# UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

# ESCOLA DE AGRONOMIA

# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

# IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE Helicoverpa armigera (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

# THAYSSA MONIZE ROSA DE OLIVEIRA

Orientador: **Prof. Marcos Gomes da Cunha** 

Coorientadores: Dr. Luke Raymond Tembrock Dr. Todd Michael Gilligan SEI/UFG - 2116686 - Termo de Ciência e de Autorização (TECA)



#### TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

#### E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a <u>Lei 9.610/98</u>, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

#### 1. Identificação do material bibliográfico

[] Dissertação [X] Tese

#### 2. Nome completo do autor

THAYSSA MONIZE ROSA DE OLIVEIRA

3. Título do trabalho

Identificação Molecular de Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae)

#### 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento [ ] SIM [ X ] NÃO<sup>1</sup>

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível

disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

Solicitação de registro de patente;

- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;

Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por Marcos Gomes Da Cunha, Professor do Magistério Superior, em 08/06/2021, às 15:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



Documento assinado eletronicamente por THAYSSA MONIZE ROSA DE OLIVEIRA, Discente, em 08/06/2021, às 15:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <u>https://sei.ufg.br/sei/controlador\_externo.php?</u> <u>acao=documento\_conferir&id\_orgao\_acesso\_externo=0</u>, informando o código verificador 2116686 e o código CRC 2C6CCFB8.

Referência: Processo nº 23070.023267/2021-80

SEI nº 2116686



# TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

# E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

# 1. Identificação do material bibliográfico

[] Dissertação [X] Tese [] Outro\*:\_\_\_\_\_

\*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

# 2. Nome completo do autor

THAYSSA MONIZE ROSA DE OLIVEIRA

# 3. Título do trabalho

Identificação Molecular de Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae)

# 4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [] NÃO<sup>1</sup>

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.
 O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Gomes Da Cunha**, **Professor do Magistério Superior**, em 13/03/2023, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do <u>Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020</u>.



Documento assinado eletronicamente por **THAYSSA MONIZE ROSA DE OLIVEIRA**, **Usuário Externo**, em 14/03/2023, às 12:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do <u>Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020</u>.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <u>https://sei.ufg.br/sei/controlador\_externo.php?</u> <u>acao=documento\_conferir&id\_orgao\_acesso\_externo=0</u>, informando o código verificador **3592721** e o código CRC **766884DC**.

Referência: Processo nº 23070.023267/2021-80

SEI nº 3592721

# THAYSSA MONIZE ROSA DE OLIVEIRA

# IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE Helicoverpa armigera (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Área de concentração: Fitossanidade

**Orientador:** Prof. Marcos Gomes da Cunha

**Coorientadores**: Dr. Luke Raymond Tembrock Dr. Todd Michael Gilligan

Goiânia, GO – Brasil 2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.





#### UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

#### ESCOLA DE AGRONOMIA

#### ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 81/2021 da sessão de Defesa de Tese de THAYSSA MONIZE ROSA DE OLIVEIRA que confere o título de Doutora em Agronomia, na área de concentração em Fitossanidade.

Aos vinte e um dias do mês de maio do ano de dois mil e vinte e um, a partir das doze horas, por meio de videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada "Identificação Molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)". Os trabalhos foram instalados pelo Orientador e Presidente da Banca Examinadora, **Prof. Marcos Gomes da Cunha - EA/UFG**, com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof. Luke Raymond Tembrock - Colorado State University**, coorientador; **Dr. Todd Michael Gilligan - USDA-APHIS-PPQ-Science & Technology**, coorientador; **Prof. Érico de Campos Dianese - EA/UFG**, membro titular interno; **Profa. Alicia Eva Timm - Colorado State University**, membro titular externo; **Dra. Regina Melo Sartori Coelho - LFDA-GO/MAPA**, membro titular externo; **Profa. Karina Cordeiro Albernaz Godinho - EA/UFG**, membro titular externo. Durante a arguição, os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. Após a arguição, a Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata APROVADA pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Presidente da Banca Examinadora, **Prof. Marcos Gomes da Cunha**, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e um dias do mês de maio do ano de dois mil e vinte e um.

### TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

seil assinatura eletrònica	Documento assinado eletronicamente por Alicia Eva Timm, Usuário Externo, em 08/06/2021, às 11:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do <u>Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015</u> .
seil	Documento assinado eletronicamente por Marcos Gomes Da Cunha, Professor do Magistério Superior, em 08/06/2021, às 12:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do <u>Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de</u> 2015.
seil assinatura eletrônica	Documento assinado eletronicamente por <b>Todd Michael Gilligan</b> , <b>Usuário Externo</b> , em 08/06/2021, às 13:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do <u>Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015</u> .
seil assinatura eletrònica	Documento assinado eletronicamente por <b>Regina Melo Sartori Coelho</b> , <b>Usuário Externo</b> , em 08/06/2021, às 14:01, conforme horário oficial de Brasilia, com fundamento no art. 6º, § 1º, do <u>Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015</u> .
seil assinatura eletrónica	Documento assinado eletronicamente por Érico de Campos Dianese, Usuário Externo, em 08/06/2021, às 14:24, conforme horário oficial de Brasilia, com fundamento no art. 6º, § 1º, do <u>Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015</u> .
seil assinatura eletrònica	Documento assinado eletronicamente por Luke Raymond Tembrock, Usuário Externo, em 08/06/2021, às 19:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do <u>Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015</u> .

#### 09/06/2021

#### SEI/UFG - 2116642 - Ata de Defesa de Tese



Documento assinado eletronicamente por Karina Cordeiro Albernaz, Professor do Magistério Superior, em 08/06/2021, às 23:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do <u>Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de</u> 2015.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <u>https://sei.ufg.br/sei/controlador\_externo.php?</u> <u>acao=documento\_conferir&id\_orgao\_acesso\_externo=0</u>, informando o código verificador **2116642** e o código CRC **8E5BAD0B**.

Referência: Processo nº 23070.023267/2021-80

SEI nº 2116642

Dedico esse trabalho à minha família, meu noivo e minhas filhas *pet* Princesa e Jade, por todo amor que sempre me dedicaram.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à **CAPES**, pela concessão de bolsa por demanda social e pela posterior oportunidade de realizar doutorado sanduíche no exterior, assim como à **FAPEG**, pela concessão de auxílio para a compra de equipamentos, insumos do projeto.

À Universidade Federal de Goiás, por oportunizar a pesquisa científica e fornecer estrutura para a realização desse trabalho, em especial ao Laboratório de Entomologia, nas pessoas da Prof. Karina Albernaz-Godinho e Prof. Cecília Czepak, por terem pensado e iniciado esse projeto de tão grande relevância.

Agradeço também ao meu orientador, **Prof. Marcos Cunha**, pelo trabalho que desenvolvemos juntos ao longo desses quatro anos por me oferecer todos os insumos e infraestrutura necessários para a conclusão desse estudo.

A todos do **Setor Fitossanitário**, em especial **Renato Menezes**, **Mariana Stutz** e **Mariana Guimarães**, que me ajudaram não só no desenvolvimento da pesquisa, mas também no aspecto pessoal, compartilhando problemas e soluções, sendo ainda suporte emocional nos momentos difíceis e solitários que perpassam a pós-graduação.

À equipe da **Lanagro**, em especial à **Dra. Regina Sartori**, por ter sempre disposto do seu tempo, insumos e paciência para me auxiliar nessa pesquisa, sendo a primeira a me ensinar a manusear os equipamentos, além de me orientar em relação à modelos, marcas e macetes que ajudaram muito na parte prática desse trabalho.

Ao **Prof. Érico Dianese**, que além de ser um ótimo professor, é um ser humano ainda mais excepcional. Sua ajuda foi essencial em inúmeros momentos dessa pesquisa, onde mesmo não sendo sua área de atuação, me auxiliou com correções de projeto em prazos praticamente impossíveis, além das várias conversas, conselhos e a motivação para não desistir e chegar até aqui. Muito desse estudo veio de sua ajuda e lhe sou (e serei) eternamente grata.

Agradeço também à **Colorado State University** e à **USDA**, por terem oportunizado meu doutorado sanduíche e me oferecido todo suporte e estrutura para a realização deste, principalmente pela chance de trabalhar com pessoas incríveis como **Dr. Todd Gilligan** e **Ms. Frida Zink**, que dispuseram do seu tempo ao me auxiliar nesses seis meses no Colorado, sem julgar meus erros e tendo extrema paciência com minhas falhas, me incentivando a todo momento e sempre enaltecendo meus acertos.

Ao **Dr. Luke Tembrock.** As palavras são poucas para agradecer tanta empatia e cuidado. Mais que orientador, nesses meses você se tornou amigo, compreendendo meu sofrimento com a distância familiar e estando sempre presente, me apresentando sua namorada e amigos para que eu fizesse colegas aí. Foram inúmeras as confraternizações do laboratório em que você me incluiu e ainda mais as noites em que você e **Charlotte Aldebron** me levaram para sair, desde bares e restaurantes que achavam que eu gostaria de conhecer até as divertidíssimas noites de poker, jogos de tabuleiro, truco e pizza que vivenciei com vocês. Além disso, enquanto pesquisador você foi para mim exemplo de ética, dedicação e empatia, sempre compreendendo minhas dificuldades, enaltecendo minhas qualidades e acertos, além de me incentivar muito a não desistir e concluir esse doutorado.

Outro agradecimento imenso vai para **Dra. Jennifer Ackerfield**, por ter aberto sua casa para mim, me recebendo com todo o carinho e me permitindo conviver com sua família e amigos. Obrigada pela colheita da minha primeira abobora, por me proporcionar minha comemoração de Halloween, pela minha primeira meia de natal, por ter me levado para ver as montanhas, por me incluir no natal de sua família e me fazer sentir parte dela. Obrigada por cuidar de mim como cuidou de seus filhos por seis meses, por me oferecer inúmeras caronas, pelas inúmeras refeições juntas, passeios, viagens, tours e saídas. Obrigada por ter me permitido conhecer e acalentar **Ivy** e **Turtle** e por ter deixado que eu convivesse com **Jordan** e **Connor** como parte da família. Minha gratidão só não é maior que minha saudade de vocês.

A minha família... vocês foram suporte nos momentos mais difíceis e de saudade. Sempre presentes em chamadas de vídeo, nas mensagens praticamente diárias, independente da diferença de fuso horário. Vocês me apoiaram a vida toda, mas eu jamais teria tido coragem de encarar esse doutorado fora se eu não soubesse a força e a garra com que vocês me criaram. Weliton, meu pai, obrigada por ter sido sempre presente, mesmo que nós estivéssemos longe tantas vezes. Míria, você é mais que mãe, é a base de nossa família, quem me ligava várias vezes para saber se estava bem e aguentou a saudade mesmo sendo super protetora e coruja, pois sabia que era para o meu bem. Vózinha Marly e Vôzinho Jales, ter sido criada junto com vocês é um presente, que agradeço todos os dias. Senti falta de nossa rotina diária, da convivência e até da sua comida, vózinha. Sou o que sou por ser uma mescla de todos vocês. Vovó Dita, obrigada pelas mensagens diárias sempre desejando meu bem e me ofertando cuidado. Lara, você veio para iluminar meus dias. Apesar de não ter ajudado de forma "estrita" nessa pesquisa, seu sorriso, bom humor e sua existência tornaram meus dias mais leves e aumentaram ainda mais a saudade de casa. Laly, obrigada pelas conversas, pelo apoio, por sempre ler meus artigos e projetos mesmo não entendendo nada e ainda assim me ajudar tanto e dar sua opinião. Obrigada pelos anos em que moramos juntas em Goiânia e por sempre cuidar de mim lá. Bob, obrigada por ser o melhor tunhado que eu poderia ter.

**Tainã Dias** e **Mylla Crysthyan**, obrigada por serem minhas amigas mais presentes nos últimos anos, sempre me deixando falar da minha pesquisa, dos meus medos e das minhas alegrias. Obrigada por estarem comigo em momentos bons e ruins, sempre.

**Breno Junqueira,** quando tudo isso começou você era meu namorado a algum tempo. Quatro anos se passaram e agora, no fim desse ciclo, outro começa em minha vida. Nosso namoro frutificou num noivado, com casamento em breve e sou muito feliz contigo. Obrigada pela paciência nesses quatro anos, por aguentar e superar as dores de um relacionamento a distância e por estar comigo e todos os momentos.

E por fim, àqueles que aceitaram participar desse momento comigo, dispondo de seu tempo e conhecimento para oportunizar melhorias nessa pesquisa. Meu muito obrigada a vocês: **Prof. Marcos Cunha, Dr. Luke Tembrock, Dr. Todd Gilligan, Prof. Érico Dianese, Dra. Regina Sartori, Dra. Alicia Timm, Prof. Karina Albernaz-Godinho, Prof. Cecília Czepak e Prof. Nadson Pontes**.

# SUMÁRIO

RESU	J <b>MO</b>	15
ABST	TRACT	16
1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	PRODUÇÃO AGRÍCOLA NO BRASIL	19
2.2	SUBFAMÍLIA HELIOTHINAE	
2.3	Helicoverpa armigera	
2.3.1	Alimentação	22
2.3.2	Ciclo evolutivo	24
2.4	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	
2.5	PCR EM TEMPO REAL	
2.6	PCR DIGITAL	
2.7	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	
2.8	REFERÊNCIAS	
3.	A TALE OF TWO ASSAYS: HOW OPTIMIZATION CAN EQUA	ALIZE THE
	SENSITIVITY OF REAL-TIME PCR WITH DDPCR FOR DETH	ECTION OF
	HELICOVERPA ARMIGERA (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE	) IN BULK
	SAMPLES	44
3.1	INTRODUCTION	45
3.2	MATERIALS AND METHODS	47
3.2.1	Origin and type of insect material	47
3.2.2	Single specimen DNA extraction	47
3.2.3	Bulk DNA extraction	47
3.2.4	Primer and probe design	48
3.2.5	Real-Time PCR	49
3.2.6	Real-time PCR sensitivity analyses	50
3.2.7	Real-time PCR comparative analyses	51
3.2.8	ddPCR	51

3.3	RESULTS	52
3.3.1	Real-Time PCR assay optimization	52
3.3.2	Real-time PCR sensitivity as determined with high-quality template DNA	
	from <i>H. armigera</i>	54
3.3.3	Increased salt improves squish buffer bulk extractions	56
3.3.4	Real-time PCR bulk sample results	57
3.3.5	Bead purification and simplex reactions improve sensitivity for real-time	
	PCR using bulk samples	57
3.3.6	Interpretation rule set and RFU threshold setting for real-time PCR	60
3.3.7	ddPCR bulk sample results and the relative performance of EvaGreen an	ıd
	hydrolysis probe detection	61
3.4	DISCUSSION	64
3.5	REFERENCES	68
3.6	SUPPLEMENTARY MATERIALS	72
4.	CONCLUSÃO	75

# LISTA DE TABELAS

Table 3.1: primers and probes used in this study 49
Table 3.2: real-time PCR results from primer concentration gradient; probe at 200nM 52
Table 3.3: real-time PCR results from probe concentration; primers at 500nM each
Table 3.4: real-time PCR results from temperature gradient with primers at 500nM and probe
at 160nM
Table 3.5: real-time PCR results from squish buffer formulations and centrifugation speeds
Table 3.6: real-time PCR results from high salt formulations of squish buffer
Table 3.7: real-time PCR results from varying ratios of Helicoverpa armigera legs: H. zea
legs
Table 3.8: real-time PCR results of ratios (1 Helicoverpa armigera leg: 50 H. zea legs) with
and without bead purification (BP) and presence of 18S control primers and probes (Ctrl)
Supplementary Table S3.1: 1:50 ratio replicate IDs72
Supplementary Table S3.2: Analysis of variance74

# LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Mapa mundial de distribuição de Helicoverpa armigera
Figura 2.2: Danos causados por <i>Helicoverpa armigera</i> em folhas e fruto
Figura 2.3: Danos causados por <i>Helicoverpa armigera</i> em tomate
Figura 2.4: Ovo de <i>Helicoverpa armigera</i>
Figura 2.5: Variação de cores em lagartas de quarto ínstar de Helicoverpa armigera 26
Figura 2.6: Lagarta de <i>Helicoverpa armigera</i>
Figura 2.7: Pupa de <i>Helicoverpa armigera</i>
Figura 2.8: Adultos de Helicoverpa armigera: a) Fêmea; b) Macho
Figura 2.9: Adulto de <i>Chloridea virescens</i>
Figura 2.10: Terminologia da genitália do gênero <i>Helicoverpa</i>
Figura 2.11: Oitavo urosternito e lóbulo(s) na base da vesica das espécies Helicoverpa zea e
H. armigera
Figura 2.12: Válvulas da espécie Helicoverpa zea de tamanho maior que as válvulas da
espécie <i>H. armigera</i>
Figura 2.13: Edeago das espécies Helicoverpa zea e H. armigera
Figura 2.14: Etapas da amplificação por PCR
Figura 2.15: Gráfico de amplificação exibido em ensaio de qPCR
Figura 2.16: Esquema de particionamento em gotas para PCR digital
Figura 2.17: Etapas e alguns equipamentos usados na PCR digital
Figure 3.1: (a) Amplification plot generated by serial dilution of Helicoverpa armigera
template DNA for the ITS1 diagnostic probes; (b) Serial dilutions of template DNA for 6 H.
armigera individuals with a standard curve based on response in Cq for the ITS1 diagnostic
and 18S control probes run in duplex. The scale of axis x was transformed by log 10 55
Figure 3.2: Response in real-time PCR end RFU values across 59 bulk samples with and
without bead purification and with and without the use of internal 18S control probes by
Tukey test at 5% of significance. The bar represents the minimum significant difference of
the test
Figure 3.3: When the probe is used for ddPCR, an alternate cluster of droplets is evident for
some samples. a) the cluster is prominent between the positive (blue) and negative (grey)

droplets in lanes labeled 1 Ha: 80 Hz and 1 Ha: 100 Hz. b) the cluster is still evident after

assay optimization and use of a touchdown thermocycling program. It is evident in the lanes
labeled 0.4ng <i>Ha</i> 1 and 0.04ng <i>Ha</i> 162
Figure 3.4: The ddPCR assay using EvaGreen is sensitive and able to detect Helicoverpa
armigera DNA to $4x10^{-5}$ ng/ reaction. Positive droplets are shown in blue, negative droplets
are shown in grey
Figure 3.5: The ddPCR assay using EvaGreen is specific to Helicoverpa armigera and is
able to detect a single H. armigera leg in up to 500 H. zea legs. Positive droplets are shown
in blue, negative droplets are shown in grey
Figure 3.6: The ddPCR assay using EvaGreen can be used to detect Helicoverpa armigera
DNA in ratios of 1 H. armigera leg: 50 H. zea legs when the quality of the H. armigera
specimens is decreased with the same rate of false negatives as the real-time PCR assay
using the hydrolysis probe. Positive droplets are shown in blue, negative droplets are shown
in grey. The sample labels correspond to Table 3.8
Supplementary Figure S3.1: False positive rate and limit of detection were determined for
the ddPCR assay using EvaGreen by running DNA extractions from 50 Helicoverpa zea
legs. Positive droplets are shown in blue, negative droplets are shown in grey74

## **RESUMO**

OLIVEIRA, T. M. R. Identificação molecular de *Helicoverpa Armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). 2021. 75 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Fitossanidade) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2021<sup>1</sup>.

Encontrada anteriormente apenas em continentes do Velho Mundo, a lagarta Helicoverpa armigera Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) é capaz de grandes danos econômicos, chegando a ser considerada uma das mais destrutivas pragas agrícolas. Sua identificação por meio da análise morfológica só é possível com dissecção complexa da genitália masculina adulta. A morfologia de todas as fases do ciclo de vida, ovo, larva, pupa e adulto, é muito semelhante com a morfologia de outras espécies do gênero, dificultando a identificação. Por ser praga altamente invasiva e observando-se que a correta identificação é o primeiro passo a ser tomado para decisão da melhor estratégia de manejo, percebemos a necessidade de ferramentas precisas, fáceis e rápidas para identificação dessa espécie. Assim, o objetivo do trabalho foi desenvolver primers específicos e otimizar diferentes protocolos para utilização nas metodologias de PCR em tempo real e PCR digital de forma a identificar H. armigera, mesmo que essa amostra seja de má qualidade, apenas um fragmento e/ou esteja misturada com outras espécies. Para tanto, foram realizados desenho, seleção e otimização das concentrações dos primers e sonda, gradientes de temperatura de anelamento dos primers, testes e adaptações com diferentes métodos de extração de DNA, com ou sem purificação pós-extração, testes com diferentes taxas de DNA de H. zea e H. armigera misturados em uma mesma reação, determinação da sensibilidade máxima em ambas as metodologias e interpretação dos dados obtidos. Dessa forma, apresentamos os protocolos desenvolvidos para identificar com sucesso a espécie *H. armigera*, tanto na metodologia de PCR em tempo real quanto na metodologia de PCR digital.

Palavras-chave: lagarta do velho mundo, PCR, primers específicos.

<sup>1</sup> Orientador: Prof. Dr. Marcos Cunha. EA/UFG. Coorientadores: Dr. Luke Tembrock. AgBio/CSU.; Dr. Todd Gilligan. APHIS/USDA.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, T. M. R. **Molecular identification of** *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). 2021. 75 p. Thesis (PhD. in Agronomy: Phytosanity) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2021<sup>1</sup>.

Previously found only on Old World continents, the caterpillar Helicoverpa armigera Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) is capable of great economic damage, coming to be considered one of the most destructive agricultural pests. Its identification through morphological analysis is only possible with complex dissection of the adult male genitalia. The morphology of all phases of the life cycle, egg, larva, pupa and adult, is very similar with the morphology of other species of the genus, making the identification difficult. As it is a highly invasive pest and correct identification is the first step to be taken to decide the best management strategy, we realize the need for precise, easy and fast tools for the identification of this species. Thus, the objective of the work was to develop specific primers and to optimize different protocols for use in real-time PCR and digital PCR methodologies in order to identify *H. armigera*, even if this sample is of poor quality, only a fragment and/or is mixed with other species. For that, design, selection and optimization of primer and probe concentrations, primer annealing temperature gradients, tests and adaptations with different DNA extraction methods were carried out, with or without post-DNA extraction purification, tests with different ratios of H. zea and H. armigera mixed in the same reaction, determination of the maximum sensitivity in both methodologies and interpretation of the obtained data. We present the protocols developed to successfully identify the specie H. armigera, both with real-time PCR and digital PCR methodologies.

Keywords: old world bollworm, PCR, specie-specific primers.

<sup>1</sup> Advisor: Prof. Marcos Cunha, Ph.D. EA/UFG. Co-advisors: Luke Tembrock, Ph.D. AgBio/CSU.; Todd Gilligan, Ph.D. APHIS/USDA.

# 1. INTRODUÇÃO

Considerando as espécies pertencentes à subfamília Heliothinae, pouco se sabe sobre a espécie predominante desta subfamília de lagartas que ocorrem no campo no estado de Goiás. Por vir se estabelecendo em ritmo acelerado, a espécie *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) poderia estar suprimindo as demais populações da subfamília, principalmente por seu comportamento altamente polífago. Entretanto, nas condições edafoclimáticas das regiões produtoras do referido estado, o comportamento biológico desta praga ainda é desconhecido (Czepak et al., 2013a).

*H. armigera* é uma praga encontrada em várias regiões do país, causando severos prejuízos em diversas culturas (Sosa-Gómez et al., 2016). Essa praga foi considerada como quarentenária A1, porém foi constatada no Brasil na safra 2012/2013, com registros de ocorrência nos estados de Goiás, Bahia e Mato Grosso (Czepak et al., 2013a).

A identificação equivocada de uma espécie, principalmente quando essa é morfologicamente similar a outras, causa grande dificuldade na escolha do método de controle a ser utilizado (Walsh et al., 2019). Quando detectados os primeiros surtos de *H. armigera*, foram utilizados inseticidas para o controle. Em falhas de controle de insetos-praga observa-se o aumento do número de aplicações e a dose dos inseticidas utilizados, contribuindo para a rápida evolução da resistência das populações desta praga aos inseticidas. Além disso, o que também pode ter contribuído para essa evolução, é que a data provável da entrada da praga no Brasil teria sido em 2008, e até que realizada a sua primeira identificação, em 2013, as estratégias de controle utilizadas eram ineficientes, uma vez que eram direcionadas para outras espécies (Sosa-Gómez et al., 2016).

Para refutar ou confirmar tais especulações sobre a prevalência da *H. armigera* em diferentes sistemas de cultivo, estudos focados neste tema se fazem necessários. Buscando facilitar esses estudos, métodos moleculares têm sido utilizados na esperança de reduzir as dificuldades encontradas na identificação de espécies, entretanto, poucas ferramentas realmente eficientes estão disponíveis.

Com isso, há uma crescente necessidade por ferramentas, como por exemplo, o desenho e desenvolvimento de *primers* específicos, que permitam a identificação segura e eficaz desta espécie. Neste trabalho, realizamos o desenho de *primers* e sonda específicos para a identificação de *Helicoverpa armigera*, assim como, todo o desenvolvimento e padronização de protocolos para a sua utilização em diferentes tecnologias de PCR (*Polymerase Chain Reaction*): a PCR em tempo real e a PCR digital.

# 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1 PRODUÇÃO AGRÍCOLA NO BRASIL

Um dos principais alicerces da economia brasileira é a agricultura, evoluindo desde a colonização do País com grandes monocultivos até a diversificação atual da produção. Parte do setor primário, a atividade agrícola se baseia no cultivo para subsistência, exportação ou comércio (Czepak et al., 3013b).

A demanda por vegetais, produtos vegetais ou agrícolas, industrializados ou *in natura*, visando suprir as necessidades alimentares, energéticas, de vestuário, entre outras, tem aumentado mais a cada ano. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) a safra 2020/21 de grãos no Brasil tem previsão de 6,5% de crescimento em relação à safra passada, alcançando um volume de produção de 273,8 milhões de toneladas. As principais culturas produzidas são soja (135,5 milhões de toneladas), milho (entre a primeira e segunda safra pode chegar a 109 milhões de toneladas), arroz (11,1 milhões de toneladas), algodão em caroço (6,1 milhões de toneladas) e feijão (entre suas três safras pode completar 3,3 milhões de toneladas), totalizando 96,78% do que será produzido nesta safra de grãos (CONAB, 2021).

Em março de 2021, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a região Centro-Oeste participou com 45,5% e o estado de Goiás com 9,7% da produção nacional total de grãos. O Estado de Goiás foi responsável por 46,86% da produção nacional total de sorgo granífero; 28,82% da produção de tomate; 11,05% da produção de cana-de-açúcar; 10,83% da produção milho; 10,60% da produção de feijão; 9,59% da produção de soja e 2,57% da produção de algodão. Em relação aos demais estados produtores da federação brasileira, Goiás é o maior produtor de sorgo granífero e de tomate; o terceiro em produção de cana-de-açúcar, milho, feijão e algodão; e o quarto em produção de soja e grãos em geral (IBGE, 2021).

Vários fatores podem comprometer negativamente esse alto potencial de produção agrícola, dentre eles, a invasão de espécies de pragas exóticas altamente prejudiciais.

## 2.2 SUBFAMÍLIA HELIOTHINAE

Atrelado à expansão da agricultura alguns problemas têm sido observados como o aumento de doenças e pragas nos diversos tipos de cultivo. Várias espécies, por se alimentarem de plantas cultivadas, são de extrema importância econômica, apresentando-se como pragas a algumas culturas (Specht et al., 2005).

As lagartas da subfamília Heliothinae têm atacado intensamente diferentes culturas de importância econômica, como soja, algodão, milho, tomate e feijão, independentemente de serem transgênicas ou não (expressando as proteínas Bt) (Czepak et al., 2013b). Há relatos de ocorrência de 18 espécies do gênero Helicoverpa em todo mundo (Mitter et al., 1993), sendo quatro delas de maior importância econômica (Behere et al., 2007; Behere et al., 2008): Helicoverpa zea Boddie, conhecida como a lagarta-da-espigado-milho ou broca-do-tomateiro, de ocorrência nas Américas (Behere et al., 2007; Behere et al., 2008) nos cultivos de algodão, tomate, milho e soja (Ávila et al., 2013); Helicoverpa punctigera Wallengreen, polífaga, porém endêmica da Austrália (Fitt, 1989); Helicoverpa assulta Guenée, se alimenta de Solanáceas e de ocorrência comum na Índia (Matthews, 1999) e Helicoverpa armigera Hübner, com grande distribuição mundial, ocorrendo em países da América do Sul, Ásia, África, Europa e Oceania (Behere et al., 2008). A espécie Helicoverpa gelotopoeon Dyar é endêmica no Uruguai, Chile e Argentina (Mitter et al., 1993), também capaz de causar grandes danos econômicos, além de a lagarta ser de difícil diferenciação da lagarta de H. armigera (Arneodo et al., 2015). Além dessas, há ainda espécies de outros gêneros, como Chloridea virescens Fabricius, espécie conhecida como lagarta-das-maças-do-algodoeiro, de longa ocorrência no Brasil causando também grandes danos nos cultivos de algodão, soja e tomate (Ávila et al., 2013).

## 2.3 Helicoverpa armigera

Descrita em 1809 pelo entomologista alemão Jacob Hübner, a espécie *H. armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) apresenta grande capacidade de dispersão, podendo o

inseto adulto migrar uma distância de até 1000 km (Pedgley, 1985). Com isso, já teve sua presença registrada na África, Ásia, Oceania e Europa (regiões Sul e Central), mas só foi constatada no Brasil por volta de 2012/2013 (Czepak et al., 2013a; Tay et al., 2013), onde até então era considerada uma praga quarentenária A1, sendo esse o seu primeiro registro na América (Ávila et al., 2013). Novos registros na América se sucederam então, em países como Bolívia (Kriticos et al., 2015), Argentina (Murúa et al., 2014; Arneodo et al., 2015), Paraguai e Uruguai (Arnemann et al., 2016), Flórida (El-Lissy, 2015) e Porto Rico (Smith, 2014), além de lagartas interceptadas na fronteira dos Estados Unidos originárias do Peru (Gilligan et al., 2019) (Figura 2.1).



Figura 2.1: Mapa mundial de distribuição de *Helicoverpa armigera*. Fonte: CABI. http://www.cabi.org/isc/datasheet/26757

Os primeiros registros de ocorrência de *H. armigera* no Brasil foram no início de 2013, na cultura da soja, nos estados de Goiás, Bahia e Mato Grosso e confirmados por identificação morfológica externa, como padrão e cores das asas, e interna, pela observação do aparelho reprodutor do macho adulto (Czepak et al., 2013a). Ainda em 2013, os danos econômicos mais significativos causados por *H. armigera* foram registrados nas culturas do algodão, milho, soja, feijão, tomate e sorgo (Ávila et al., 2013).

Destaque entre as espécies que compõe o gênero, é considerada uma das, senão a, mais importante praga da ordem, disseminada por praticamente todo o Velho Mundo (Mitter et al., 1993; Behere et al., 2007). *H. armigera* tem se mostrado como uma grande ameaça aos mais diversos cultivos do nosso país, principalmente por sua alta capacidade de dispersão e desenvolvimento em diversos hospedeiros, com alto potencial de dano econômico (Czepak et al., 2013b; Specht et al., 2013; Thomazoni et al., 2013; Kuss et al., 2016).

A origem da incursão de *H. armigera* na América ainda é debatida, mas estudos demonstram que provavelmente esta foi uma migração natural ou mediada por humanos (Tay et al., 2017, Tembrock et al., 2019) com capacidade de causar ainda mais perdas enquanto se dissemina para a América do Sul e Central, e potencial incursão e estabelecimento na América do Norte (Kriticos et al., 2015).

A caracterização taxonômica da espécie mostrou a possibilidade de uma distinção em duas principais subespécies por regiões: a subespécie *H. armigera armigera*, encontrada em regiões temperadas e tropicais da Ásia, Europa, África e América, e a subespécie *H. armigera conferta*, encontrada nas populações da região da Austrália e Nova Zelândia (Matthews, 1999; Anderson et al., 2016; Anderson et al., 2018).

Adultos de *H. armigera* são de migração facultativa e adeptos a voos de longas distâncias. Estudos mostraram pouca variação genética entre grupos amplamente separados geograficamente abaixo do nível de subespécie, o que apoia a possibilidade de que a migração da espécie *H. armigera* ocorreu em grandes distâncias (Zhou et al., 2000; Behere et al., 2013; Anderson et al., 2016). Dados de sequências de DNA mitocondrial sugerem a existência de uma única espécie de *H. armigera* em toda a África, Ásia e Austrália, devido a evidências de fluxo gênico intercontinental, confirmando a capacidade dessa espécie de migrar longas distâncias (Behere et al., 2007).

