Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Suscetibilidade a deltametrina e variabilidade molecular em populações de
Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) coletadas nas culturas do
algodão e milho no Brasil**

Samuel Martinelli

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Entomologia**

Piracicaba

2006

Samuel Martinelli
Engenheiro Agrônomo

Suscetibilidade a deltametrina e variabilidade molecular em populações de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) coletadas nas culturas do algodão e milho no Brasil

Orientador:
Prof. Dr. CELSO OMOTO

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Martinelli, Samuel

Suscetibilidade a deltametrina e variabilidade molecular em populações de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) coletadas nas culturas do algodão e milho no Brasil / Samuel Martinelli. - - Piracicaba, 2006.
111 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Algodão 2. Genética de população 3. Inseticida – Resistência 4. Marcador molecular 6. Milho I. Título

CDD 633.51

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Aos meus pais Milton Martinelli (*in memoriam*) e
Maria Eliza Figueiredo de Lima Martinelli
OFEREÇO

Ao meu irmão Daniel Martinelli e
à minha cunhada Aline Cristina Bassoli Martinelli
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso Omoto por todas as oportunidades concedidas, pelo conhecimento transmitido, pelo apoio, incentivo e orientação para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Márcio de Castro Silva-Filho pelas oportunidades, apoio e incentivo para realização de uma etapa deste trabalho no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da USP/ESALQ.

Ao Prof. Dr. John E. Foster pela orientação e apoio na realização de parte deste trabalho na Universidade do Nebraska, Lincoln, EUA por meio do Programa de Doutorado com Estágio no Exterior (PDÉE) da Capes.

À Dra. Maria Imaculada Zucchi pelo auxílio e apoio na condução dos trabalhos com marcadores moleculares.

Ao Dr. Reinaldo Montrazi Barata pelo suporte e auxílio nas fases iniciais de condução deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ/USP pelo conhecimento transmitido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do auxílio pesquisa para a execução deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de Programa de Doutorado com Estágio no Exterior (PDÉE).

Ao Comitê Brasileiro de Ação a Resistência a Inseticidas (IRAC-BR) pela preciosa colaboração na coleta de populações da praga no campo.

Aos estagiários do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas no período de 2002 a 2005 pela ajuda na manutenção e criação dos insetos.

Aos amigos Cláudio Roberto Franco, Carla Fernanda Prezotto, Eloisa Salmeron, Everaldo Batista Alves, Felipe Antonio Domingues, Fernando Joly Campos, Gislaine O. Campos, Juliano Bortoletto Schmidt, Kátia Cristina Canale, Kátia Fernanda Souza, Marcelo Catani Antunes, Marcelo Poletti, Marco D. Molina Risco, Marina Pacheco Lombardi, Nádia F. Bertan Casarin, Roberto H. Konno pelo agradável convívio nos últimos anos.

Às bibliotecárias Eliana M. Garcia e Sílvia M. Zinsly da ESALQ/USP pelo auxílio na formatação das referências bibliográficas.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
Referências.....	17
2 SUSCETIBILIDADE A DELTAMETRINA EM POPULAÇÕES DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) COLETADAS NAS CULTURAS DO ALGODÃO E MILHO.....	23
Resumo.....	23
Abstract.....	24
2.1 Introdução.....	25
2.2 Desenvolvimento.....	28
2.2.1 Material e Métodos.....	28
2.2.1.1 Coleta das populações de <i>Spodoptera frugiperda</i> no campo.....	28
2.2.1.2 Criação de <i>Spodoptera frugiperda</i> em condições de laboratório.....	30
2.2.1.2.1 Criação para manutenção das populações.....	30
2.2.1.2.2 Criação para os bioensaios.....	30
2.2.1.3 Procedimento do bioensaio de aplicação tópica.....	31
2.2.1.4 Caracterização da suscetibilidade a deltametrina de populações de <i>Spodoptera frugiperda</i>	31
2.2.1.5 Isolamento e caracterização da resistência a deltametrina de <i>Spodoptera frugiperda</i>	32
2.2.1.6 Monitoramento da suscetibilidade a deltametrina de populações de <i>Spodoptera frugiperda</i>	33
2.3 Resultados e Discussão.....	34
2.3.1 Caracterização da suscetibilidade a deltametrina de populações de <i>Spodoptera frugiperda</i>	34
2.3.2 Isolamento e caracterização da resistência a deltametrina de <i>Spodoptera frugiperda</i>	39

2.3.3 Monitoramento da suscetibilidade a deltametrina de populações <i>Spodoptera frugiperda</i>	43
2.4 Conclusões.....	51
Referências.....	51
3 VARIABILIDADE MOLECULAR AVALIADA POR MEIO DE MARCADORES RAPD EM POPULAÇÕES DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) COLETADAS NAS CULTURAS DO ALGODÃO E MILHO NO BRASIL.....	56
Resumo.....	56
Abstract.....	56
3.1 Introdução.....	57
3.2 Desenvolvimento.....	59
3.2.1 Material e Métodos.....	59
3.2.1.1 Coleta das populações de <i>Spodoptera frugiperda</i>	59
3.2.1.2 Extração e quantificação do DNA genômico.....	59
3.2.1.3 Procedimentos para RAPD.....	62
3.2.1.4 Análise estatística dos marcadores RAPD.....	62
3.3 Resultados e Discussão.....	63
3.3.1 Seleção dos oligonucleotídeos iniciadores.....	63
3.3.2 Similaridade genética das populações de <i>Spodoptera frugiperda</i>	64
3.4 Conclusões.....	75
Referências.....	75
4 ESTRUTURA GENÉTICA E VARIABILIDADE MOLECULAR EM POPULAÇÕES DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) DO BRASIL AVALIADAS ATRAVÉS DE MARCADORES AFLP.....	81
Resumo.....	81
Abstract.....	81
4.1 Introdução.....	82
4.2 Desenvolvimento.....	84
4.2.1 Material e Métodos.....	84

