individuos fue extraído utilizando el kit de extracción *Qiagen Blood and Tissue DNA* en 50 μ L de buffer AE y almacenado a -20°C . Un fragmento de 707 pares de bases de la región del gen mitocondrial COI fue amplificada usando el par de *primers* NOC-COI-F (5' GCGAAAATGACTTTATTCAAC 3') y COI-R (5' GCGAAAATGACTTTATTCAAC 3') (sin pub., W.T. Tay CSIRO), utilizando las siguientes condiciones: desnaturalización a 95°C por cinco minutos, 34 ciclos alternados de las etapas de desnaturalización, anillamiento y extensión, cada una por 30 segundos a 95°C , 61°C y 72°C respectivamente, seguido por un ciclo de extensión final a 72°C , por cinco minutos.

La amplificación del fragmento del gen COI de las muestras individuales fue realizada usando un volumen de reacción de 25 μ L, conteniendo 25 ng de DNA genómico, 0,5 μ M de ambos *primers* (F e R), 0,2 mM de dNTP's, 1 \times Phusion HF Buffer (NEB), y 1,25 unidades de Phusion DNA polymerase (NEB). Los amplicons fueron purificados usando el kit de purificación QIAquick[®] PCR (Qiagen) antes del secuenciamiento por el método de Sanger. La reacción de secuenciamiento fue realizada usando ABI BigDye[®] *di-deoxy chain termination sequencing system* V3.1 (Applied

Biosystems) y la reacción post-secuenciamiento siguiendo las orientaciones de la unidad de secuenciamiento [Australian National University Biomolecular Resource Facility (ANU BRF)]. Los programas Pregap y Gap4 del paquete Staden (Staden *et al.*, 2000) fueron utilizados para editar y analizar las secuencias de ADN amplificadas.

Las secuencias generadas del fragmento analizado del gen COI fueron verificadas para *codons* de parada prematura, que pueden indicar pseudogenes, usando Geneious[®] R8 (Biomatters Ltd., Nueva Zelanda) y Blastp (para confirmación de homología de aminoácidos), usando secuencias de *H. armigera* disponibles para la región del gen (COI) analizada en el NCBI GenBank.

La identidad de las secuencias investigadas en el banco de datos NCBI GenBank permitió verificar que todos los individuos analizadas fueron significativamente similares (i.e., 99-100 % de identidad de nucleotídeos) con secuencias publicadas de *H. armigera*, confirmando ser ejemplares de esta especie.

La presencia de *H. armigera* en Uruguay, además de implicar un cambio de su estatus como plaga (comunicación efectuada por carta a las autoridades de Cuarentena Vegetal de la División Protección Vegetal del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, en fecha 10 de diciembre

de 2014), sino que representa un riesgo para la producción agrícola. Este riesgo sanitario potencial para diversos cultivos de importancia económica está fundamentado en los hábitos polípagos de esta especie y en su capacidad de provocar daños en diversas estructuras de las plantas, como hojas y tallos, con preferencia de alimentación en estructuras reproductivas, como vainas, mazorcas y granos (Cunningham *et al.*, 1999), por lo cual los perjuicios pueden ser de gran magnitud.

Kriticos *et al.* (2015) destacan el hecho de que en los lugares donde se ha establecido, *H. armigera* ha desarrollado resistencia a un amplio espectro de insecticidas. Estos antecedentes, aunados a la falta de conocimientos locales para el manejo de la plaga, pueden representar complejas dificultades para las decisiones técnicas y productivas y, eventualmente, incrementar la necesidad de uso de insecticidas, con los consiguientes aumentos de los costos de producción y del impacto negativo en el ambiente.