## 2.3.1 Alimentação

Por ser altamente polífaga e apresentar grande mobilidade, a espécie *H. armigera* tem se adaptado a diferentes cultivos e causado danos em diversas espécies vegetais. Foram listadas 68 famílias diferentes de plantas hospedeiras, abrangendo entre elas, espécies de grande importância econômica como tomate, soja, sorgo, milheto, feijão, capins, cevada, gergelim, tabaco, algodão, milho, trigo, arroz, café, aveia, batata e citros, além de outras hortaliças, flores e espécies ornamentais como petúnias, gladíolos, boca-de-leão, hibiscos, rabo-de-gato, cravos, tremoço, dálias, girassol, alfafa, colza, mostarda, brócolis, repolho, canola, beterraba, gengibre, amendoim, mamona, grão de bico, feijão de corda, ervilha,

orégano, quiabo, pimentão, pimenta, alface, melancia e frutíferas como laranja, limão, morango, maracujá, mamão, banana e uva, além de plantas daninhas como serralha, caruru, buva, borragem, bredo, malva branca, entre outras, comprovando sua grande capacidade de adaptação (Cunningham & Zalucki, 2014).

Capazes de se alimentar em diferentes estádios de desenvolvimento, as lagartas de *H. armigera* se alimentam da maioria das estruturas da planta, desde hastes, folhas (podendo reduzir drasticamente a área foliar) (Bueno et al., 2014), e com preferências por estruturas reprodutivas como botões florais, maças, espigas, inflorescências e os frutos (Figura 2.2). Elas podem penetrar nas plantas, por exemplo, na base de brotos de flores ou frutas (Ávila et al., 2013). Este hábito pode causar infecções secundárias nos tecidos danificados e pode levar à podridão do fruto ou folha. Quando ainda muito jovens e pequenas, as lagartas penetram profundamente em frutos de tomateiro (Figura 2.3) e são negligenciadas em materiais destinados à indústria, causando assim uma alta taxa de perdas comerciais (García, 2006).



Figura 2.2: Danos causados por Helicoverpa armigera em folhas e fruto.

Fontes: https://maissoja.com.br/10-principais-pragas-da-soja-helicoverpa-armigera/ e https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/lagarta-helicoverpa-armigera-podeatacar-citros/227



Figura 2.3: Danos causados por *Helicoverpa armigera* em tomate. Fonte: https://www.gazetanewsrs.com.br/2018/10/07/como-controlar-a-helicoverpa-armigera/

Devido a sua polifagia, apesar de geralmente se alimentarem e realizarem suas posturas nas plantas hospedeiras preferenciais, há a disponibilidade de uma ampla gama de hospedeiros alternativos próximos as áreas de cultivo. Esses hospedeiros servirão como um reservatório, dando suporte a manutenção da dinâmica sazonal do inseto e garantindo a sobrevivência dos insetos durante todo o ano (Fitt, 1989).

## 2.3.2 Ciclo evolutivo

O ciclo evolutivo de *H. armigera*, desde o ovo até a forma adulta dura geralmente de 40 a 45 dias, a depender das condições ambientais como temperatura e qualidade nutricional do hospedeiro (Fitt, 1989; Venette et al., 2003). Os adultos desta praga têm hábitos noturnos, voando preferencialmente no crepúsculo, conforme observado no campo, mas podem também apresentar voos no meio da noite e, de forma menos frequente, alguns retardatários são encontrados durante o dia (Fitt, 1989).

A espécie é inseto holometábolo apresentando os estágios de ovo, lagarta, prépupa, pupa e adulto (Ávila et al., 2013). Os ovos inicialmente possuem coloração brancoamarelada com aspecto brilhante, a porção apical lisa e a superfície restante coberta de nervuras longitudinais (Figura 2.4), e ao se aproximar da eclosão das larvas adquire a coloração marrom. Os ovos apresentam comprimento e largura variando de 0,4 a 0,6 mm e o período de incubação é de aproximadamente 3 dias (Ali et al., 2009; Ávila et al., 2013). Cada fêmea fértil produz milhares de ovos, ovipositando até 3000 ovos sobre plantas hospedeiras, ocasionando um rápido aumento na população de lagartas, levando a danos severos nas culturas como resultado de sua alimentação (Reed, 1965; Naseri et al., 2011).



Figura 2.4: Ovo de *Helicoverpa armigera* Fonte: Ávila et al. (2013)

As fêmeas geralmente ovipositam no período noturno e os ovos podem ser colocados individualmente ou em pequenos grupos em um mesmo local, sempre em partes mais altas, tenras e pilosas da planta e, de preferência, em inflorescências ou frutos em formação. Entretanto, também é possível observar a presença de ovos em folhas, brotações e talos. A eclosão pode ocorrer em dois a três dias nos períodos mais quentes do ano e em quatro a doze dias nos períodos mais frios (Reed, 1965; Fitt, 1989; García, 2006).

A fase larval é completada em seis instares e tem a duração de treze a vinte e dois dias, dependendo das condições climáticas. Durante os primeiros ínstares larvais, possuem a coloração variando de branco-amarelada a marrom-avermelhada e cápsula cefálica variando entre marrom-escuro a preto, nesta fase alimentam-se primeiramente das partes mais tenras das plantas, e podem produzir uma teia ou um pequeno casulo (Ávila et al., 2013). Conforme as lagartas se desenvolvem podem apresentar diferentes tipos de pigmentação, variando de amarelada, esverdeada, avermelhada ou até marrom (Figura 2.5), exibindo listras de coloração escura lateralmente no tórax, abdome e na cabeça. A coloração é influenciada por diferentes fatores, como a temperatura, ou o tipo de alimentação e hospedeiro (Ali et al., 2009). Apresentam a cápsula cefálica de cor parda clara, pelos presentes e linhas finas brancas laterais (Matthews, 1999).



Figura 2.5: Variação de cores em lagartas de quarto ínstar de *Helicoverpa armigera* Fonte: Teodoro et al. (2015).

No quarto ínstar, as lagartas têm tubérculos abdominais escuros bem visíveis com formato de "sela" na região dorsal do primeiro segmento abdominal (Figura 2.6), característica essa que auxilia na identificação morfológica (Matthews, 1999; Czepak et al., 2013a). Outra particularidade perceptível em lagartas dessa espécie é à textura do seu tegumento, que apresenta aspecto levemente coriáceo em relação às demais espécies de Heliothinae que ocorrem no Brasil. Além disso, quando a lagarta de *H. armigera* é tocada, apresenta o comportamento de encurvar a cápsula cefálica em direção à região ventral do primeiro par de falsas pernas, por onde permanece por certo tempo, como comportamento de defesa (Ávila et al., 2013; Czepak et al., 2013a).



Figura 2.6: Lagarta de *Helicoverpa armigera*. Fonte: CSIRO. https://phys.org/news/2017-08-genome-megapests.html

A lagarta pode atingir até 4,0 cm de comprimento no último instar e ao fim do ciclo vai ao solo para empupar, construindo uma câmara onde pode permanecer por dez a quinze dias até a emergência do adulto. As pupas desta espécie possuem coloração marrommogno e superfície arredondada nas partes terminais (Figura 2.7) (Ali et al., 2009). Caso as condições climáticas não sejam favoráveis, pode continuar nesta fase por, pelo menos, 140 dias, ou até que a umidade e a temperatura do solo estejam adequadas para o início de novo ciclo da praga, apresentando, portanto, diapausa pupal facultativa (Fitt, 1989; Venette et al., 2003).



Figura 2.7: Pupa de *Helicoverpa armigera*. Fonte: https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/1832002/helicoverpa-armigera

Após emergência no solo, os adultos de *H. armigera* podem sobreviver de 5 a 36 dias a depender da alimentação, temperatura e disponibilidade de água (Venette et al., 2003). As asas anteriores são mais escuras e apresentam sete a oito manchas dispostas em uma linha na margem das asas e acima desta linha, uma larga faixa irregular marrom e ventralmente apresentam uma marca em forma de vírgula no centro (Czepak et al., 2013a; Teodoro et al., 2015). Já as asas posteriores apresentam coloração mais clara, com uma faixa larga de cor marrom escura nas margens e uma mancha clara no centro dessa faixa (Czepak et al., 2013a).

Apresentam dimorfismo sexual, podendo ser diferenciados por meio da cor e tamanho das asas. A fêmea possui o primeiro par de asas de tom base castanho rosado e envergadura aproximada de 40 mm (Figura 2.8a), já os machos apresentam o primeiro par de asas de cor verde acinzentada e cerca de 35 mm de envergadura (Figura 2.8b) (Jayaraj,

1982). A longevidade média das fêmeas é de 11,7 dias, e os machos de 9,2 dias (Ali et al., 2009). Outra diferença que pode ser observada é o formato do abdome, sendo o da fêmea mais arredondado (Jayaraj, 1982).



Figura 2.8: Adultos de *Helicoverpa armigera:* a) Fêmea; b) Macho.Fonte: Birgit E. Rhode, Landcare Research New Zealand Ltd. https://commons.wikimedia.org

Os adultos são mais atraídos por flores que produzem néctar, recurso de grande importância principalmente para escolha do hospedeiro, o que influencia também sua capacidade de oviposição (Cunningham & Zalucki, 2014). A oviposição começa entre dois e seis dias após a emergência. Após a incubação, a lagarta nasce e o ciclo recomeça (Venette et al., 2003).

A capacidade de sobrevivência e de se manter ativos mesmo em condições desfavoráveis (Fitt, 1989), juntamente com a possibilidade da fêmea de ovipositar milhares de ovos é uma característica que favorece a sua disseminação, isso além de poder ter de 7 a 9 gerações por ano (Venette et al., 2003; Naseri et al., 2011).

As formas adultas de *H. armigera* podem reconhecer os hospedeiros nos quais se desenvolveram durante as fases larvais. Informações como essas são importantíssimos indicativos para realização de monitoramentos da presença da praga e possibilita a elaboração de controle nas diferentes paisagens agrícolas e silvestres do país (Czepak et al., 2013b).

## 2.4 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

As características morfológicas, biológicas e comportamentais de *H. armigera* são muito semelhantes às demais espécies da subfamília Heliothinae, sendo assim facilmente

confundida, dificultando sua identificação, principalmente em relação aos outros exemplares do gênero como *H. gelotopoeon, H. zea, H. punctigera* e *H. assulta*. A morfologia externa desses insetos, em todas as fases do ciclo biológico [ovo, larva (lagarta), pupa e adulto] são muito semelhantes, dificultando a identificação a olho nu (Czepak et al., 2013a; Arneodo et al., 2015).

Quanto a identificação de *H. armigera* comparada com outro gênero da mesma subfamília, a *Chloridea virescens*, na fase adulta (mariposa) é diferenciada pela presença de três listras oblíquas na asa anterior (Figura 2.9) (Pogue, 2013), entretanto em suas outras fases a diferenciação é extremamente complicada, especialmente do ovo e da lagarta (Venette et al., 2003).



Figura 2.9: Adulto de *Chloridea virescens* Fonte: https://www.butterfliesandmoths.org/species/Heliothis-virescens

A identificação do gênero *Helicoverpa* pode se dar por meio de algumas características da morfologia interna detectados por microscópio eletrônico de varredura ou até mesmo, tomografia computadorizada (Zenker et al., 2007; Lowe et al., 2013). No entanto, a microscopia ótica, utilizando metodologias de coloração histológicas, tem sido a técnica tradicionalmente empregada na diferenciação da morfologia dos órgãos genitais do macho (Pogue, 2004), sendo que neste caso, torna-se imprescindível a obtenção de indivíduos machos adultos (Murúa et al., 2014).

Uma vez obtidos os machos adultos, inicia-se a dessecação da genitália (Figura 2.10). Para tanto, com auxílio de pinça, retira-se os abdomens de cada inseto e esses serão

umedecidos em álcool por 2 minutos para facilitar a submersão quando adicionados na solução aquosa de KOH (Pogue, 2004; Brambila, 2009). Após a remoção do álcool, os abdomens serão mantidos em solução aquosa de KOH (10%) por 24 horas (Specht et al., 2013). O KOH macera os tecidos, remove as proteínas e lipídeos, mantendo as estruturas quitinosas como os tecidos do abdome e as válvulas. Quando se necessitar de um preparo mais rápido, pode-se realizar o clareamento, mantendo os abdomens em KOH 10% a 50°C por 45 minutos em banho-maria, em seguida, deixar resfriar lentamente por 10 a 30 minutos (Brambila, 2009). Com um abdome posicionado em placa de petri com álcool para exame em microscópio, use um pincel para fazer a limpeza do abdome. As cerdas devem ser retiradas suavemente, com o devido cuidado para não danificar o abdome. Com uma pinça curva ou pincel obtém-se a genitália (Pogue, 2004; Brambila, 2009).



Figura 2.10: Terminologia da genitália do gênero Helicoverpa

Diversas características podem ser analisadas na estrutura da genitália do inseto adulto macho. As estruturas mais importantes para a identificação de *H. armigera* são o formato pontiagudo nos ápices distais e a margem ventral em formato de V do oitavo urosternito, sendo os ápices distais mais arrendondados e a margem ventral em formato de

Fonte: Adaptado de Christi Jaeger, MEM. https://mothphotographersgroup.msstate.edu. Terminologia de acordo com Brambila (2009).

U na espécie *H. zea*, e também a presença de um lobo simples na base da vesica na espécie *H. armigera*, em contraste com os três lóbulos contíguos na base da bexiga observados na espécie *H. zea* (Figura 2.11) (Pogue, 2004; Specht et al., 2013). Para observação dos lóbulos é necessário realizar uma eversão da bexiga. Com uma seringa para insulina (agulha de 6 mm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro) (Specht et al., 2013) com meio volume de álcool etanol ou isopropílico, insira a agulha na lateral, próximo a base, do edeago, enquanto segura a base do edeago com pinça. Então, pressione o êmbolo da seringa (Pogue, 2004; Brambila, 2009).





Fonte: Adaptado de Brambila (2009) e Pogue (2004)

Outras características também podem ser observadas. Por exemplo, o tamanho das válvulas pode ser fator de identificação. Para tanto, segurar o edeago na base com um

conjunto de pinças e puxar as válvulas (em conjunto), destacando-as do edeago. Após a separação, segurar cada válvula lateralmente com pinça para abri-la com cuidado. O característico do gênero *Helicoverpa* é que cada uma das válvulas seja longa e fina, não apresente projeções e tenha uma fila de espinhos curvos para dentro na margem apical. Válvulas medindo 5 mm ou mais geralmente pertencem a espécie *H. zea*, enquanto *H. armigera* apresentam válvulas que medem menos que 5 mm (Figura 2.12) (Brambila, 2009).



Figura 2.12: Válvulas da espécie *Helicoverpa zea* de tamanho maior que as válvulas da espécie *H. armigera*.

Fonte: Adaptado de Pogue (2004)

O número de espinhos (cornuti) dentro do edeago também é fator de identificação. Os espinhos estão dispostos em conjuntos, e no caso de o edeago apresentar 12 conjuntos de espinhos ou menos, é característico de *H. armigera*. 15 ou mais conjuntos de espinhos são característicos da espécie *H. zea* (Figura 2.13) (Pogue, 2004; Brambila, 2009).



Figura 2.13: Edeago das espécies *Helicoverpa zea* e *H. armigera*. Fonte: Adaptado de Pogue (2004)

### 2.5 PCR EM TEMPO REAL

Metodologias baseadas em técnicas moleculares têm sido frequentemente utilizadas em estudos sobre a filogenia, polimorfismo e a resistência de *H. armigera* aos princípios ativos dos produtos indicados para o seu controle (Asokan et al., 2012). Dentre as técnicas de biologia molecular tem se destacado a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em Tempo Real ou qPCR. Contribuindo proeminentemente para a biologia moderna, medicina, agricultura e biotecnologia, a PCR consiste em uma reação em cadeia da polimerase, de forma quantitativa, baseada em fluorescência (Bustin, 2010).

A técnica tem as mesmas bases da PCR convencional (primeira geração) utilizando ciclos repetidos de aquecimento e resfriamento de uma reação contendo DNA, oligonucleotídeos específicos (*primers* ou iniciadores), DNA polimerase e dNTPs (nucleotídeos), que resulta na amplificação exponencial de um DNA alvo exclusivo (Figura 2.14).



Figura 2.14: Etapas da amplificação por PCR.