4.2.1.1 Coleta das populações de <i>Spodoptera frugiperda</i>	84
4.2.1.2 Extração e quantificação do DNA genômico.....	86
4.2.1.3 Método AFLP para análise das populações de <i>Spodoptera frugiperda</i>	87
4.2.1.3.1 Preparo das amostras através da digestão e ligação dos adaptadores.....	87
4.2.1.3.2 Pré-amplificação das amostras de <i>Spodoptera frugiperda</i>	89
4.2.1.3.3 Amplificação seletiva das amostras de <i>Spodoptera frugiperda</i>	89
4.2.1.3.4 Eletroforese dos fragmentos AFLP.....	90
4.2.1.3.5 Coleta e análise estatística dos resultados AFLP.....	92
4.3 Resultados e Discussão.....	93
4.3.1 Seleção dos oligonucleotídeos para AFLP.....	93
4.3.2 Estrutura genética de <i>Spodoptera frugiperda</i> através de marcadores AFLP.....	93
4.4 Conclusões.....	105
Referências.....	105

RESUMO

Suscetibilidade a deltametrina e variabilidade molecular em populações de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) coletadas nas culturas do algodão e milho no Brasil

Com a crescente expansão de cultivos agrícolas no Brasil, tem sido bastante comum o sistema de produção de algodão e milho em uma mesma região. Como uma possível consequência deste sistema de cultivo, os problemas com *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) têm aumentado nestas duas culturas nos últimos anos. Assim, para o estabelecimento de um manejo mais efetivo desta praga, foi levantada a hipótese de que as mesmas populações de *S. frugiperda* atacam as culturas do algodão e milho em uma determinada região. Para testar esta hipótese, foram realizados os seguintes estudos: 1) a avaliação a suscetibilidade ao piretróide deltametrina em populações de *S. frugiperda*, e 2) a estimativa da similaridade e da estrutura genética em populações de *S. frugiperda* com o uso de marcadores moleculares RAPD e AFLP. A avaliação da suscetibilidade a deltametrina das populações de *S. frugiperda* foi realizada mediante bioensaio de aplicação tópica. Além disso, foi avaliada a resposta à seleção com deltametrina em uma população de *S. frugiperda* em condições de laboratório. As populações de *S. frugiperda* coletadas na cultura do algodão foram significativamente menos suscetíveis a deltametrina do que as populações coletadas no milho. Estes resultados poderiam ser entendidos como uma consequência da pré-seleção de indivíduos resistentes a deltametrina. A população de *S. frugiperda* selecionada em laboratório apresentou uma razão de resistência a deltametrina de ≈ 14 vezes. Pela técnica de RAPD, os dendrogramas (Simple Matching e Jaccard) classificaram as populações da praga em grupos proximamente relacionados com a região geográfica de coleta dos insetos. Não foi identificado nenhum ramo capaz de separar e associar as populações de *S. frugiperda* a nenhuma das duas plantas hospedeiras avaliadas. Estes resultados sugeriram que as populações da praga em algodão e milho em uma determinada região do Brasil apresentam um nível significativo de fluxo gênico. Os resultados da técnica AFLP foram organizados em um dendrograma UPGMA (índice de Jaccard), o qual também não classificou as populações da praga em grupos relacionados às plantas nas quais os insetos foram coletados. Não foi detectada correlação significativa entre a dissimilaridade genética e distância geográfica nas populações testadas. Foi detectada variação molecular entre as populações da praga atribuída à origem geográfica dos insetos. A análise molecular de variância indicou que 7% da variação molecular total poderiam ser atribuídos à divisão das populações de *S. frugiperda* em grupos de insetos coletados no Brasil e na Argentina. Além disso, foi detectado 0% de variação genética, e um valor de fluxo gênico $Nm=1,32$ entre os grupos de populações da praga coletadas nas culturas do algodão e do milho. Assim, as infestações de *S. frugiperda* que ocorrem em campos de milho e algodão podem ser consideradas como subunidades potencialmente intercruzantes de uma mesma população. Portanto, conclui-se que há necessidade de um planejamento bastante estratégico nos plantios de algodão e de milho, no delineamento de programas de manejo de *S. frugiperda* no Brasil.