Bibliografía

- Álvarez D, Abbate S. 2013. Lagarta bolillera *Helicoverpa gelotopoeon* una plaga que se está adaptando a los nuevos planteos productivos [CD-Rom]. En: III Simposio Nacional de Agricultura: 3 - 4 de octubre, 2013; Paysandú, Uruguay.
- Arnemann JA, Guedes JVC, Stacke RF, Melo AA, Perini CR, Curioletti LE. 2014. *Helicoverpa armigera*: até no inverno. *Cultivar*, 182: 26 - 28.
- Behere GT, Tay WT, Russel DA, Heckel DG, Appleton BR, Kranthi KR, Batterham P. 2007. Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to *H. zea*. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 1 - 10.
- Brambilla J. 2009. Instructions for dissecting male genitalia of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae) to separate *H. zea* from *H. armigera* [En línea]. 16p. Consultado 1 agosto 2014. Disponible en: https://caps.ceris.purdue.edu/screening/h_armigera_vs_h_zea_dissect_instruction.
- Common IFB. 1953. The Australian species of *Heliothis* (Lepidoptera: Noctuidae) and their pest status. *Australian Journal of Zoology*, 1: 319 - 344.
- Cunningham JP, Zalucki MP. 2014. Understanding heliothine (Lepidoptera: Heliothinae) pests: What is a host plant? *Journal of Economic Entomology*, 107: 881 - 896.
- Cunningham JP, Zalucki MP, West SA. 1999. Learning in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): a new look at the behaviour and control of a polyphagous pest. *Bulletin of Entomological Research (London)*, 89: 201 - 207.
- Czepak C, Albernaz KC, Vivan LM, Guimarães HO, Carvalhais T. 2013. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 43: 110 - 113.
- Fitt GP. 1989. *Heliothis* species in relation to agroecosystems. *Annual Review of Entomology*, 34: 17 - 52.
- Grote AR. 1863. Additions to the catalogue of U.S. Lepidoptera. *Proceedings of the Entomological Society of Philadelphia*, 1: 218 - 219.
- Guedes JVC. 2013. Ocorrência de adultos de *Helicoverpa armigera* (Hübner) em armadilhas de feromônio sexual, na soja no Rio Grande do Sul: Laudo Técnico de Ocorrência de Pragas. Santa Maria : Ministério da Educação, Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais. 4p. (Laudo Técnico ; n. 5/2013, de 02.12.2013).
- Guedes JVC, Arnemann JA, Perini CR, Melo AA. 2014. A *Helicoverpa* veio para ficar e devorar. *A Granja*, 792: 47 - 49.
- Hardwick, DF. 1965. The corn earworm complex. Ottawa : Entomological Society of Canada. 247p.
- Kriticos DJ, Ota N, Hutchison WD, Beddow J, Walsh T, Tay WT, Borchert DM, Paula-Moraes SV, Czepak C, Zalucki M.P. 2015. The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in North America: Is it just a matter of time? [En línea]. *Plos One*, 10(3): e0119618. Consultado 19 de abril 2016. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0119618>.
- Moral García FJ. 2006. Analysis of the spatiotemporal distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) in a tomato field using a stochastic approach. *Biosystems Engineering*, 93: 239 - 259.
- Murúa MG, Scalora FS, Navarro FR, Cazado LE, Casmuz A, Villagrán ME, Lobos E, Gastaminza G. 2014. First record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. *Florida Entomologist*, 97: 854 - 856.
- Passoa S. 2007. Identification guide to larval Heliothinae (Lepidoptera: Noctuidae) of quarantine significance [En línea]. 26p. Consultado 22 noviembre 2014. Disponible en: <https://caps.ceris.purdue.edu/dmm/109>.
- Patankar AG, Giri AP, Harluskar AM, Sainani MN, Deshpande VV, Ranjekar PK, Gupta VS. 2001. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 453 - 464.
- Perini CR. 2015. Identificação de espécies de Heliothinae e controle de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura da soja [Tesis de Maestría]. Santa Maria : Universidade Federal de Santa Maria. 68p.
- Pogue M. 2004. A new synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiation of adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97: 1222 - 1226.
- Reed W. 1965. *Heliothis armigera* (Hb.) (Noctuidae) in western Tanganyika: II. Ecology and natural and chemical control. *Bulletin of Entomological Research*, 56: 127 - 140.
- SENAVE. 2013. Senave en alerta tras ingreso de peligrosa plaga agrícola [En línea]. Consultado 17 octubre 2013. Disponible en: <http://www.abc.com.py/edicion-impresa/economia/senave-en-alerta-tras-ingreso-de-peligrosa-plaga-agricola-629240.html>.
- Specht A. 2014. *Helicoverpa armigera* (Hübner) x *H. zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae): entendendo a diferenciação taxonômica [En línea]. En: 25 Congresso Brasileiro de Entomologia; 2014; Goiânia. Anais eletrônicos. EMBRAPA/UFV. Consultado 11 diciembre 2014. Disponible en: http://www.cbe2014.com.br/anais/arquivos/Alexandre_Specht.pdf.
- Specht A, Sosa-Gómez D, Paula-Moraes S, 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.
- Staden RBKF, Beal KF, Bonfield JK. 2000. The Staden package, 1998. En: Misener S, Krawetz SA. [Eds.]. *Bioinformatics Methods and Protocols*. Totowa : Humana Press. (Methods in Molecular Biology 132). pp. 115 - 130.
- Todd EL. 1955. The distribution and nomenclature of the corn earworm. *Journal of Economic Entomology*, 48: 600 - 603.