Fonte: https://www.gbo.com/pt\_BR/novidades-e-eventos/noticias/ultimas-noticias/news-detail/news/detail/News/foco-na-ciencia-reacao-em-cadeia-de-polimerase-pcr.html

A simplicidade prática da qPCR (metodologia de segunda geração) é notável em comparação com a PCR clássica. Com a inclusão de um único reagente adicional (uma sonda

marcada com corante ou tingida com sinal fluorescente), permite o monitoramento dessa amplificação e quantificação de seus produtos em tempo real, tornando a ferramenta interessante para a análise da expressão gênica, bem como sua aplicação como ferramenta de diagnose (Bustin, 2010; Nonis et al., 2011; Thornton & Basu, 2011).

Na PCR em tempo real, a análise da emissão de luz é feita por um detector de sinal luminoso. Um amplificador de sinal projeta um gráfico com a absorção de luz obtida após cada ciclo da PCR, sendo que a intensidade do sinal gerado reflete a quantidade do produto formado. O ciclo em que o sinal de amplificação exponencial atinge uma intensidade de fluorescência superior ao limiar de detecção (*Threshold*) é denominado Ct e, o momento em que o Ct é ultrapassado está diretamente relacionado à quantidade de DNA amplificado. Sendo assim, denomina-se *Cycle Threshold* ou Ct o ponto em que a emissão de fluorescência da amostra em teste supera a referência passiva do aparelho (*background*) (Figura 2.15) (Kubista et al., 2006, Hindson et al., 2011).



Figura 2.15: Gráfico de amplificação exibido em ensaio de qPCR.

Fonte: https://www.researchgate.net/figure/Figura-9-Grafico-de-amplificacao-da-PCR-em-Tempo-Real-Adaptado-de-Bio-Rad-Laboratories\_fig9\_269109650

Comparando-se a qPCR com a PCR convencional, várias são as vantagens da qPCR. Entre elas, o tempo de execução, a sensibilidade, a possibilidade de quantificação, não necessitar de eletroforese e foto documentação e a interpretação objetiva dos resultados.
Mas principalmente, à amplificação na qPCR pode ser acompanhada em tempo real e analisada na sua fase exponencial, enquanto na PCR convencional o resultado só pode ser observado ao final da reação, e o produto que observamos é a amplificação na sua fase final ou platô, o que pode gerar resultados variáveis mesmo quando as amostras tinham a mesma quantidade de DNA inicial, sendo assim, as análises realizadas na fase exponencial são mais precisas e detectadas progressivamente (Thermo Fisher Scientific, 2016).

#### 2.6 PCR DIGITAL

No caso da PCR em tempo real, os valores *Ct* podem ser afetados nos casos em que não haja amplificação perfeita, diminuindo a eficiência dessa técnica. Com isso, uma metodologia de terceira geração e ainda mais sensível que a PCR em tempo real, a PCR digital vem recebendo grande destaque (Hindson et al., 2011).

Na metodologia de PCR digital, também conhecida como droplet digital PCR (ddPCR), as moléculas de DNA da amostra são particionadas e distribuídas aleatoriamente em milhares de gotas em emulsão água-óleo (Figura 2.16). Cada gota pode ou não receber uma ou mais moléculas do DNA alvo, que funcionarão como tubos de ensaio independentes onde ocorrerão reações individuais de PCR (Hindson et al., 2011, Pinheiro et al., 2012). Após a amplificação, é possível a determinação da concentração inicial do DNA molde por meio de análise estatística de Poisson. Essa análise é realizada na contabilização da fração de partições positivas (houve amplificação do DNA alvo) e negativas (nenhuma amplificação) por leitura de emissão de fluorescência (Hindson et al., 2013).



Figura 2.16: Esquema de particionamento em gotas para PCR digital.

Fonte: Adaptado de https://labnetwork.com.br/noticias/entenda-como-funciona-a-pcr-digital-dabio-rad/ Apesar do maior custo, principalmente com a aquisição de equipamentos como o gerador de gotas, termociclador, selador de placas e leitor de gotas (Figura 2.17), a PCR digital apresenta muitas características vantajosas se comparada a PCR em tempo real, entre elas, a capacidade de não demandar referências externas para fornecer dados de quantificação absoluta e solidez a variações na eficiência da PCR, produzindo resultados mais precisos, reprodutíveis e de maior qualidade, além de menor sensibilidade a inibidores e contaminantes (Taylor et al., 2017).



Figura 2.17: Etapas e alguns equipamentos usados na PCR digital. Fonte: Adaptado de https://www.medicalexpo.com/pt/prod/bio-rad/product-80676-616185.html

# 2.7 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Alguns métodos moleculares foram utilizados para a identificação de *Helicoverpa armigera* até o momento. Por exemplo, foi desenvolvido um método para a diferenciação das quatro principais espécies do gênero *Helicoverpa*, a *H. armigera*, *H. assulta*, *H. zea* e *H. punctigera* por meio da amplificação de duas regiões de DNA mitocondrial e digestão com duas endonucleases (Behere et al., 2008). Outro pesquisador desenvolveu uma ferramenta para discriminar as espécies *H. armigera*, *H. zea* e *H. gelotopoeon* também por meio de amplificação de região de DNA mitocondrial seguida de digestão com endonuclease (Arneodo et al., 2015).

Apesar de ser o mais laborioso, o sequenciamento é a metodologia que oferece maior resolução na caracterização genética de indivíduos e populações (Bueno-Silva, 2012). Assim, estudos utilizando a técnica de DNA barcoding com dados da região CO1 foram conduzidos para separar as espécies *H. armigera* e *H. zea* (Tay et al., 2013). Um marcador molecular dessa região foi estudado também em associação com um marcador adicional, o *Tpi*, visando a obtenção de um método mais eficaz na identificação de hibridização entre as espécies *H. armigera* e *H. zea* (Nagoshi et al., 2016).

Apesar dos desafios das técnicas moleculares, como a demanda por infraestrutura adequada e alto investimento financeiro, indispensáveis para a execução e a manutenção de estudos com marcadores de DNA (Bueno-Silva, 2012), várias são as aplicabilidades e vantagens. Um exemplo é na identificação espécie-específica de *H. armigera*, podendo ser realizada em qualquer fase de ciclo biológico da praga (ovo, larva, pré-pupa, pupa ou adulto de ambos os sexos) e, até mesmo, quando os espécimes coletados perdem a integridade morfológica e/ou somente fragmentos destes são obtidos (Agustí et al., 1999).

Três estudos baseados no desenho de primer e otimização de protocolo de PCR tem se destacado. Por meio do método de PCR em tempo real, foi desenvolvido um estudo cujo objetivo consiste em utilizar um único par de *primers* e duas sondas hidrolisadas (uma específica para a espécie *H. armigera* e outra específica para a espécie *H. zea*) que por meio da amplificação de um segmento da região ITS2 possibilitam a separação e identificação das espécies (Gilligan et al., 2015). Já o segundo estudo utilizou a análise de curvas de dissociação além da PCR em tempo real, usando diferenças conservadas na região ITS1 para o desenho de novos *primers* para a identificação e separação de *H. armigera* e *H. zea*. Diferente do trabalho anterior, foi demonstrado aqui a possibilidade de se utilizar amostras que contenham mais de um indivíduo, sendo possível detectar a presença de *H. armigera* mesmo que essa esteja misturada com até 24 indivíduos de *H. zea* em uma mesma amostra (Perera et al., 2015). Otimizando os *primers* desenvolvidos por Perera et al. (2015) para uso na metodologia de PCR digital, o último ensaio foi capaz de detectar a presença de um único indivíduo de *H. zea* (Zink et al., 2017).

Assim, percebemos a necessidade de desenho de um *primer* que seja capaz de detectar a presença de *H. armigera* mesmo em meio a uma grande quantidade de indivíduos de *H. zea* não apenas na tecnologia de PCR digital, como também em uma tecnologia mais estabelecida, a PCR em tempo real.

# 2.8 REFERÊNCIAS

AGUSTÍ, N.; DE VICENTE, M.; GABARRA, R. Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction based technique for predator gut analysis. **Molecular ecology**, v. 8, n. 9, p. 1467-1474, 1999.

ALI, A.; CHOUDHURY, R. A.; AHMAD, Z.; RAHMAN, F.; KHAN, F.; AHMAD, S. Some biological characteristics of *Helicoverpa armigera* on chickpea. **Tunisian Journal of Plant Protection**, v. 4, n. 1, p. 99-106, 2009.

ANDERSON, C.; TAY, W. T.; MCGAUGHRAN, A.; GORDON, K.; WALSH, T. K. Population structure and gene flow in the global pest, *Helicoverpa armigera*. **Molecular ecology**, v. 25, n. 21, p. 5296-5311, 2016.

ANDERSON, C. J.; OAKESHOTT, J. G.; TAY, W. T.; GORDON, K. H.; ZWICK, A.; WALSH, T. K. Hybridization and gene flow in the mega-pest lineage of moth, *Helicoverpa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 201718831, 2018.

ARNEMANN, J.; JAMES, W.; WALSH, T.; GUEDES, J.; SMAGGHE, G.; CASTIGLIONI, E.; TAY, W. Mitochondrial DNA COI characterization of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Paraguay and Uruguay. **Genet Mol Res**, v. 15, n. 2, 2016.

ARNEODO, J. D.; BALBI, E. I.; FLORES, F. M.; SCIOCCO-CAP, A. Molecular identification of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae) in Argentina and development of a novel PCR-RFLP method for its rapid differentiation from *H. zea* and *H. gelotopoeon*. Journal of economic entomology, v. 108, n. 6, p. 2505-2510, 2015.

ASOKAN, R.; NAGESHA, S.; MANAMOHAN, M.; KRISHNAKUMAR, N.; MAHADEVASWAMY, H.; REBIJITH, K.; PRAKASH, M.; CHANDRA, G. S. Molecular diversity of *Helicoverpa armigera* Hubner (Noctuidae: Lepidoptera) in India. **Oriental insects**, v. 46, n. 2, p. 130-143, 2012.

ÁVILA, C. J.; VIVAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V. Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. **Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste**, v. 12, 2013.

BEHERE, G.; TAY, W.; RUSSELL, D.; BATTERHAM, P. Molecular markers to discriminate among four pest species of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of entomological research**, v. 98, n. 6, p. 599-603, 2008.

BEHERE, G. T.; TAY, W. T.; RUSSELL, D. A.; HECKEL, D. G.; APPLETON, B. R.; KRANTHI, K. R.; BATTERHAM, P. Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to *H. zea.* **BMC** evolutionary biology, v. 7, n. 1, p. 117, 2007.

BEHERE, G. T.; TAY, W. T.; RUSSELL, D. A.; KRANTHI, K. R.; BATTERHAM, P. Population genetic structure of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae) in India as inferred from EPIC-PCR DNA markers. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e53448, 2013.

BRAMBILA, J. Instruction for dissecting male genitalia of *Helicoverpa* (Lepidotera: Noctuidae) to separate *H. zea* from *H. armigera*. 16 p. 2009. Disponível em: <a href="https://www.aphis.usda.gov/plant\_health/plan\_pest\_info/owb/download/owbscreeningaids2.pedf">https://www.aphis.usda.gov/plant\_health/plan\_pest\_info/owb/download/owbscreeningaids2.pedf</a>>. Acesso em: 08 de Maio de 2021.

BUENO-SILVA, M. Genética molecular e sistemática animal: Um breve histórico, contribuições e desafios. **Estudos de Biologia**, v. 34, n. 83, 2012.

BUENO, R. C. O. D. F.; YAMAMOTO, P. T.; CARVALHO, M. M.; BUENO, N. M. Occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) on citrus in the state of Sao Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 2, p. 520-523, 2014.

BUSTIN, S. A. Why the need for qPCR publication guidelines?—The case for MIQE. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 217-226, 2010.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 8, safra 2020/21, n. 7,sétimo levantamento, abr. 2021. Disponível em: <a href="https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos">https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos</a>. Acesso em: 03 de Maio de 2021

CUNNINGHAM, J. P.; ZALUCKI, M. P. Understanding heliothine (Lepidoptera: Heliothinae) pests: what is a host plant? **Journal of economic entomology**, v. 107, n. 3, p. 881-896, 2014.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C.; VIVAN, L. M.; GUIMARÃES, H. O.; CARVALHAIS, T. First reported occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 1, p. 110-113, 2013a.

CZEPAK, C.; VIVAN, L.; ALBERNAZ, K. Praga da vez. Cultivar: Grandes Culturas, v. 15, n. 167, p. 20-27, 2013b.

EL-LISSY, O. **Detection of old world bollworm** (*Helicoverpa armigera*) in Florida. 2015. Disponível em: <a href="http://www.aphis.usda.gov/plant\_health/plant\_pest\_info/owb/downloads/DA-2015-43.pdf">http://www.aphis.usda.gov/plant\_health/plant\_pest\_info/owb/downloads/DA-2015-43.pdf</a>>.

FITT, G. P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual** review of entomology, v. 34, n. 1, p. 17-53, 1989.

GARCÍA, F. M. Analysis of the Spatio–temporal Distribution of *Helicoverpa armigera* Hb. in a Tomato Field using a Stochastic Approach. **Biosystems Engineering**, v. 93, n. 3, p. 253-259, 2006.

GILLIGAN, T. M.; TEMBROCK, L. R.; FARRIS, R. E.; BARR, N. B.; VAN DER STRATEN, M. J.; VAN DE VOSSENBERG, B. T.; METZ-VERSCHURE, E. A multiplex real-time PCR assay to diagnose and separate *Helicoverpa armigera* and *H. zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in the New World. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0142912, 2015.

GILLIGAN, T. M.; GOLDSTEIN, P. Z.; TIMM, A. E.; FARRIS, R.; LEDEZMA, L.; CUNNINGHAM, A. P. Identification of heliothine (Lepidoptera: Noctuidae) larvae intercepted at U.S. ports of entry from the New World. **Journal of Economic Entomology**, v. 112, n. 2, p. 603-615, 2019.

HINDSON, C. M.; CHEVILLET, J. R.; BRIGGS, H. A.; GALLICHOTTE, E. N.; RUF, I. K.; HINDSON, B. J.; VESSELLA, R. L.; TEWARI, M. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. **Nature Methods** v. 10, p. 1003–1005, 2013. https://doi.org/10.1038/nmeth.2633

HINDSON, B. J. et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. **Analytical chemistry**, v. 83, n. 22, p. 8604-8610, 2011.

IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Mar/2021. 2021. Disponível em: <a href="https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588">https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588</a>>. Acesso em: 03 de Maio de 2021.

JAYARAJ, S. et al. Biological and ecological studies of *Heliothis*. In: **Proceedings of the International Workshop on Heliothis Management**. ICRISAT Center, Patancheru, India, 15-20 November 1981. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, p. 17-28, 1982.

KRITICOS, D. J.; OTA, N.; HUTCHISON, W. D.; BEDDOW, J.; WALSH, T.; TAY, W. T.; BORCHERT, D. M.; PAULA-MOREAS, S. V.; CZEPAK, C.; ZALUCKI, M. P. The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in North America: is it just a matter of time? **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119618, 2015.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONÁK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJÖBACK, R.; SJÖGREEN, B.; STRÖMBOM, L.; STÅHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2, p. 95-125, 2006.

KUSS, C. C.; KUSS-ROGGIA, R. C. R.; BASSO, C. J.; DE OLIVEIRA, M. C. N.; DE CASTRO PIAS, O. H.; ROGGIA, S. Controle de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) em soja com inseticidas químicos e biológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 5, p. 527-536, 2016.

LOWE, T.; GARWOOD, R. J.; SIMONSEN, T. J.; BRADLEY, R. S.; WITHERS, P. J. Metamorphosis revealed: time-lapse three-dimensional imaging inside a living chrysalis. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 10, n. 84, p. 20130304, 2013.

MATTHEWS, M. Heliothine moths of Australia. A guide to pest bollworms and related noctuid groups. CSIRO Publishing, 1999.

MITTER, C.; POOLE, R. W.; MATTHEWS, M. Biosystematics of the Heliothinae (Lepidoptera: Noctuidae). **Annual review of entomology**, v. 38, n. 1, p. 207-225, 1993.

MURÚA, M. G.; SCALORA, F. S.; NAVARRO, F. R.; CAZADO, L. E.; CASMUZ, A.; VILLAGRÁN, M. E.; LOBOS, E.; GASTAMINZA, G. First record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. **Florida Entomologist**, v. 97, n. 2, p. 854-856, 2014.

NAGOSHI, R. N.; GILLIGAN, T. M.; BRAMBILA, J. Combining Tpi and CO1 genetic markers to discriminate invasive *Helicoverpa armigera* from local *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the Southeastern United States. **Journal of** economic entomology, v. 109, n. 5, p. 2115-2124, 2016.

NASERI, B.; FATHIPOUR, Y.; MOHARRAMIPOUR, S.; HOSSEININAVEH, V. Comparative reproductive performance of *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae) reared on thirteen soybean varieties. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 13, n. 1, p. 17-26, 2011.