Palavras-chaves: Resistência a inseticidas, marcadores moleculares, estrutura genética, fluxo gênico

ABSTRACT

Susceptibility to deltamethrin and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations collected at the cotton and maize crops in Brasil

Due to the expansion of the cultivated areas in Brazil, it has been very common to find the cultivation of cotton and maize in the same region. As a potential consequence to this cultivation system, the problems with *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) have increased for the last years at both crops. In order to provide elements to the establishment of a more effective management of this pest it was hypothesized that the same populations of *S. frugiperda* attack the cotton and maize crops in Brazil. To test this hypothesis the following studies were conducted: 1) the evaluation the susceptibility to the pyrethroid deltamethrin in *S. frugiperda* populations and 2) the assessment of the molecular variability and genetic structure in *S. frugiperda* populations by using RAPD and AFLP molecular markers. The evaluation of the susceptibility to deltamethrin in *S. frugiperda* populations was conducted by using topical application bioassays. Furthermore, the response of this pest to the selection pressure with the insecticide was evaluated under laboratory conditions. The insect populations collected in the cotton crop were significantly less susceptible to deltamethrin than the ones collected in the maize crop. These results might be consequence of a pre-selection of deltamethrin-resistant individuals. The deltamethrin-resistant population selected under laboratory conditions had the resistance ratio of ≈ 14 fold. The dendrograms obtained by using RAPD markers (Simple Matching and Jaccard) classified the populations into clusters related to the geographical origin of the samples. Any branch of the dendrograms underpinned a molecular association of *S. frugiperda* with neither of the two host plants. These results suggested the existence of considerable gene flow between cotton and maize populations of *S. frugiperda* collected at the same region in Brazil. The AFLP results were organized in a UPGMA dendrogram (Jaccard index) which also did not classify the populations of *S. frugiperda* into clusters related to the host plant in which the insects were collected. It was not found a significant correlation between genetic dissimilarity and geographical distances. It was detected genetic variation attributable to the geographical origin of the populations. The analysis of molecular variance highlighted 7% of the variation due to the division of the *S. frugiperda* populations into Brazilian and Argentine groups. Also, no molecular variation (0%) and a gene flow rate equal to $Nm=1.32$ were estimated between fall armyworm group of populations collected at maize and cotton fields in Brazil. The same populations of *S. frugiperda* infest cotton and maize crops in Brazil and could be considered as interbreeding subunits of the same population. Therefore, there is a need of strategic action plans to the planting of cotton and maize crops for designing of management programs of *S. frugiperda* in Brazil.

Keywords: Insecticide resistance, molecular markers, genetic structure and gene flow

1 INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira é considerada mundialmente como uma das mais eficientes na produção de alimentos e, o principal setor da economia sendo responsável por 34% do PIB nacional. O dinamismo e a competitividade deste setor têm sido proporcionados, em parte, pela existência de recursos naturais em abundância, tais como água doce, terras agricultáveis e clima diversificado presente ao longo do território brasileiro. No entanto, é inegável que os avanços científicos e as novas tecnologias como, por exemplo, o uso de sementes com elevado potencial de produtividade, fertilizantes, defensivos agrícolas, e as técnicas de irrigação e mecanização agrícola têm sido fatores fundamentais para a intensificação da atividade agrícola em vários países do mundo, resultando, na maioria das vezes, na especialização dos processos de produção (BLAXTER; ROBERTSON, 1995; MATSON et al., 1997).

No Brasil, a intensificação da agricultura pode ser notada, por exemplo, na expansão das áreas com cultivo de algodão e milho em diferentes regiões e ao longo do ano agrícola. O algodão tem sido cultivado em diversas regiões do Brasil com ganhos significativos de produtividade, porém o estado do Mato Grosso destaca-se como o principal produtor da fibra, seguido pelo estado da Bahia (FNP, 2005). No entanto, as regiões cotonícolas também se caracterizam quanto à sua vegetação agrícola pelos plantios comerciais de soja, milho e o próprio algodão também numa época de “safrinha”. A safra de milho tem sido dividida em duas épocas de plantio denominadas de 1^a e 2^a safras. Estas safras em conjunto têm grande importância na composição do total nacional de grãos de milho produzido. É previsto que na safra 2005/2006, a chamada 2^a safra de milho, ou “safrinha”, irá responder por 27% da produção total nacional de milho estimada em 41,3 milhões de toneladas (CONAB, 2006). Este tipo de padrão na exploração das culturas do algodão e do milho tem sido sustentado pela viabilidade técnica e pela rentabilidade econômica associada à geração de um número maior de safras por ano agrícola. Entretanto, os impactos proporcionados por esta composição vegetal na paisagem agrícola sobre a dinâmica de insetos pragas podem ser avaliados com base dos recentes aumentos na magnitude dos problemas fitossanitários registrados nas culturas do algodão e milho.

Diante da relação entre a intensificação da agricultura e o potencial para o agravamento dos problemas provocados por insetos-praga, uma das espécies que provavelmente teve sua dinâmica populacional afetada pelos plantios de algodão e milho dentro de uma mesma região

agrícola brasileira foi *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). Este inseto ocorre em quase todo o continente americano como sério problema fitossanitário, e tem provocado prejuízos econômicos a uma série de culturas de importância econômica (CRUZ, 1995; YU; NGUYEN; ABO-ELGHAR, 2003). *S. frugiperda* encontra-se amplamente distribuída e difundida nas Américas do Sul e Central, todavia esta espécie não apresenta o mecanismo de diapausa e, portanto, não é capaz de sobreviver continuamente em regiões de clima temperado. Consequentemente, nos Estados Unidos da América, *S. frugiperda* é uma praga esporádica que ocorre principalmente na cultura do algodão (LUTTRELL; MINK, 1990), e que possui sua distribuição limitada às regiões de temperaturas mais elevadas, tais como, os estados da Flórida, Louisiana, Alabama, Mississippi e Texas.

Com relação ao seu hábito alimentar, *S. frugiperda* é uma espécie polífaga. As lagartas desta praga alimentam-se de uma série de plantas cultivadas. No Brasil, além das culturas do algodão e do milho já foram relatados prejuízos consideráveis provocados pelo ataque deste inseto em plantas de arroz (BOTTON et al., 1998; PEREIRA; CALAFIORI, 1989), amendoim (ISIDRO; DE ALMEIRA; PEREIRA, 1997), soja (MOSCARDI; KASTELIC, 1985), sorgo (CORTEZ; WAQUIL, 1997) e trigo (TAKAHASHI; NAKANO; ORSI, 1980). De acordo com Georgiou e Taylor (1986), a característica de polifagia poderia colaborar para retardamento da evolução da resistência a inseticidas devido à imigração de indivíduos suscetíveis provenientes de áreas ocupadas com o cultivo de outras culturas e não tratadas com defensivos agrícolas.

A espécie *S. frugiperda* apresenta hábito migratório e sua dispersão pode ocorrer com facilidade entre as diferentes plantas hospedeiras e as localidades geográficas. Todavia, Pashley; Johnson e Sparks (1985) mostraram através da técnica de eletroforese de isoenzimas a existência de duas raças de *S. frugiperda* associadas a diferentes plantas hospedeiras. Uma destas raças alimenta-se predominantemente em milho e algodão (raça C) e a outra em arroz e gramíneas de pastagens (raça R). Entretanto, esta especificidade para a planta hospedeira não é absoluta (McMICHEL; PROWELL, 1999; PASHLEY, 1986; PASHLEY; MARTIN, 1987; PASHLEY, HAMMOND; HARDY, 1992). As raças de *S. frugiperda* são morfologicamente idênticas, mas há diferenças fisiológicas particulares a cada um destes grupos de inseto com relação às taxas de desenvolvimento e ao peso de lagartas e pupas (PASHLEY, 1988; WHITFORD; QUISENBERRY; MOELLENBECK, 1992). Os indivíduos da raça R de *S. frugiperda* apresentam uma variação maior nos seus índices de desenvolvimento conforme o tipo de planta

em que os insetos se alimentaram, provavelmente em função da característica herdada nesta raça de uma menor atividade de oxidases quando comparada com a raça C (VEENSTRA; PASHLEY; OTTEA, 1995). Por fim, há evidências da existência de parâmetros comportamentais específicos para cada uma das raças de *S. frugiperda* quanto à preferência por uma determinada planta hospedeira para a oviposição e na busca de parceiros para o acasalamento (WHITFORD et al., 1988; PASHLEY, HAMMOND; HARDY, 1992). Muito embora as raças C e R de *S. frugiperda* serem morfologicamente idênticas, estes insetos diferem em marcadores moleculares diagnósticos como variação em isoenzimas (PASHLEY; JOHNSON; SPARKS, 1985) e polimorfismos em DNA nuclear e mitocondrial (LU et al., 1992; LU; ADANG, 1996), em parte já detectados pela técnica de AFLP (McMICHEL; PROWELL, 1999). Entretanto, existem dois marcadores moleculares específicos para a separação das raças de *S. frugiperda*. Um desses marcadores é a ausência do sítio de restrição *Msp*I no gene mitocondrial da citocromo oxidase subunidade I nos indivíduos da raça R (LEVY; GARCIA-MARUNIAK; MARUNIAK, 2002; LU; ADANG, 1996). O outro marcador específico trata-se de uma sequência repetida de DNA chamada de *FR* a qual está presente em uma maior frequência nas fêmeas da raça R (LU et al., 1994; NAGOSHI; MEAGHER, 2003ab).

S. frugiperda é considerada a principal praga dos campos de milho no Brasil (CRUZ, 1995), mas nos últimos anos este inseto tem se destacado como importante problema de fitossanidade na cultura do algodão principalmente nas regiões produtoras dos cerrados. Na cultura do algodão as injúrias causadas por *S. frugiperda* podem ser diagnosticadas desde a emergência até a fase de maturação. As lagartas recém-eclodidas desta praga raspam o parênquima foliar, enquanto as lagartas pequenas e médias, por sua vez, geralmente raspam a epiderme das brácteas dos botões florais, flores e maçãs antes de perfurarem estas estruturas reprodutivas. Deste modo, *S. frugiperda* pode causar sérios prejuízos à produção em decorrência dos danos causados às maçãs do algodão (DEGRANDE, 1998).

Em função das características de seus ataques e da severidade das infestações de *S. frugiperda* nas diferentes culturas, o controle desta praga é praticamente baseado na utilização de inseticidas químicos. Desta maneira, as diferentes populações de *S. frugiperda* têm sofrido constantes pressões de seleção por inseticidas nos diferentes sistemas agrícolas, o que possivelmente tem contribuído e acarretado o estabelecimento de populações resistentes a diversas classes de inseticidas (DIEZ-RODRIGUEZ; OMOTO, 2001; YU, 1991, 1992, 2006).