NONIS, A.; SCORTEGAGNA, M.; NONIS, A.; RUPERTI, B. PRaTo: a web-tool to select optimal *primer* pairs for qPCR. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 415, n. 4, p. 707-708, 2011.

PEDGLEY, D. Windborne migration of *Heliothis armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae) to the British Isles. **Entomologist's Gazette**, v. 36, n. 1, p. 15-20, 1985.

PERERA, O. P.; ALLEN, K. C.; JAIN, D.; PURCELL, M.; LITTLE, N. S.; LUTTRELL, R. G. (2015). Rapid identification of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) using ribosomal RNA internal transcribed spacer 1. Journal of Insect Science, v. 15, n. 1, p. 155, 2015.

PINHEIRO, L. B.; COLEMAN, V. A.; HINDSON, C. M.; HERRMANN, J.; HINDSON, B. J.; BHAT, S.; EMSLIE, K. R. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. **Analytical chemistry**, v. 84 n. 2, p. 1003-1011, 2012.

POGUE, M. G. A new synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiation of adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae). Annals of the Entomological Society of America, v. 97, n. 6, p. 1222-1226, 2004.

POGUE, M. G. Revised status of *Chloridea Duncan* and (Westwood), 1841, for the *Heliothis virescens* species group (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae) based on morphology and three genes. **Systematic Entomology**, v. 38, n. 3, p. 523-542, 2013.

REED, W. *Heliothis armigera* (Hb.)(Noctuidae) in Western Tanganyika. II.—Ecology and natural and chemical control. **Bulletin of entomological research**, v. 56, n. 1, p. 127-140, 1965.

SMITH, E. **Detection of old world bollworm** (*Helicoverpa armigera*) in Puerto Rico. 2014. Disponível em: <a href="http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=600">http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=600</a>>.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; SPECHT, A.; PAULA-MORAES, S. V.; LOPES-LIMA, A.; YANO, S. A.; MICHELI, A.; MORAIS, E. G.; GALLO, P.; PEREIRA, P. R.; SALVADORI, J. R. Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) in Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 60, n. 1, p. 101-104, 2016.

SPECHT, A.; SOSA-GÓMEZ, D. R.; DE PAULA-MORAES, S. V.; YANO, S. A. C. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 6, p. 689-692, 2013.

SPECHT, A.; TESTON, J. A.; DI MARE, R. A.; CORSEUIL, E. Noctuídeos (Lepidoptera, Noctuidae) coletados em quatro áreas estaduais de conservação do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 49, n. 1, p. 130-140, 2005.

TAY, W. T.; SORIA, M. F.; WALSH, T.; THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G. T.; ANDERSON, C.; DOWNES, S. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e80134, 2013.

TAY, W. T.; WALSH, T. K.; DOWNES, S.; ANDERSON, C.; JERMIIN, L. S.; WONG, T. K.; PIPER, M. C.; CHANG, E. S.; MACEDO, I. B.; CZEPAK, C. Mitochondrial DNA and trade data support multiple origins of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae) in Brazil. **Scientific Reports**, v. 7, p. 45302, 2017.

TAYLOR, S. C.; LAPERRIERE, G.; GERMAIN, H. Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-8, 2017.

TEODORO, A.; SANTOS SILVA, S.; PASSOS, E.; MARIA DOS SANTOS, J.; NEGRISOLI, A.; GUZZO, E. Biologia e reconhecimento das principais lagartas-praga do milho de ocorrência no Agreste e Zona da Mata de Alagoas, Bahia e Sergipe. 2015.

TEMBROCK, L. R.; TIMM, A. E.; ZINK, F. A.; GILLIGAN, T. M. Phylogeography of the recent expansion of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in South America and the Caribbean Basin. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 112, n. 4, p. 388-401, 2019.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Endpoint PCR, quantitative PCR and digital PCR. 2016. Disponível em: <a href="https://www.youtube.com/watch?v=9lbz4KBZUIM>">https://www.youtube.com/watch?v=9lbz4KBZUIM>">https://www.youtube.com/watch?v=9lbz4KBZUIM></a>. Acesso em: 02 de Setembro de 2019.

THOMAZONI, D.; SORIA, M.; PEREIRA, E.; DEGRANDE, P. *Helicoverpa armigera*: perigo iminente aos cultivos de algodão, soja e milho do estado de Mato Grosso. **Cuiabá:** Instituto Mato-Grossense do Algodão.(Circular Técnica, 5), 2013.

THORNTON, B.; BASU, C. Real-time PCR (qPCR) *primer* design using free online software. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 39, n. 2, p. 145-154, 2011. Disponível em: <a href="https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bmb.20461">https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bmb.20461</a>.

VENETTE, R.; DAVIS, E.; ZASPEL, Z.; HEISLER, H.; LARSON, M. Mini risk assessment, old world bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae). **US Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service**, 2003.

WALSH, T. K.; PERERA, O.; ANDERSON, C.; GORDON, K.; CZEPAK, C.; MCGAUGHRAN, A.; ZWICK, A.; HACKETT, D.; TAY, W. T. Mitochondrial DNA genomes of five major Helicoverpa pest species from the Old and New Worlds (Lepidoptera: Noctuidae). **Ecology and evolution**, v. 9, n. 5, p. 2933-2944, 2019

ZENKER, M. M.; SPECHT, A.; CORSEUIL, E. Immature stages of Spodoptera cosmioides (Walker)(Lepidoptera, Noctuidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 1, p. 99-107, 2007.

ZHOU, X.; FAKTOR, O.; APPLEBAUM, S. W.; COLL, M. Population structure of the pestiferous moth Helicoverpa armigera in the Eastern Mediterranean using RAPD analysis. **Heredity**, v. 85, n. 3, p. 251, 2000.

ZINK, F. A.; TEMBROCK, L. R.; TIMM, A. E.; FARRIS, R. E.; PERERA, O. P.; GILLIGAN, T. M. A droplet digital PCR (ddPCR) assay to detect *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in bulk trap samples. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0178704, 2017.

# 3. A TALE OF TWO ASSAYS: HOW OPTIMIZATION CAN EQUALIZE THE SENSITIVITY OF REAL-TIME PCR WITH DDPCR FOR DETECTION OF *HELICOVERPA ARMIGERA* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) IN BULK SAMPLES

Thayssa M. R. Oliveira <sup>1#</sup>, Frida A. Zink <sup>2#</sup>, Renato C. Menezes <sup>1</sup>, Érico C. Dianese <sup>1</sup>, Karina C. Albernaz-Godinho <sup>1</sup>, Marcos G. Cunha <sup>1</sup>, Alicia E. Timm <sup>2</sup>, Todd M. Gilligan <sup>3,^</sup> and Luke R. Tembrock <sup>2,^</sup>

Capítulo elaborado conforme as normas do periódico científico Insects.

# Contribuíram igualmente

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO 74690-900, Brazil <sup>2</sup>Department of Agricultural Biology, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523 USA.

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup>USDA-APHIS-PPQ-Science & Technology, Identification Technology Program, Fort Collins, CO 80526 USA.

#### 3.1 INTRODUCTION

Corn earworm, Helicoverpa zea, is considered one of the most damaging insect pests in North America as it feeds on the harvested portion of several high value crops. The species is highly polyphagous and has been recorded feeding on more than 120 species of plants, including many economically important crops such as maize, sorghum, tomato, and cotton [1-4]. H. zea is restricted to the Western hemisphere and was the only major Helicoverpa pest species present in this region until 2013, when Old World bollworm, H. armigera, was recorded in Brazil [5,6]. H. armigera is considered native to Europe and Asia and is also present throughout Africa, Australia, and Oceania [1]. Larvae of this species have an even broader host range than those of *H. zea*, with over 180 species of plant host recorded, including many specialty crops [4]. This broad host range has allowed H. armigera to spread rapidly throughout much of South America and the Caribbean [7]. The first U.S. interception was recorded in Puerto Rico [8] raising concern that the species would soon be detected within the continental U.S. This concern was justified in 2015 when three individuals of H. armigera were recorded in Florida [9]. Subsequent surveys in this region have shown, however, that the species failed to become established. Nevertheless, it is likely that H. armigera will continue to increase its geographic range in the New World given that adults are highly mobile and capable of flying 20-40km in one day [10]. Human-mediated introductions from the movement of passengers and goods due to trade may also result in H. armigera increasing its geographic range [11,12] as the species is often intercepted at U.S. ports of entry [13]. Based on habitat and host suitability, H. armigera could become established in every state in the continental U.S. [14], where it would substantially threaten major host crops [15,16]. Preventing the species from increasing its geographic range and further establishing in the New World is of utmost importance.

The most important factor for initiating a rapid response to an incursion of *H*. *armigera* is prompt detection and ongoing screening. *H. armigera* and *H. zea* are nearly identical morphologically, which creates great difficulty for traditional identification methods. This similarity can result in *H. armigera* remaining cryptic in previously uncolonized regions due to being misidentified as *H. zea*, which is present throughout North and South America. Since morphological methods used to discriminate between the two species are time consuming, difficult, and generally must be carried out by trained specialists

performing genitalic dissections [1,17,18], molecular methods are increasingly used to distinguish between *H. zea* and *H. armigera*.

As the range of *H. armigera* expands across South America, the Caribbean, and likely into North America [6,12,15,19] it is essential to have multiple means of screening many individuals in a short period of time. Such screening efforts could provide useful data for targeted responses to the spread of *H. armigera* as well as providing detailed information in understanding the range expansion dynamics for economically important pests. The use of ddPCR (droplet digital PCR) to detect very small amounts of target DNA among large quantities of non-target DNA has been demonstrated in numerous applications [20-22] including the detection of *H. armigera* in bulk samples [23]. While the use of ddPCR is an attractive method for pest detection in bulk samples due to its accuracy, tolerance to enzymeinhibiting compounds, and method of direct standard-free quantification [24], it is costly and rarely used at the level of state, port of entry, or international pest detection labs. Conversely, the use of real-time PCR, because of the relatively low cost of machine ownership and operation, is frequently utilized for detection of pest species of many types [25-27]. Unfortunately, the real-time PCR-based methods for detecting H. armigera in bulk samples do not perform well in real-world sized samples which routinely include hundreds of specimens [28]. As such, an accurate DNA-based identification method that can be employed across several different detection platforms, namely ddPCR and real-time PCR, is needed in order to provide flexibility and compatibility across labs and instruments in screening bulk samples for detection and assessment of *H. armigera*.

Given the need for a more flexible and sensitive method to screen bulk samples, we optimized a newly designed assay for accurate and repeatable detection of *H. armigera* in bulk samples across real-time PCR and ddPCR methodologies. Improvements over previously designed assays were sought through changes to primer and probe design, DNA extraction method, and assay output interpretation. Effects of different treatments were measured through increases in assay sensitivity and compared within each assay, across assays, and to previously developed assays where applicable. The results from these tests suggest that real-time PCR assays can be vastly improved through changes to bulk DNA extraction and purification to the point where it can be used in large scale screening projects. The ddPCR assay still provides a more sensitive method for bulk detection of *H. armigera*, but the improvements in primer and probe design and DNA extraction and purification tested herein also improved assay performance.

#### 3.2 MATERIALS AND METHODS

#### 3.2.1 Origin and type of insect material

The DNA for this study was extracted from the legs of adult specimens of H. armigera and H. zea. H zea specimens were collected in the summer of 2016 in Colorado and Minnesota and the fall of 2019 in Florida. After collection, samples were stored dry in paper envelopes at 4 °C prior to use. All specimens were identified to genus visually and confirmed to be H. zea by ddPCR using the method outlined by Zink et al. [23]. Specimens of H. armigera were acquired from lab colonies at the USDA-APHIS Otis Laboratory, Cape Cod, Mass or from the Queensland, Australia laboratory colony. Additional H. armigera were collected from various locations throughout South Africa. After collection, H. armigera samples were preserved in 100 % ethanol in individual microcentrifuge tubes and stored at -80 °C until use.

#### **3.2.2** Single specimen DNA extraction

For the samples used in optimization steps, the DNA was extracted from two legs of individual specimens of *H. armigera* or *H. zea* using the Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, California) following manufacturer's instructions. DNA concentrations were determined using a Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham MA). The samples used for testing assay sensitivity were extracted using four legs of individual specimens of *H. armigera* using the Lucigen MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit (LGC Biosearch Technologies, Novato, CA) following manufacturer's instructions. DNA concentrations were determined using Qubit Fluorometer with the dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) following manufacturer's instructions. DNA was stored at -20 °C until use and then archived at -80 °C.

### 3.2.3 Bulk DNA extraction

To identify the best bulk DNA isolation method for species-specific real-time PCR detection, several modifications of squish buffer [29] were evaluated. The original squish buffer concentrations of 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl and pH 8.2 as well as the modified formulation of Perera et al. [28], wherein EDTA and NaCl concentrations were reduced by 50 %, were tested. In addition, EDTA and NaCl concentrations of 2x, 5x, and 10x the concentration of the original Gloor et al. [29] formulation were compared. In all tests Proteinase K was excluded which differs from the original description of squish buffer.

Samples were prepared by adding 1 leg of *H. armigera* to *H. zea* legs at different ratios along with several 2.3 mm zirconia/silica beads in 1.5 mL microcentrifuge tubes. The samples were pulverized for 2 min on high speed in a mini-beadbeater (Biospec Products, Bartlesville, OK). After grinding to a fine powder, 10  $\mu$ L/leg of squish buffer was added to the tube and it was incubated overnight at 80 °C (56 °C equivalent) and 500 rpm in a dry bath Thermomixer FP (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). After incubation, the samples were spun down at 2152, 8609 or 16873 x g, for 10 min to pellet debris in an Eppendorf 5418 table-top microcentrifuge (Eppendorf AG).

The final method, a modified squish buffer with 125 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 10 mM Tris-HCl with a centrifugation step at 8609 x g for ten minutes, was repeated for eight ratio extractions (*armigera*: *zea*) from 1:0 to 1:500.

A set of 59 samples containing one leg of *H. armigera* and 50 legs of *H. zea* were extracted using the best-performing modified squish buffer method. The *H. armigera* legs used were collected from disparate geographic locations as described above and were of varying quality and age to simulate DNA degradation that occurs in trap samples (Supplementary Table S3.1). Because the squish buffer DNA extractions lack the purification that takes place in a column extraction, a 100  $\mu$ L aliquot from each of these extractions was further purified using AMPure XP paramagnetic beads following manufacturer's instructions (Beckman Coulter, Danaher Corporation, Brea, CA).

### 3.2.4 Primer and probe design

A new set of primers and probes was designed in the same region as other successful molecular assays which had used a portion of ITS1 and the 5'-flanking 18S rDNA region to differentiate *H. armigera* from sister species *H. zea* and relatives [28,30]. Alignments of sequences from *H. armigera* and related species (*H. zea*, *H. assulta*, *Chloridea subflexa* and *C. virescens*), as well as intra-genome tandem rDNA repeats

between *H. zea* and *H. armigera* from whole genome alignments, were utilized to find consistent differences between samples.

Primers and probes were designed using Geneious 8.1.9 (https://www.geneious.com). The program Primer 3 v 2.3.7 was used to calculate Tm with the Santa Lucia (1998) method and Oligo-calc [31] was employed to test for self-annealing and hairpin formation. Any primers and probes that were found to have poor structural qualities (e.g., many self-annealing sites) were not tested or were repositioned over the variable sites to exclude predicted structural faults.

Primers and probes were synthesized by IDT (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). Initial real-time PCR experiments were performed with 2  $\mu$ L of DNA extracted from *H. armigera* only, *H. zea* only and a few ratio samples (1:10, 1:50 and 1:100) in a 20  $\mu$ L amplification reaction containing 500 nM of each forward and reverse primer, 200 nM probe, 2X iTaq Universal Probes Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) and water. After initial denaturation at 95 °C for 3 min, 40 cycles of amplification with a 15 s denaturation step at 95 °C and 1 min anneal and extension step at 60 °C were performed on a Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR system (Bio-Rad Laboratories Inc.). Once data was captured, the amplification of unique products was verified in CFX Manager ver. 3.1 (Bio-Rad Laboratories), and the best pair of primers was selected (Table 3.1).

Name	Description	Sequence	Tm	Source
			(°C)	
Harm_18S_1944F	Diagnostic	5'-AACGTAAACAATAATCCACACACCA	55.1	This study
Harm_18S_2154R	Diagnostic	5'-CGCGGATTTTTGTGTTTTGTGT	56.5	This study
Harm_18S_1969P	Diagnostic	5'-6-fam-CTAGAGGAC-ZEN-	56.4	This study
		ACAGAGTCGAACG-IowaBlackFQ		
RT-18S-F2	Control	5'-ACCGCCCTAGTTCTAACCGTAAA	57.8	Barr et al. 2011
RT-18S-R2	Control	5'-CCGCCGAGCCATTGTAGTAA	57.3	Barr et al. 2011
RT-18S-P2	Control	5'-Quasar670-	60.3	Barr et al. 2011
		TGTCATCTAGCGATCCGCCGA-BHQ-2		

Table 3.1: primers and probes used in this study

#### 3.2.5 Real-Time PCR

The optimal concentration of the primers and probe, and the optimal annealing temperature were determined with additional tests including varying the primer concentration from 125 nM to 875 nM and the probe concentration from 40 nM to 320 nM in each reaction and an annealing temperature gradient from 50 to 60 °C.

The optimized real-time PCR reaction used iTaq Universal Probes Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) with 500 nM of each primer and 160 nM probe, 2  $\mu$ L DNA of varying concentration and water to complete the dilution. In select assays, an 18S control probe and primer set were also used following the concentrations and reagents outlined in Barr et al. [32] (Table 3.1). Real-time PCR was done on a Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR system (Bio-Rad Laboratories Inc.). The following thermocycling protocol was used: 95 °C for 3 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 1 min at 56 °C, and data capture.

Data were visualized and analyzed in CFX Manager ver. 3.1 (Bio-Rad Laboratories). Baseline threshold was set to "auto calculated" for initial testing. However, in a limited number of negative control samples (*H. zea* only and NTC), the diagnostic probe exhibited background amplification with an end relative fluorescence unit (RFU) of less than 50.00. Based on this, the baseline threshold setting was changed to "user defined" and the cutoff value adjusted to '100.00' for all runs.

#### **3.2.6 Real-time PCR sensitivity analyses**

To determine the sensitivity of the assay, it was run using serial dilutions of purified *H. armigera* DNA carried out with a range of concentrations from  $40 \text{ ng/}\mu\text{L}$  to  $4x10^{-6} \text{ ng/}\mu\text{L}$ . The Cq results were adjusted by a logarithmic regression at each DNA dilution for the diagnostic and control probes according to the model:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 \log 10 (X_i) + e_i$$

Where:

 $y_i = Cq$  observed value referring to the i-th dilution

 $\beta_0 = intercept$ 

 $\beta_1 = \text{slope}$ 

 $X_i$  = the i-th dilution associated to the observed value  $y_i$ 

 $e_i$  = residual associated to the  $y_i$  observation

The analyses were carried out in R [33] using the nls2 package [34]. The plots were generated using the package ggplot2 [35].

#### 3.2.7 Real-time PCR comparative analyses

The statistical significance between the RFU amplification values of the purified and non-purified samples (use of bead purification factor levels) and the use or not of the 18S control probe (use of control factor levels) were evaluated by analysis of variance (ANOVA). Once the ANOVA assumptions were verified, the RFU value was modeled by the expression below:

$$y_{ijk} = \mu + w_k + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + e_{ijk}$$

Where:

 $y_{ijk} = RFU$  observed value referring to the k-th bulk sample of combination of the i-th level of use of 18S control factor with the j-th level of use of bead purification factor

 $\mu = intercept$ 

 $w_k$  = effect of k-th bulk samples in the observed value  $y_{ijk}$ 

 $\alpha_i$  = effect of i-th level of the use of control factor in the observed value  $y_{ijk}$ 

 $\beta_j$  = effect of j-th level of the use of bead purification factor in the observed value  $y_{ijk}$ 

 $\alpha\beta_{ij}$  = effect of the interaction of the i-th level of the use of control factor as the j-th level of the use of bead purification factor

 $e_{ijk}$  = residual associated with the  $y_{ijk}$  observation

The analyses were carried out in R [33]. The means were compared by Tukey test using the agricolae package [36] and the figures were generated using the package ggplot2 [35].

#### 3.2.8 ddPCR

Primer and probe sets were also tested using ddPCR following the protocols outlined in Zink et al. [23] for EvaGreen (Bio-Rad Laboratories Inc.) reactions and Zink et al. [21] for probe-based reactions using the QX200 Droplet Digital PCR System. The primer set was tested both with the probe and with EvaGreen intercalating dye (Table 3.1). The probe-based assay was carried out using 10  $\mu$ L 2x ddPCR Supermix for Probes (no dUTP), 500 nM of each primer, 200 nM probe, 2  $\mu$ L of DNA of varying concentrations and 5.6  $\mu$ L water to complete the dilution of the master mix. After droplet generation the following thermocycling protocol was used: 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 30 s,

56 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min, concluding with 98 °C for 10 min and an infinite hold at 4 °C. During thermal cycling for ddPCR the ramp rate between all steps is fixed at 2 °C/s.

The fully optimized EvaGreen assay was carried out using 10  $\mu$ L EvaGreen Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc.), 200 nM of each primer, 1-2  $\mu$ L of DNA of varying concentrations and 7-8  $\mu$ L of water to complete the dilution of the supermix. The following optimized thermocycling protocol was used for EvaGreen: 95 °C for 5 min followed by 40 cycles of 95 °C for 30 ss, 56 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min, concluding with 4°C for 5 min, 90°C for 5 min, and an infinite hold at 4°C.

After droplets were read, data was processed using 'definetherain' [37], and additional analyses were carried out in QuantaSoft ver. 1.7.4.0917 (Bio-Rad Laboratories). The false positive rate (FPR) and Limit of Detection (LoD) for the primers was determined for the EvaGreen-based assay only. Forty-four replicates of bulk extractions containing *H*. *zea* specimens only were run and the FPR and LoD were determined using look-up tables provided by Bio-Rad as modified from Armbruster and Pry [38].

### 3.3 RESULTS

#### 3.3.1 Real-Time PCR assay optimization

Increasing primer concentration generally resulted in an increase in Cq value. The end RFU values also increased with increasing primer concentration. A primer concentration of 500 nM was chosen for further testing because it optimized a low Cq and high end RFU (Table 3.2).

Primer conc. (nM)	Cq	End RFU
125	18.72	11752.66
250	18.70	22008.61
375	18.94	21939.63
500	18.96	24868.50
625	19.06	23687.81
750	18.89	25870.61
875	19.11	24776.83
0		3.32

Table 3.2: real-time PCR results from primer concentration gradient; probe at 200nM

A gradient of probe concentrations from 40 to 320 nM was also tested while keeping primers constant at 500 nM. The Cq value decreased with increasing probe concentration through 240 nM at which point decreases in Cq flattened off. The greatest increase in end RFU occurred between 120 nM and 160 nM. Therefore 160 nM was chosen as the optimal probe concentration (Table 3.3).

Probe conc. (nM)	Cq	End RFU
40	23.12	7809.71
80	22.02	14038.24
120	21.59	16992.24
160	21.3	21147.71
200	21.17	22859.44
240	21.13	24143.71
280	21.13	24657.33
320	21.13	24853.07
0		4.96

Table 3.3: real-time PCR results from probe concentration; primers at 500nM each

The annealing temperature for the primers and probe were optimized using a temperature gradient from 50-60 °C while keeping primer and probe concentrations at the empirically determined optima. The highest temperatures tested (between 56 °C and 60 °C) had the lowest Cq values and 56.3 °C was ultimately chosen as the ideal melting temperature because it had the highest end RFU in the gradient (Table 3.4). The temperature was simplified to 56 °C for use in the rest of the tests.

Annealing temp. (°C)	Cq	End RFU
60	21.96	18195.06
59.4	21.92	19047.54
58.3	21.94	19313.38
56.3	21.96	20336.74
53.9	22.03	20248.93
52	22.08	18829.02
50.7	22.07	18160.84
50	22.19	16570.87

Table 3.4: real-time PCR results from temperature gradient with primers at 500nM and probe at 160nM

# **3.3.2** Real-time PCR sensitivity as determined with high-quality template DNA from *H. armigera*

The standard curve for sensitivity was determined by plotting Cq values against a series of DNA template concentrations and showed an increase in Cq values as the template DNA concentrations decreased (Figure 3.1). Across the six samples used in generating the standard curve, the average Cq values ranged from 12.25 at 40 ng/ $\mu$ L to 39.10 at 4x10<sup>-6</sup> ng/ $\mu$ L for the diagnostic probe and 16.37 at 40 ng/ $\mu$ L to 40 at 4x10<sup>-6</sup> ng/ $\mu$ L for the 18S control probe. An R<sup>2</sup> value of over 0.98 was obtained for both probes indicating a highly linear response across the range of DNA concentrations.



Figure 3.1: (a) Amplification plot generated by serial dilution of *Helicoverpa armigera* template DNA for the ITS1 diagnostic probes; (b) Serial dilutions of template DNA for 6 *H. armigera* individuals with a standard curve based on response in Cq for the ITS1 diagnostic and 18S control probes run in duplex. The scale of axis x was transformed by log 10.

#### 3.3.3 Increased salt improves squish buffer bulk extractions

The DNA extraction was tested with three centrifugation speeds (2152, 8609, and 16873 x g), and the three following formulations of squish buffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA and 25 mM NaCl [29]; 10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA and 12.5 mM NaCl [28]; and 10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA and 50 mM NaCl. When the extractions were used for real-time PCR we observed that samples with 1 leg of *H. armigera* and 20 legs of *H. zea* (1:20) exhibited a lower Cq value when the highest-salt buffer was used (Table 3.5).

More EDTA and NaCl was added to test samples using buffers with 2x, 5x, and 10x the concentration originally described in Gloor et al. [29]. When this set of extractions was used for real-time PCR, the buffer with 10x NaCl concentration exhibited an increased Cq value when paired with the 2152 x g centrifugation speed but the Cq value was unchanged at the higher centrifugation speed of 16873 x g. The lowest Cq value was attained with 5x EDTA and NaCl (an intermediate concentration) and using an intermediate centrifugation speed of 8609 x g (Table 3.6).

<i>Helicoverpa</i> leg ratio	rcf (x g)	NaCl conc. (mM)	EDTA conc. (mM)	Cq
(H. armigera: H. zea)				
1:20	2152	12.5	0.5	23.33
1:20	16873	12.5	0.5	20.39
1:20	2152	25	1	21.96
1:20	16873	25	1	19.16
1:20	2152	50	2	18.92
1:20	16873	50	2	18.33

Table 3.5: real-time PCR results from squish buffer formulations and centrifugation speeds

Table 3.6: real-time PCR results from high salt formulations of squish buffer

Helicoverpa leg ratio	rcf (x g)	NaCl conc. (mM)	EDTA conc. (mM)	Cq
(H. armigera: H. zea)				
1:20	2152	50	2	19.00
1:20	16873	50	2	18.29
1:20	2152	250	10	20.58
1:20	16873	250	10	18.15
1:20	8609	100	5	17.16
1:60	8609	100	5	20.36

#### 3.3.4 Real-time PCR bulk sample results

With the more suitable buffer and centrifugation speed defined, the protocol was used to extract larger ratios of *H. zea* to *H. armigera*. Using the real-time PCR assay we were able to successfully detect *H. armigera* DNA when it was co-extracted with *H. zea* DNA in the same PCR at ratios (*H. armigera*: *H. zea*) from 1:20 legs to 1:500 legs. The Cq values were > 0 for all ratios with *H. armigera* DNA and had no Cq value for negative controls. The diagnostic probe returned Cq values of 26.14 for the ratio with the most *H. zea* legs and 17.15 for the ratio with the least *H. zea* legs, 1:20 (Table 3.7).

Table 3.7: real-time PCR results from varying ratios of *Helicoverpa armigera* legs: *H. zea* legs

Ratio	$rcf(\mathbf{x} \mathbf{g})$	NaCl conc. (mM)	EDTA conc. (mM)	Cq
1:20	8609	100	5	17.15
1:40	8609	100	5	20.05
1:60	8609	100	5	19.63
1:80	8609	100	5	19.15
1:100	8609	100	5	19.11
1:200	8609	100	5	19.61
1:500	8609	100	5	26.14
1:0	8609	100	5	18.44
0:1	8609	100	5	0
NTC	8609	100	5	0

# **3.3.5** Bead purification and simplex reactions improve sensitivity for real-time PCR using bulk samples

To test the repeatability of real-time PCR results for bulk samples and find the sample size limit, we ran 59 replicates of 1:50 ratios using a single leg from *H. armigera* of varying quality and preservation to simulate old or degraded trap samples (Table 3.8). Of the 59 replicates, 12 returned false negative results when using the modified squish buffer protocol for DNA extraction. Because the protocol does not include any purification steps, we hypothesized that this may be due the presence of PCR inhibitors. After the samples were purified using paramagnetic beads, the false negative rate was reduced to 2/59 and the end RFU for most samples increased but no pattern was observed regarding Cq value (Table 3.8). This improvement was statistically significant when samples were compared before

and after bead purification (p < 0.001). Given previous work [39-41] showing that multiplex PCR can reduce amplification efficiency of some primers we chose to test how inclusion or exclusion of the 18S control probe could affect identification of target DNA in bulk samples. Because there is competition for PCR reagents in the reaction, we ran the diagnostic and control probes independently for each sample. The unpurified samples had 6 false negative results while the bead purified samples had no false negatives for the diagnostic probe (Table 3.8). A significant (p < 0.001) difference in target identification was found between reactions that included an 18S control probe and those that did not. However, no significant interaction was observed between bead purification and primer duplexing (p = 0.7472) (Supplementary Table S3.2). In addition to differences in identification rates, primer duplexing and bead purification produced significantly different end RFU values (Figure 3.2).

	- Ctrl/ - BP		- Ctrl/+ BP		+ Ctrl/- BP		+ Ctrl/+ BP	
Sample	Cq	RFU	Cq	RFU	Cq	RFU	Cq	RFU
1	31.65	198.94	30.13	2291.84		11.58	30.11	402.18
2		17.11	31.32	573.64		14.32	35.72	116.86
3	27.58	1208.05	28.10	4182.44	30.20	242.66	27.36	1547.18
4		10.99	34.51	216.99		14.23	36.53	107.33
5	25.07	3302.44	25.69	7287.27	25.36	980.38	26.04	1531.11
6		8.74	35.72	127.97		20.37	32.15	263.40
7	22.18	8860.18	22.43	12029.25	21.59	1303.99	21.76	10240.34
8	28.67	221.20	26.02	5089.04		22.56	25.97	2504.50
9	20.53	14640.72	20.91	11983.67	20.18	8987.33	21.09	4915.74
10	20.60	12828.26	21.63	11260.27	21.32	8552.34	21.87	7851.89
11	20.69	6733.72	21.12	14552.49	20.78	5623.11	21.11	9787.14
12	26.21	2500.98	25.95	8619.49	25.51	1333.16	25.81	3735.53
13	26.69	7189.02	27.17	6005.49	25.14	591.95	27.02	5404.36
14	27.95	2879.51	26.02	9604.84	27.38	465.66	25.38	3628.56
15	19.83	12057.90	21.83	12285.58	20.30	9984.92	22.09	9215.15
16	20.50	14147.07	21.46	12672.84	20.44	7220.47	21.42	10179.95
17	19.45	10313.26	21.49	13419.63	20.47	6204.70	21.32	10309.40
18	19.73	10536.28	21.11	13353.52	20.62	9439.42	21.27	10526.17
19	21.17	14933.12	21.82	15438.62	18.63	4943.59	21.12	12605.58
20	19.28	14301.02	21.78	15255.25	19.73	8265.60	23.67	8443.85
21	19.60	7794.62	20.00	16928.45	18.93	9460.50	19.16	13813.90
22	19.18	9441.36	19.20	17116.53	18.64	3999.75	19.09	14047.80
23	21.21	10290.38	21.31	14504.58	21.43	11550.59	21.94	11009.13
24	29.23	229.14	27.10	6704.37	27.29	460.06	26.87	1772.06

Table 3.8: real-time PCR results of ratios (1 *Helicoverpa armigera* leg: 50 *H. zea* legs) with and without bead purification (BP) and presence of 18S control primers and probes (Ctrl)