Como consequências do estabelecimento da resistência têm-se, por exemplo, aplicações mais frequentes de inseticidas, o aumento da dose do produto utilizado, e por fim a substituição do produto que apresentou falhas no controle das pragas por um outro inseticida, geralmente mais tóxico ou mais caro (GEORGHIOU, 1983). Portanto, a resistência e suas consequências comprometem diretamente os princípios do Manejo Integrado de Pragas (MIP), devido à maior contaminação do meio ambiente por defensivos agrícolas, à destruição de inimigos naturais, e à elevação dos custos para o controle de pragas. (CROFT, 1990; GEORGHIOU, 1983). Dentre os fatores que afetam a evolução da resistência, os conhecimentos da estrutura genética e do fluxo gênico entre populações da praga têm sido reconhecidos como informações de grande importância para o MIP. O entendimento da estrutura genética e do nível intra-específico de fluxo gênico entre populações de uma praga é essencial para o delineamento de práticas de manejo com o objetivo de se retardar a evolução da resistência a qualquer tática de controle de insetos (CAPRIO; TABASHNIK, 1992; TABASHNIK, 1991).

A estrutura genética descreve a maneira como as populações se organizam e, se dividem em unidades de acasalamento menores e finitas (ROUSH; DALY, 1990). Em outros termos, a estrutura genética também pode ser descrita como a distribuição da variação genética no espaço. Esta distribuição é por sua vez o resultado de eventos como a migração, seleção, mutação, deriva genética, padrões de seleção de parceiros para o acasalamento e o fluxo gênico (RODERICK 1996; McKENZIE, 1996). O fluxo gênico decorrente do movimento de indivíduos entre as diferentes populações de uma espécie de inseto também desempenha um papel fundamental neste processo. Desta maneira, dependendo da taxa de dispersão e do genótipo do indivíduo imigrante, pode ocorrer o aumento na frequência dos alelos de resistência ou a diluição destes alelos em uma população de inseto. Esta relação foi observada por Daly (1993) na resistência a inseticidas de populações de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) em campos de algodão da Austrália. Neste trabalho, a frequência de resistência a inseticidas do grupo dos piretróides em populações desta praga declinou anualmente, em parte devido à imigração de indivíduos suscetíveis para as populações do inseto que haviam recebido aplicações de inseticidas.

Na última década, os impactos causados pela ocupação do ambiente têm se tornado um tópico bastante explorado em ecologia (MAY, 1994; RICKLEFS; SCHLUTER, 1993). Neste período, foram recolhidas evidências científicas de que a ocorrência das espécies, a densidade e a

dinâmica de populações, as interações tróficas e a estrutura de comunidades podem ser altamente dependentes de processos que ocorrem não apenas em escala local, mas também em âmbito regional (GERRING; CRIST; VEECH, 2003; KAREIVA; WENNERGREN, 1995). Para o entendimento destes processos é necessário considerar o tamanho, o arranjo espacial, a conectividade e a qualidade dos habitats situados nos diferentes contextos ecológicos (TSCHARNTKE; BRANDL, 2004). A intensificação e a especialização dos processos de produção agrícola geralmente implicam na redução, ao longo do tempo, da diversidade de espécies vegetais que ocupam uma determinada área (BENTON; VICKERY; WILSON, 2003; TSCHARNTKE; BRANDL, 2004).

A diversidade de plantas nos sistemas agrícolas possui implicações biológicas que se estendem muito além da produção propriamente dita. Conforme já mencionado, a diversidade de plantas em um sistema agrícola influencia a dinâmica sobre o complexo de pragas (BENTON; VICKERY; WILSON, 2003; MATSON et al., 1997). Isto porque a redução na riqueza de espécies vegetais, que é invariavelmente promovida pela intensificação agrícola, conduz a alterações na composição da comunidade de insetos herbívoros e seus inimigos naturais (ANDOW, 1991). No entanto, a diversidade vegetal em um sistema agrícola pode ser avaliada não apenas através da diversidade de espécies vegetais propriamente dita, mas também por meio da análise do arranjo espacial ou ainda da sobreposição temporal existente entre espécies que compõem os diferentes agrossistemas. Em particular, a sobreposição temporal de culturas pode variar desde a sua ausência, como em rotações de cultura, passando por um nível intermediário, e culminando com a sobreposição temporal completa. Este último caso representa a grau máximo de complexidade ecológica num sistema agrícola (ANDOW, 1991).

Os agrossistemas são tidos como ambientes heterogêneos e fragmentados, formados por mosaicos de culturas e, por exemplo, por plantas hospedeiras selvagens (BUREL; BAUDRY, 2005). Neste caso, é possível que diferenças decorrentes da heterogeneidade em parâmetros ambientais e demográficos existentes entre subpopulações que ocupam diferentes porções de uma paisagem originem um arranjo espacial que corresponda aos diferentes padrões demográficos existentes entre as subpopulações (DEY; DABHOLKAR; JOSHI, 2006). A estrutura demográfica envolve processos que influenciam o número e a distribuição de classes fenotípicas de indivíduos. Estes processos incluem as taxas de natalidade e mortalidade, de emigração e imigração, e que podem ser estudados através de métodos diretos que não incluam

necessariamente o conhecimento da genética das populações. Todavia, a demografia de uma população influencia diretamente processos envolvidos na definição da estrutura genética.

Diversos trabalhos abordam a associação de *S. frugiperda* a plantas hospedeiras, mas a literatura científica não apresenta uma opinião consensual sobre o tema. Por exemplo, Luttrell e Mink (1999) trazem a informação de que os insetos da raça milho (Raça C) apresentam a preferência para colonizarem as plantas de algodão nos Estados Unidos. Adamczyk et al. (1997) discutem falta de uma caracterização completa e plena da identidade das populações ou ainda raças que atacam a cultura do algodão nos Estados Unidos. Estas questões se tornam ainda mais importantes diante da possibilidade de uma área agrícola de fornecer adultos de *S. frugiperda* para uma outra cultura através de mecanismos de dispersão e colonização conforme discutido por Hall et al. (2005).