	- Ct	trl/ - BP	- Ct	trl/+ BP	+ C	trl/- BP	+ C1	trl/+ BP
Sample	Cq	RFU	Cq	RFU	Cq	RFU	Cq	RFU
25	25.03	3004.36	25.06	10938.61	25.22	915.49	24.39	5906.28
26	21.25	9820.98	21.48	11949.11	21.28	5401.31	21.24	11309.96
27	20.37	11952.59	19.72	15220.42	20.37	9794.59	19.88	12599.93
28	22.27	12402.87	22.79	11506.99	22.06	4630.17	22.07	9768.89
29	23.47	10129.45	22.37	4684.52	23.39	3080.91	23.34	8869.53
30	21.65	9775.21	22.61	13290.02	21.55	7357.58	22.21	6413.43
31	25.66	2216.63	22.72	6769.11	25.47	765.97	23.04	5099.04
32	20.23	11324.96	20.26	16288.94	19.95	7612.89	20.16	11456.42
33	20.87	5143.82	19.55	16991.30		23.07	19.43	11137.10
34	20.25	13967.67	20.69	15999.46	20.90	11097.20	20.39	12280.23
35	22.06	11644.17	21.87	15842.31	21.53	3371.78	22.43	10471.81
36	28.31	3564.74	28.53	2762.28	28.75	267.93	28.41	1097.53
37	22.12	6009.29	21.95	15605.20	23.25	519.00	21.59	10985.13
38	19.33	14362.07	21.14	16877.70	21.63	346.42	20.31	12842.48
39	22.20	11286.24	22.13	14702.44	21.37	4716.22	21.38	10587.83
40	23.65	8505.87	24.17	10657.79	23.44	4196.02	23.69	8107.57
41	28.61	377.28	27.06	6554.71	33.05	140.50	26.21	2651.93
42	23.43	7592.74	23.35	12718.12		17.83	22.75	9158.52
43	22.34	4626.78	22.43	11485.15	28.37	252.15	22.42	9117.53
44	20.55	8772.13	20.12	17240.06	21.34	1286.78	20.51	11953.43
45	20.43	10108.94	19.98	12116.37	21.58	1636.07	20.40	10375.38
46	25.23	2868.87	24.40	11150.40	25.01	2595.12	24.80	3996.54
47	22.43	2316.19	22.52	7676.01	22.47	6662.04	23.15	6540.77
48		5.68	26.96	6957.75		10.08	27.34	508.59
49	22.12	5735.89	23.10	13885.75	21.76	4549.79	22.07	10361.06
50	30.12	185.46	27.07	4677.50	34.21	120.88	25.79	1623.45
51	29.38	1970.22	29.74	1305.81		37.49	29.96	977.40
52	26.19	7288.93	25.82	7727.24	25.63	2584.78	25.35	6046.17
53	26.95	4197.06	27.62	5171.64	27.50	298.00	27.43	864.95
54	24.32	9713.18	25.29	8753.72	24.69	2931.30	25.21	3978.88
55	22.44	11339.61	23.09	3627.23	22.84	3692.81	23.28	5743.53
56		6.94	32.23	362.75		6.86		84.44
57		15.72	31.32	544.89		9.25		88.04
58	39.24	90.50	31.40	582.00		8.51	34.41	141.23
							<b>aa</b> aa	



Figure 3.2: Response in real-time PCR end RFU values across 59 bulk samples with and without bead purification and with and without the use of internal 18S control probes by Tukey test at 5% of significance. The bar represents the minimum significant difference of the test.

#### 3.3.6 Interpretation rule set and RFU threshold setting for real-time PCR

Guidelines were developed for interpretation of the real-time PCR results for the assay described in this study. Based on sensitivity analysis, we experimentally determined  $4x10^{-5}$  ng/µL as the minimum DNA concentration detectable by this assay, since the lower concentration ( $4x10^{-6}$  ng/µL) failed to produce a detectable signal in four out of the six tested samples.

For the real-time PCR assay, the following rule set was developed: 1) the 18S control probe (Quasar 670) must have a Cq value > 0 and  $\leq$  40 to verify that sufficient DNA is present in the reaction; 2) the *H. armigera* ITS1 diagnostic probe (FAM) must have a Cq value > 0 and  $\leq$  40.

# **3.3.7** ddPCR bulk sample results and the relative performance of EvaGreen and hydrolysis probe detection

The ddPCR assay was first tested using the probe developed for the real-time PCR assay but some specimens exhibited an unusual cluster of droplets of an intermediate amplitude between the positive and negative clusters. This was first seen when testing a selection of ratios of *H. zea* to *H. armigera* to demonstrate the sensitivity of the assay in bulk samples (Figure 3.3A). Through adjusting the ddPCR mixture and protocol, we were able to minimize but not eliminate the presence of the aberrant cluster (Figure 3.3B) While the result does not preclude using a probe as the band was not visible in any negative samples and, with manipulation of the PCR protocol, can be minimized, we proceeded to optimize the ddPCR assay for use with EvaGreen intercalating dye chemistry instead. The EvaGreen assay is as sensitive and specific as the probe-based assay and does not exhibit any abnormal amplification in the samples that were problematic with the probe .Both with and without the probe the assay is able to detect the lower limit of  $4x10^{-5}$  ng/µL of target DNA in water (Figure 3.4) and can be used to detect *H. armigera* in the largest ratio tested, 1 *H. armigera*: 500 H. zea. The EvaGreen assay is not near failure at the 1:500 ratio and could likely detect a single *H. armigera* specimen in a far greater number of *H. zea*. The DNA was reduced to 1µL per reaction to avoid saturating the droplet reader with positive droplets when testing the ratios with high quality H. armigera. At 1:200 bulk samples using 1 µL of DNA per reaction, positive droplets still outnumbered negatives (Figure 3.5).

Due to the nature of trap screening and the damage that is often done to specimens in field conditions, we tested the assay with a subset of the 1:50 ratio samples used for real-time PCR (Table 3.8). Of the samples run on ddPCR, 11 of 13 came back as positive for *H. armigera* (Figure 3.6). The two samples that were negative were also negative by real-time PCR when using the recommended method for screening.



Figure 3.3: When the probe is used for ddPCR, an alternate cluster of droplets is evident for some samples. a) the cluster is prominent between the positive (blue) and negative (grey) droplets in lanes labeled 1 Ha: 80 Hz and 1 Ha: 100 Hz. b) the cluster is still evident after assay optimization and use of a touchdown thermocycling program. It is evident in the lanes labeled 0.4ng Ha1 and 0.04ng Ha1.

А

в



Figure 3.4: The ddPCR assay using EvaGreen is sensitive and able to detect *Helicoverpa* armigera DNA to  $4x10^{-5}$  ng/ reaction. Positive droplets are shown in blue, negative droplets are shown in grey.



Figure 3.5: The ddPCR assay using EvaGreen is specific to *Helicoverpa armigera* and is able to detect a single *H. armigera* leg in up to 500 *H. zea* legs. Positive droplets are shown in blue, negative droplets are shown in grey.



Figure 3.6: The ddPCR assay using EvaGreen can be used to detect *Helicoverpa armigera* DNA in ratios of 1 *H. armigera* leg: 50 *H. zea* legs when the quality of the *H. armigera* specimens is decreased with the same rate of false negatives as the real-time PCR assay using the hydrolysis probe. Positive droplets are shown in blue, negative droplets are shown in grey. The sample labels correspond to Table 3.8.

#### 3.4 DISCUSSION

The use of ddPCR and real-time PCR has become mainstream for detection of target DNA from a number of different sample types [42]. Because each of these methods has advantages over the other and require independent optimization we developed, optimized, and compared assays for each platform. As part of the development and testing steps the two methods were compared to help guide users as to which approach is most appropriate for their screening needs.

Given the reduced cost, ease of sample prep, wide availability, and the broad dynamic range associated with real-time PCR, we focused on improving the sensitivity of detection for bulk samples. Because ddPCR is generally more precise than real-time PCR when using complex and/or contaminated samples [43,44] our efforts were intended to

enhance the real-time assay such that the sensitivity was closer to that realized with ddPCR. By using an increased salt concentration for the bulk extraction, secondary bead purification, and separating control and diagnostic primers into separate reactions, a significant increase in precision was observed over running the assay without these steps (Figure 3.2) as well as over previous attempts to develop a real-time PCR assay for use with bulk samples [28]. This is most evident in the 59 replicates of 1 H. armigera: 50 H. zea which were run under different control and purification conditions. While we observed that running the diagnostic and control probes separately resulted in no false negative results, we realize that this is an idealized situation that would not be applicable to routine procedures. In a real-world trap screening event, running two separate assays to obtain diagnostic and control results is unrealistic as it uses twice the resources. Additionally, in a situation in which the diagnostic probe returned a negative result and the control probe returned a positive result, it would be impossible to know whether there was PCR occurring in the well with the diagnostic probe. Because of this, it would be more logical to, instead, split the trap sample into two smaller batches and run each with both probes. This would ensure that the concentration of H. armigera DNA is higher in any positive samples, increasing the likelihood of diagnosis and allow the control to work as intended. The two samples that returned false negative results for the real-time assay were the same two samples that returned false negative results for the ddPCR assay. This emphasizes the need to collect and safely store field samples promptly in order to preserve the DNA.

The design of primers and a probe for this assay was optimized for the greatest number of fixed nucleotide differences between *H. zea* and *H. armigera* to ensure specificity in bulk samples. The largest difference between *H. zea* and *H. armigera* ITS1 is a 30bp deletion in *H. armigera* (5' ACCACTATGCGCATGCATATATTGCATCGC). The forward primer was designed to span this deletion such that complete priming on *H. zea* by the for-ward primer was negated. The probe sequence immediately follows the forward primer and is designed to include two SNVs and an AA indel between the species. Like the probe, the reverse primer incorporates two SNVs and an AC indel separating the species.

In addition to high levels of lineage specific, mutational differences created from the rapid evolution in ITS sequences, increased sensitivity is also an advantageous feature of rDNA-based PCR assays due to the presence of high tandem copy numbers of rDNA in the genome [45]. Using a HiRise assembled genome not available at the time of assay design (Tembrock unpublished data) for *H. zea* x *H. armigera* 54 *H. armigera* ITS1 sites (108 in diploid somatic cells) and 105 *H. zea* ITS1 sites (210 in diploid somatic cells) from distinct rDNA repeats were identified. All 54 *H. armigera* ITS1 sites had 100% identity with each other and the primers and probe designed herein. In addition to the 54 distinct copies with exact matches for the primers and probe four ITS1 copies were found that contained SNVs or indels (one copy with an indel in the forward priming site, one copy with one indel in the forward, probe and reverse sequences, and two copies with one SNV each in the reverse sequence) in one or more of the priming sites. Because the birth and death cycle of rDNA is so rapid the difference in rDNA copies is generally limited [46,47]. That said given the large number of rDNA copies in a given genome it is common to find mutations between copies (ribotypes) at any given time especially in the non-functional ITS regions [48].

One of the most regularly cited problems associated with ddPCR assays is the production of aberrant droplets outside the expected range making analyses and detection calls more difficult [49]. Given this, our optimization steps were conducted to improve droplet separation and reduce rain and other out of range droplets. As with real-time PCR data, outputs (preferably sigmoidal curves in the case of real-time PCR and clearly separated droplets in the case of ddPCR) should always be visualized to ensure that positive calls are not being made from artifactual results [50.51]. Case in point, when the probe designed for real-time was used in the ddPCR assay we observed a tight and distinct cluster of positive droplets between the positive and negative droplet clusters. We tried many optimization steps to eliminate or reduce the presence of these droplets including varying primer and probe concentration, as well as the annealing temperature, number of cycles, ramp rate and implementing a touch-down style thermocycling program. While the amplitude of the cluster could be reduced it could not be eliminated entirely. The multi-peak distribution of droplets was found to be exclusive to the presence of the probe and may have been caused in part by incomplete or inefficient probe binding to ITS1 copies with a single nucleotide difference in the probe site [52]. When the *H. armigera* ITS1 copies are compared the differential in  $\Delta G$ (between perfect and next best matches) increases from -31.4 to -19.8 kcal/mol when the ITS1 copy with an indel in the probe binding site is considered. This suggests that increases in the frequency of minor ITS1 ribotypes may reduce the efficiency of probe binding and contribute to double banding. That said despite the double banding in some samples, sufficient separation was noted between the double bands and the negatives such that positive calls could still be made after inspecting droplet amplitude. Furthermore, the samples that exhibited this droplet pattern were from colony samples of H. armigera and may not be representative of genotypes found widely in nature. No matter the reason for the multi-peak distribution found in some samples using the probe, the unusual pattern was eliminated in the EvaGreen ddPCR assay. While it is likely that the off-target probe binding in the reaction is also present in the real-time PCR assay, the way in which the data is processed (a snapshot of all fluorescence in the reaction at each moment of data capture) make real-time assays less susceptible to these effects which are only evident due to the partitioning of DNA present in ddPCR. The advantages in specificity and sensitivity make rDNA loci superb diagnostic regions for species identification but if possible, all ribotypes within a genome should be compared to improve reaction efficiency by avoiding intragenomic polymorphisms in priming sites.

These two assays were designed to improve the availability of rapid, sensitive detection methods for *H. armigera*. Since most identifiers rely on real-time PCR or genitalic dissection of individual specimens, any capacity for bulking samples with a widely available technology like real-time PCR is an important advancement for phytosanitary safety. Even our recommendation of bulk samples of 40 specimens at a time for real-time will greatly improve throughput while maintaining a reasonable throughput for downstream identification. Currently, bulk samples are screened using the method described by Zink et al. [23] and if a bulk sample is determined to be positive for *H. armigera*, an individual leg is pulled from each specimen in the sample. DNA is then extracted from the legs and they are screened individually by real-time PCR following the guidelines from Gilligan et al. [30]. Positive samples are then COI barcoded and/or the specimen is dissected for official identification. While the assay described by Zink et al. [23] has the ability to detect a single H. armigera in 999 H. zea, in practice much smaller samples are typically screened. Many traps catch fewer specimens with only a few hundred samples in traps from the peak of the season. Furthermore, if a sample containing hundreds of specimens is determined to be positive for H. armigera, individually extracting DNA from single legs of each of those specimens and running them each on real-time PCR becomes increasingly time consuming. In practice it is more feasible to run fewer than 96 moths per sample so that any positive samples can be run on a single real-time PCR plate. The lower sample size also precludes false negatives due to poor DNA quality. Similarly, the smaller sample size recommended here for this real-time PCR assay ensures the most efficient use of lab time and resources.

#### 3.5 REFERENCES

- 1. Hardwick, D.F. The corn earworm complex. *The Memoirs of the Entomological Society of Canada* **1965**, *97*(S40), 5-247.
- Kogan, M.; Helm, C.G.; Kogan J.; Brewer, E. Distribution and economic importance of *Heliothis virescens* and *Heliothis zea* in North, Central and South America and of their natural enemies and host plants, **1989**, 241-298. In King, E.G. and Jackson, R.D. (eds.), *Proceedings of the Workshop on Biological Control of* Heliothis: *Increasing the Effectiveness of Natural Enemies*. Far Eastern Regional Research Services, Office of International Cooperation and Development, US Department of Agriculture, New Delhi, India.
- 3. Blanco, C.A.; Teran-Vargas, A.P.; Lopez Jr., J.D.; Kauffman, J.V.; Wei, X.K. Densities of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in three plant hosts. *Fla. Entomol.* **2007**, *90*, 742-750.
- 4. Cunningham, J.P.; Zalucki, M.P. Understanding heliothine (Lepidoptera: Heliothinae) pests: what is a host plant? *Journal of Economic Entomology* **2014**, *107*, 881-896.
- Czepak, C.; Albernaz, K.C.; Vivan, L.M.; Guimarães, H.O.; Carvalhais, T. First reported occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 2013, 43, 110-113.
- 6. Tay, W.T.; Soria, M.F.; Walsh,T.; Thomazoni, D.; Silvie, P.; Behere, G.T.; Anderson, C.; Downes, S. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *PLoS One* **2013**, *8*, e80134.
- 7. Jones, C.M.; Parry, H.; Tay, W.T.; Reynolds, D.R.; Chapman, J.W. Movement ecology of pest *Helicoverpa*: implications for ongoing spread. *Annual Review of Entomology* **2019**, *64*, 277-295
- 8. Smith, E. Detection of old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Puerto Rico. North American Plant Protection Organization, *Phytosanitary Alert System Bulletin* **2014**.
- Hayden, J.; Brambila, J. *Pest alert:* Helicoverpa armigera (*Lepidoptera: Noctuidae*), the Old World bollworm. Florida Department of Agriculture and Consumer Services.
  2015 Jun 17. Available: http://www.freshfromflorida.com/Divisions-Offices/Plant-Industry/Plant-Industry-Publications/Pest-Alerts/Pest-Alert-The-Old-World-Bollworm.
- Jones, C.M.; Papanicolaou, A.; Mironidis, G.K.; Vontas, J.; Yang, Y.; Lim, K.S.; Oakeshott, J.G.; Bass, C.; Chapman, J.W. Genomewide transcriptional signatures of migratory flight activity in a globally invasive insect pest. *Molecular Ecology* 2015, 24, 4901-4911.

- 11. Tay, W.T.; Walsh, T.K.; Downes, S.; Anderson, C.; Jermiin, L.S.; Wong, T.K.; Piper, M.C.; Silva Chang, E.; Barony Macedo, I.; Czepak, C.; Behere, G.T.; Silvie, P.; Soria, M.F.; Frayssinet, M.; Gordon, K.H.J. Mitochondrial DNA and trade data support multiple origins of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae) in Brazil. *Scientific Reports* 2017, 7, 45302.
- Tembrock, L.R.; Timm, A.E.; Zink, F.A.; Gilligan, T.M. Phylogeography of the Recent Expansion of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in South America and the Caribbean Basin, *Annals of the Entomological Society of America* 2019, *112*, 388–401.
- Gilligan, T.M.; Goldstein, P.Z.; Timm, A.E.; Farris, R.; Ledezma, L.; Cunningham, A.P. Identification of heliothine (Lepidoptera: Noctuidae) larvae intercepted at US ports of entry from the New World. *Journal of Economic Entomology* 2019, *112*, 603-615.
- 14. Fowler, G.; Lakin, K. *Risk Assessment: The Old Bollworm*, Helicoverpa armigera (*Hubner*) (*Lepidoptera: Noctuidae*). USDA-APHIS, Center for Plant Health Science and Technology (Internal Report), Raleigh, NC, **2001**, 1-19.
- 15. Kriticos, D.J.; Ota, N.; Hutchison, W.D.; Beddow, J.; Walsh, T.; Tay, W.T.; Borchert, D.M.; Paula-Moreas, S.V.; Czepak, C.; Zalucki, M.P. The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in North America: is it just a matter of time?. *PLoS One* **2015**, *10*, e0119618.
- 16. Haile, F.; Nowatzki, T.; Storer, N. Overview of Pest Status, Potential Risk, and Management Considerations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) for U.S. Soybean Production, *Journal of Integrated Pest Management* **2021**, *12*.
- 17. Pogue, M.G. A new synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiation of adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner)(Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae). *Annals of the Entomological Society of America* **2004**, *97*, 1222-1226.
- Brambila, J. Instruction for dissecting male genitalia of Helicoverpa (Lepidotera: Noctuidae) to separate H. zea from H. armigera. 2009. 16p. Available: https://www.aphis.usda.gov/plant\_health/plan\_pest\_info/owb/download/owbscreen ingaids2.pedf.
- 19. Anderson, C.J.; Oakeshott, J.G.; Tay, W.T.; Gordon, K.H.J.; Zwick, A.; Walsh, T.K. Hybridization and gene flow in the mega-pest lineage of moth, *Helicoverpa. Proc. Natl. Acad. Sci.* **2018**, *115*, 5034–5039.
- Li, H.; Bai, R.; Zhao, Z.; Tao, L.; Ma, M.; Ji, Z.; Jian, M.; Ding, Z.; Dai, X.; Bao, F.;Liu, A. Application of droplet digital PCR to detect the pathogens of infectious diseases. *Bioscience reports* 2018, 38, BSR20181170. https://doi.org/10.1042/BSR20181170
- Zink, F.A.; Tembrock, L.R.; Timm, A.E.; Gilligan, T.M. A ddPCR assay for identification of *Autographa gamma* (Noctuidae: Plusiinae) in bulk trap samples. *J. Econ. Entomol* 2018, 111, 1490-1495. doi:10.1093/jee/toy052.

- Capo, E.; Spong, G.; Koizumi, S.; Puts, I.; Olajas, F.; Königsson, H.; Karlsson, J.; By-ström, P. Droplet digital PCR applied to environmental DNA, a promising method to estimate fish population abundance from humic-rich aquatic ecosystems. *Environmental DNA* 2020, 00, 1–10. https://doi.org/10.1002/edn3.115
- 23. Zink, F.A.; Tembrock, L.R.; Timm, A.E.; Farris, R.E.; Perera, O.P.; Gilligan, T.M. A droplet digital PCR (ddPCR) assay to detect *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in bulk trap samples. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0178704. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178704
- 24. Baker, M. Digital PCR hits its stride. *Nat Methods* **2012**, *9*, 541–544. https://doi.org/10.1038/nmeth.2027
- 25. Solà, M.; Lundgren, J.G.; Agustí, N.; Riudavets, J. Detection and quantification of the insect pest *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) in rice by qPCR, *Journal of Stored Products Research* **2017**, *71*, 106-111.
- 26. Tembrock, L.R.; Farris, R.E.; Ledezma, L.; Barr, N.B.; Gilligan, T.M. A Real-Time PCR Assay for the Separation of *Autographa gamma* (Noctuidae: Plusiinae) From Morphologically Similar Species in North America. *Journal of economic entomology* 2017, *110*, 2609–2617. https://doi.org/10.1093/jee/tox256
- Capron, A.; Stewart, D.; Hrywkiw, K.; Allen, K.; Feau, N.; Bilodeau, G.; Tanguay, P.; Cusson, M.; Hamelin, R.C. In Situ Processing and Efficient Environmental Detection (iSPEED) of tree pests and pathogens using point-of-use real-time PCR. *PloS ONE* 2020, *15*, e0226863.
- 28. Perera, O.P.; Allen, K.C.; Jain, D.; Purcell, M.; Little, N.S.; Luttrell, R.G. Rapid identification of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) using ribosomal RNA internal transcribed spacer 1. *Journal of insect science* 2015, 15, 155. https://doi.org/10.1093/jisesa/iev137
- Gloor, G.B.; Preston, C.R.; Johnson-Schlitz, D.M.; Nassif, N.A.; Phillis, R.W.; Benz, W.K.; Robertson, H.M.; Engels, W.R. Type I repressors of P element mobility. *Genetics* 1993, 135, 81–95.
- 30. Gilligan, T.M.; Tembrock, L.R.; Farris, R.E.; Barr, N.B.; van der Straten, M.J.; van de Vossenberg, B.T.L.H.; et al. A Multiplex Real-Time PCR Assay to Diagnose and Separate *Helicoverpa armigera* and *H. zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in the New World. *PLoS ONE* 2015, *10*, e0142912.
- 31. Kibbe W.A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* **2007**, *35*.
- 32. Barr, N.B.; Ledezma, L.A.; Farris, R.E.; Epstein, M.E.; Gilligan, T.M. A multiplex real-time polymerase chain reaction assay to diagnose *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of economic entomology* **2011**, *104*, 1706-1719.
- 33. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. **2020**. URL: https://www.R-project.org/.
- 34. Grothendieck, G. *nls2: Non-linear regression with brute force*. R package version 0.2. **2013**. https://CRAN.R-project.org/package=nls2
- 35. Wickham, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag 2016.
- 36. Mendiburu, F. *agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.3-3. **2020**. https://CRAN.R-project.org/package=agricolae
- 37. Jones, M.; Williams, J.; Gärtner, K.; Phillips, R.; Hurst, J.; Frater, J. Low copy target detection by Droplet Digital PCR through application of a novel open access bioinformatics pipeline, 'definetherain'. *J Virol Methods* 2014, 202, 46-53. doi: 10.1016/j.jviromet.2014.02.020.
- 38. Armbruster D.A.; Pry, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin. Biochem. Rev* **2008**, *29*, S49-S52.
- 39. Walsh, P.S.;Erlich, H.A.; Higuchi, R. Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms and solutions. *PCR Methods Appl* **1992**, *1*, 241–250.
- 40. Elnifro, E.M.; Ashshi, A.M.; Cooper, R.J.; Klapper, P.E. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical microbiology reviews* 2020, *13*, 559–570. https://doi.org/10.1128/cmr.13.4.559-570.2000
- 41. Sint, D.; Raso, L.; Traugott, M. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in ecology and evolution* **2012**, *3*, 898–905. https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00215.x.
- 42. Quan, P.L.; Sauzade, M.; Brouzes, E. dPCR: A Technology Review. *Sensors* **2018**, *18*, 1271. https://doi.org/10.3390/s18041271.
- 43. Taylor, S.C., Laperriere, G.; Germain, H. Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2409. https://doi.org/10.1038/s41598-017-02217-x.
- 44. Mahendran, P.; Liew, J.W.K.; Amir, A.; et al. Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR) for the detection of *Plasmodium knowlesi* and *Plasmodium vivax*. *Malar J* **2020**, *19*, 241.
- 45. Prokopowich, C.D.; Gregory, T.R.; Crease, T.J. The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome* **2003**, *46*, 48–50.
- 46. Nei, M.; Rooney, A.P. Concerted and birth-and-death evolution of multigene families. *Annu Rev Genet* 2005, *39*, 121–152.
- 47. Freire, R.; Arias, A.; Ínsua. A.M.; Méndez, J.; Eirín-López, J.M. Evolutionary dynamics of the 5S rDNA gene family in the mussel *Mytilus*: mixed effects of birth-and-death and concerted evolution. *J Mol Evol* **2010**, *70*, 413–426.
- 48. Teruel, M.; Ruíz-Ruano, F.J.; Marchal, J.A.; Sánchez, A.; Cabrero, J.; Camacho, J.P.; Perfectti, F. Disparate molecular evolution of two types of repetitive DNAs in the genome of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* **2014**, *112*, 531–542.

- 49. Huggett J.F. The Digital MIQE Guidelines Update: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments for 2020. *Clin. Chem.* **2020**, *66*, 1012-1029. doi: 10.1093/clinchem/hvaa125. PMID: 32746458.
- Bustin S.A.; Benes V.; Garson J.A.; Hellemans J.; Huggett J.; Kubista M.; Mueller R.; Nolan T.; Pfaffl M.W.; Shipley G.L.; Vandesompele J.; Wittwer C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009. 55, 611-622.
- 51. Huggett, J.F.; Foy, C.A.; Benes, V.; Emslie, K.; Garson, J.A.; Haynes, R.; Hellemans, J.; Kubista, M.; Mueller, R.D.; Nolan, T.; Pfaffl, M.W.; Shipley, G.L.; Vandesompele, J.; Wittwer, C.T.; Bustin, S.A. The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments. *Clinical chemistry* **2013**, *59*, 892–902.
- 52. Booth, C.S.; Pienaar, E.; Termaat, J.R.; Whitney, S.E.; Louw, T.M.; Viljoen, H.J. Efficiency of the Polymerase Chain Reaction. *Chemical engineering science* **2010**, *65*, 4996–5006. https://doi.org/10.1016/j.ces.2010.05.046

## 3.6 SUPPLEMENTARY MATERIALS

Sample	Internal ID	<i>H. armigera</i> origin	Year	<i>H. zea</i> origin	Year
1	693/23	Queensland, Aus	2015	Mayo, FL, USA	2019
2	693/4	Queensland, Aus	2015	Mayo, FL, USA	2019
3	670/3	Queensland, Aus	2015	Mayo, FL, USA	2019
4	670/45	Queensland, Aus	2015	Mayo, FL, USA	2019
5	673/3	Queensland, Aus	2015	Mayo, FL, USA	2019
6	673/5	Queensland, Aus	2015	Mayo, FL, USA	2019
7	695/3	Queensland, Aus	2015	Mayo, FL, USA	2019
8	695/5	Queensland, Aus	2015	Mayo, FL, USA	2019
9	5826/2	Puerto Rico lab colony	2016	Mayo, FL, USA	2019
10	5826/4	Puerto Rico lab colony	2016	Mayo, FL, USA	2019
11	5827/2	Puerto Rico lab colony	2016	Mayo, FL, USA	2019
12	5827/4	Puerto Rico lab colony	2016	Mayo, FL, USA	2019
13	5818/1	Puerto Rico lab colony	2016	Mayo, FL, USA	2019
14	5819/12	Puerto Rico lab colony	2016	Mayo, FL, USA	2019
15	6531/2	Franschhoek, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
16	6531/4	Franschhoek, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
17	6532/2	Franschhoek, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
18	6532/4	Franschhoek, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
19	6590/3	Franschhoek, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
20	6591/3	Franschhoek, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
21	6592/3	Franschhoek, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019

Supplementary Table S3.1: 1:50 ratio replicate IDs

Sample	Internal ID	H. armigera origin	Year	H. zea origin	Year
22	6593/3	Franschhoek, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
23	6595/3	Franschhoek, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
24	7073/1	Mbombela, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
25	7073/34	Mbombela, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
26	6611/1	Paarl, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
27	6611/4	Paarl, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
28	6612/12	Paarl, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
29	6612/4	Paarl, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
30	6529/2	Philippi, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
31	6529/4	Philippi, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
32	6530/2	Philippi, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
33	6530/4	Philippi, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
34	6750/34	Philippi, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
35	6751/4	Philippi, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
36	6752/4	Philippi, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
37	6753/45	Philippi, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
38	6754/5	Philippi, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
39	6146/2	Otis lab colony	2017	Mayo, FL, USA	2019
40	6147/2	Otis lab colony	2017	Mayo, FL, USA	2019
41	6148/2	Otis lab colony	2017	Mayo, FL, USA	2019
42	6149/23	Otis lab colony	2017	Mayo, FL, USA	2019
43	7064/1	Zululand, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
44	7064/4	Zululand, S.A.	2017	Mayo, FL, USA	2019
45	7170/3	Paarl, S.A.	2019	Mayo, FL, USA	2019
46	7107/5	Paarl, S.A.	2019	Mayo, FL, USA	2019
47	7103/8	Paarl, S.A.	2019	Mayo, FL, USA	2019
48	7108/5	Paarl, S.A.	2019	Mayo, FL, USA	2019
49	7101/5	Paarl, S.A.	2019	Mayo, FL, USA	2019
50	7102/5	Paarl, S.A.	2019	Mayo, FL, USA	2019
51	636/1	Queensland, Aus	2019	Mayo, FL, USA	2019
52	638/1	Queensland, Aus	2019	Mayo, FL, USA	2019
53	639/1	Queensland, Aus	2019	Mayo, FL, USA	2019
54	7086/1	Simondium, S. A.	2019	Mayo, FL, USA	2019
55	7086/3	Simondium, S. A.	2019	Mayo, FL, USA	2019
56	7099/5	Simondium, S. A.	2019	Mayo, FL, USA	2019
57	7100/5	Simondium, S. A.	2019	Mayo, FL, USA	2019
58	7081/1	Wellington, S.A.	2019	Mayo, FL, USA	2019
59	7081/3	Wellington, S.A.	2019	Mayo, FL, USA	2019

Variation source	df	Sum square	Mean square	F	р
Bulk sample	58	3952285666	68142856	13.018	<2e <sup>-16</sup> ***
Use of 18S control (C)	1	546435572	546435572	104.39	<2e <sup>-16</sup> ***
Use of bead purification (P)	1	561294724	561294724	107.23	<2e <sup>-16</sup> ***
C x P	1	545735	545735	0.1043	0.7472
Residuals	171	895103428	5234523		

Supplementary Table S3.2: Analysis of variance

\*\*\* significant at p < 0.1 by the F test



Supplementary Figure S3.1: False positive rate and limit of detection were determined for the ddPCR assay using EvaGreen by running DNA extractions from 50 *Helicoverpa zea* legs. Positive droplets are shown in blue, negative droplets are shown in grey.

## 4. CONCLUSÃO

Ao longo do experimento foram desenvolvidos e otimizados protocolos para a identificação de *Helicoverpa armigera* por meio de PCR em tempo real e PCR digital. A necessidade de encontrar novas metodologias de identificação do espécime é a premissa de onde partiu essa pesquisa, com o objetivo de garantir o adequado manejo de pragas, e consequentemente, a atualização das tecnologias já existentes.

De fato, pesquisas anteriores já comprovaram a necessidade de novos protocolos de controle, já que o uso inadequado de inseticidas, em especial nos casos em que há maiores quantidades de aplicações e/ou dosagens, favorece o aumento da resistência ao produto nas lagartas. Além disso, de 2008 a 2013, período em que se estima o início da praga no Brasil até sua primeira identificação, observou-se a ineficácia das estratégias de controle até então utilizadas contra a *H. armigera*.

Observa-se que a elaboração e aplicação do presente protocolo funcional, a partir do desenho de uma sonda e um par de primers identificadores, amplifica de forma eficaz e específica o DNA de *H. armigera*. Garante-se, assim, a contribuição no processo de tomada de decisão em relação às estratégias de manejo, ao ofertar uma nova possibilidade de identificação da praga, independentemente do cultivo utilizado.