Apesar da importância de *S. frugiperda* no manejo de pragas na agricultura brasileira, até o momento não existem informações sobre os impactos dos cultivos de algodão e milho em uma mesma região agrícola sobre a organização da variabilidade genética de *S. frugiperda*. Estes impactos são esperados porque boa parte dos trabalhos disponíveis na literatura classifica as populações de *S. frugiperda* que correm em algodão e milho como pertencentes à mesma raça da praga, e o movimento e acasalamento das populações presentes nestas culturas podem influenciar diretamente a organização da variabilidade da espécie em uma determinada região. O movimento e acasalamento entre as diferentes populações de *S. frugiperda* que infestam as diversas culturas são influenciados de sobremaneira pela conectividade existente entre os diferentes componentes dos sistemas agrícolas.

No Brasil, as áreas com o cultivo de milho e algodão em uma mesma região agrícola podem funcionar como porções da paisagem agrícola disponíveis para ataque de *S. frugiperda*, devido à dinâmica na própria mudança da composição da paisagem agrícola ao longo do tempo. Estas alterações podem originar descontinuidades de habitats com reflexos sobre a distribuição da variação genética e fluxo gênico entre grupos de populações de insetos. Sendo assim, o objetivo geral desta tese foi avaliar a hipótese de que as mesmas populações de *S. frugiperda* atacam as culturas do algodão e milho no Brasil com reflexos sobre a organização da variabilidade genética em populações da praga. Para testar esta hipótese foram executados os seguintes objetivos específicos:

- Caracterização e comparação da suscetibilidade ao inseticida deltametrina em populações de *S. frugiperda* coletadas nas culturas do algodão e milho;
- Estimativa da similaridade genética entre populações de *S. frugiperda* coletadas em algodão e milho com o uso de marcadores moleculares RAPD;
- Análise da estrutura genética e fluxo gênico entre populações de *S. frugiperda* com o uso de marcadores moleculares AFLP.

Referências

ADAMCZYK, J.J.JUNIOR.; HOLLOWAY, J.W.; LEONARD, B.R.; GRAVES, J.B. Susceptibility of fall armyworm collected from different plant host to selected insecticides and transgenic Bt cotton. **The Journal of Cotton Science**, Memphis, v.1, p.21-28, 1997.

ANDOW, D.A. Vegetational diversity and arthropod population response. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 36, p. 561-586, 1991.

BENTON, T.G.; VICKERY, J.A.; WILSON, J.D. Farmland biodiversity: is habitat heterogeneity the key? **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 18, p. 182-188, 2003.

BLAXTER, K.; ROBERTSON, N. **From dearth to plenty**: the second agricultural revolution, Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 314p.

BOTTON, M.; CARBONARI, J.J.; GARCIA, M.S.; MARTINS, J.F. Preferência alimentar de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em arroz e capim-arroz. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, Jaboticabal, v.27, p.207-212, 1998.

BUREL, F.; BAUDRY, J. Habitat quality and connectivity in agricultural landscapes: the role of land use systems at various scales in time. **Ecological Indicators**, London, v. 5, p. 305-313, 2005.

CAPRIO, M.A.; TABASHNIK, B.E. Gene flow accelerates local adaptation among finite populations: simulating the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, p. 611-620, 1992.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. CONAB. Disponível em <http://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 09 jan. 2006.

CORTEZ, M.G.R.; WAQUIL, J.M. Influência de cultivar e nível de infestação de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no rendimento do sorgo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 26, p. 407-410, 1997.

CROFT, B.A. Developing a philosophy and program of pesticide resistance management. In: ROUSH, R.T; TABASHNIK, B.E. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**. New York: Chapman and Hall, 1990. p. 277-296.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1995. 45p.

DALY, J.C. Ecology and genetics of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera*: interactions between selection and gene flow. **Genetica**, Dordrecht, v. 90, p. 217-226, 1993.

DEGRANDE, P.E. **Guia prático de controle das pragas do algodoeiro**. Dourados: UFM, 1998. 60p.

DEY, S.; DABHOLKAR, S.; JOSHI, A. The effect of migration on metapopulation stability is qualitatively unaffected by demographic and spatial heterogeneity. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 238, p. 78-84, 2006.

DIEZ-RODRIGUEZ, G.I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 311-316, 2001.

FNP CONSULTORIA E COMÉRCIO. **Agrianual 2006**: Anuário da agricultura brasileira, São Paulo, 2005. 504p.

GEORGHIOU, G.P. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIOU, G.P.; SAITO, T. (Ed.). **Pest resistance to pesticides**. New York: Plenum, 1983. p. 769-792.

GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Factors influencing the evolution of resistance. In: NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. (Ed.). **Pesticide resistance: strategies and tactics for management**. Washington: National Academic Press, 1986. cap.3, p.157-169.

GERING, J.C.; CRIST, T.O.; VEECH, J.A. Additive portioning of species diversity across multiple spatial scales: implications for regional conservation of biodiversity. **Conservation Biology**, Boston, v. 17, p. 488-499, 2003.

HALL, D.G.; MEAGHER, R.; NAGOSHI, R.; IREY, M. Monitoring adult populations of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, (Lepidoptera: Noctuidae), in Florida sugarcane using pheromone traps, with special reference to genetics strains of this pest. **Proceedings of International Society of Sugarcane Technologists**, Quatre-Bornes, v. 25, p. 784-787, 2005.

ISIDRO, R.; DE ALMEIRA, R.P.; PEREIRA, J.O.V. Consumo foliar de *Spodoptera frugiperda* em amendoim cultivares Tatu e CNPA BR-1. **Revista de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 1, p. 37-42, 1997.

KAREIVA, P.; WENNERGREN, U. Connecting landscape patterns to ecosystems and population processes. **Nature**, London, v. 373, p. 299-302, 1995.

LEVY, H.C.; GARCIA-MARUNIAK, A.; MARUNIAK, J.E. Strain identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) insects and cell line: PCR-RFLP of cytochrome oxidase c subunit I gene. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, p. 186-190, 2002.

LU, Y.J.; ADANG, M.J. Distinguishing fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) strain using a diagnostic mitochondrial DNA marker. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 79, p. 186-190, 1996.

LU, Y.J.; ADANG, M.J.; EISENHOUR, D.J.; KOCHERT, G.D. Restriction fragment length polymorphism analysis of genetic variation in North American populations of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 1, p. 199-208, 1992.

LU, Y.J.; KOCHERT, G.D.; EISENHOUR, D.J.; ADANG, M.J. Molecular characterization of a strain-specific repeated DNA sequence in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 3, p. 123-130, 1994.

LUTTRELL, R.G.; MINK, J.S. Damage to cotton fruiting structures by the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **The Journal of Cotton Science**, Memphis, v. 3, p. 35-44, 1997.

MATSON, P.A.; PARTON, W.J.; POWER, A.J.; SWIFT, M.J. Agricultural intensification and ecosystem properties. **Science**, Washington, v. 277, p. 504-508, 1997.

MAY, R.M. The effects of spatial scale on ecological questions and answers. In: Edwards, P.J.; May, R.M., Webb, N.R. (Ed.). **Large-scale ecology and conservation biology**. Oxford: Blackwell Science, 1994. p. 1-17.

McKENZIE, J.A. **Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance**. New York: Academic Press, 1996. 185p.

McMICHAEL, M.; PROWELL, D.P. Differences in amplified fragment-length polymorphisms in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 92, p. 175-181, 1999.

NAGOSHI, R.N.; MEAGHER, R. Fall armyworm *FR* sequences map to sex chromosomes and their distribution in the wild indicate limitation in the interstrain mating. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v. 12, p. 453-458, 2003a.

NAGOSHI, R.N.; MEAGHER, R. *FR* tandem-repeat sequence in (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. **Annals of Entomological Society of American**, Columbus, v. 96, p. 329-335, 2003b.

MOSCARDI, F.; KASTELIC, J.G. Ocorrência de vírus de poliedrose nuclear e vírus de granulose em populações de *Spodoptera frugiperda* atacando soja na região de Sertaneja, PR. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Soja. **Resultados de pesquisa de soja 1984/85**. Londrina, 1985. p.128. (EMBRAPA CNPSo. Documentos, 15).

PASHLEY, D.P. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex? **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 79, p. 898-904, 1986.

PASHLEY, D.P. Quantitative genetics, development, and physiological adaptation in host strains of the fall armyworm. **Evolution**, Lancaster, v. 42, p. 93-102, 1988.

PASHLEY, D.P.; MARTIN, J.A. Reproductive incompatibility between host strains of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 80, p. 731-733, 1987.

PASHLEY, D.P.; HAMMOND, A.M.; HARDY, T.N. Reproductive isolating mechanisms in the fall armyworm host strains (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 85, p. 400-405, 1992.

PASHLEY, D.P.; JOHNSON, S.J.; SPARKS, A.N. Genetic population structure of migratory moths: the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 78, p. 756-762, 1985.

PEREIRA, M.C.C.F.; CALAFIORI, M.H. Prejuízos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) na cultura do arroz (*Oryza sativa* L.). **Ecossistema**, Espírito Santo do Pinhal, v. 14, p. 193-196, 1989.

RICKLEFS, R.E.; SCHLUTER, D. **Species diversity in ecological communities**: historical and geographical perspectives. Chicago: University Chicago Press, 1993. 416p.

RODERICK, K. R. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 41, p. 325-352, 1996.

ROUSH, R.T.; DALY, J.C. The role of population genetics in resistance research and management, p. 97-152. IN: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.R. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**. New York: Chapman and Hall, 1990. p. 97-152.

TABASHNIK, B.E. Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with backcross experiments. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 38, p. 325-326, 1991.

TAKAHASHI, M.K.; NAKANO, O.; ORSI, J.R. Avaliação de danos causados por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera-Noctuidae) em cultura de trigo. **Solo**, Piracicaba, v. 72, p. 43-44, 1980.

TSCHARNTKE, T.; BRANDL, R. Plant-insect interactions in fragmented landscapes. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 49, p. 405-430, 2004.

VEENSTRA, K.H.; PASHLEY, D.P.; OTTEA, J.A. Host plant adaptation in fall armyworm host strains: comparison of food consumption, utilization and detoxication enzyme activities. **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 88, p. 80-91, 1995.

WHITFORD, F; QUISENBERRY, S.S.; MOELENBECK, D.J. Nutritional response by rice and corn fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) strains to dietary component substitution in artificial diets. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, p. 1491-1496, 1992.

WHITFORD, F; QUISENBERRY, S.S.; RILEY, T.J.; LEE, J.W. Oviposition preference, mating compatibility, and development of two fall armyworm strains. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 71, p. 234-243, 1988.

YU, S.J. Insecticide resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 39, p. 94-91, 1991.

YU, S.J. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, p. 675-682, 1992.

YU, S.J. Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 84, p. 135-142, 2006.

YU, S.J.; NGUYEN, S.N.; ABO-ELGHAR, G.E. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 77, p. 1-11, 2003.

2 SUSCETIBILIDADE A DELTAMETRINA EM POPULAÇÕES DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) COLETADAS NAS CULTURAS DO ALGODÃO E MILHO

Resumo

Suscetibilidade a deltametrina em populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) coletadas nas culturas do algodão e milho

O objetivo deste trabalho foi comparar a suscetibilidade a deltametrina entre populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) coletadas nas culturas do algodão e milho de diferentes regiões no Brasil. Inicialmente foi determinada a linha básica de suscetibilidade para deltametrina, e posteriormente realizada a comparação da suscetibilidade a este piretróide em populações da praga mediante a estimativa de curvas de dose-mortalidade e monitoramento por meio de doses diagnósticas da sobrevivência de lagartas. Além disso, foi avaliada resposta à seleção de uma população de *S. frugiperda* a deltametrina em condições de laboratório. As populações de *S. frugiperda* utilizadas neste trabalho foram coletadas em diferentes regiões agrícolas no Brasil durante três safras agrícolas (2001/2002 a 2003/2004). Os bioensaios foram realizados com a aplicação tópica do inseticida técnico deltametrina sobre lagartas de terceiro ínstar. A partir dos dados de linha básica de suscetibilidade foram escolhidas duas concentrações diagnósticas para o monitoramento da suscetibilidade das populações a deltametrina, equivalentes às DL₉₅ e DL₉₇ da população suscetível. Foram verificadas diferenças significativas na suscetibilidade a deltametrina entre as populações de *S. frugiperda* coletadas em diferentes regiões e culturas. Os resultados indicaram que, independentemente da cultura hospedeira, os insetos coletados na região da Bahia foram menos suscetíveis à deltametrina do que os demais nas três safras agrícolas avaliadas. A sobrevivência a deltametrina variou na região da Bahia entre 16 e 39% dependendo da safra. Essas diferenças foram discutidas em termos das condições de manejo das culturas e características ecológicas predominantes naquela região. Não obstante, os insetos coletados na cultura do algodão foram significativamente menos suscetíveis à deltametrina do que as populações de *S. frugiperda* coletadas no milho em todas as três safras avaliadas. Este resultado foi possivelmente devido ao reflexo do processo de seleção de indivíduos resistentes em outras culturas como, por exemplo, na do milho. Neste sentido, a cultura do milho provavelmente funcionou com uma cultura de concentração e seleção de indivíduos resistentes, que posteriormente colonizaram os campos de algodão em uma determinada região. A população de *S. frugiperda* selecionada em laboratório apresentou uma razão de resistência de ≈ 14 vezes a deltametrina. Este resultado mostrou o potencial de seleção de populações resistentes a deltametrina no campo, e reiterou a funcionalidade das doses diagnósticas utilizadas no monitoramento da suscetibilidade da praga. Portanto, a eficiência dos programas de manejo da resistência a inseticidas em *S. frugiperda* depende da criteriosa avaliação dos sistemas e, certamente da intensidade dos diferentes cultivos de plantas hospedeiras da praga ao longo do ano agrícola em uma determinada região.

Palavras-chave: Resistência a inseticidas, monitoramento, piretróide, plantas hospedeiras

Abstract

Susceptibility to deltamethrin in *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) populations collected from cotton and maize crops

The goal of this research was to test the hypothesis that there is no difference in the susceptibility to deltamethrin between cotton and maize populations of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) in Brazil. Firstly, the baseline susceptibility to deltamethrin was estimated, and then the susceptibility to deltamethrin was compared among populations of the pest collected from cotton and maize fields by estimating dose-mortality lines and monitoring the survivorship at diagnostic doses. The response to the selection pressure with deltamethrin in *S. frugiperda* population was evaluated under laboratory conditions. The populations of *S. frugiperda* were collected in several Brazilian agricultural regions in three different crop seasons (from 2001/2002 to 2003/2004). The bioassays were conducted by applying deltamethrin topically on third instar larvae. Based on the baseline susceptibility data, two diagnostic doses were chosen to monitor the susceptibility of *S. frugiperda* populations to deltamethrin, which corresponded to the LD₉₅ e LD₉₇ of the susceptible population. The results obtained herein highlighted that, regardless of host crop, the insects collected from Bahia were less susceptible to deltamethrin than the others over three crop seasons. The survivorship of populations from Bahia ranged from 16 to 39% according the crop season evaluated. These differences were discussed in terms of the current crop management practices and ecological features at that region. Furthermore, the insects collected from cotton fields were significantly less susceptible to deltamethrin than those from maize fields over the three crop seasons. This result might be consequence of the selection processes of resistant individuals at other crop fields such as maize. Furthermore, maize fields might have functioned as a reservoir of selected insects by insecticides that could colonize other host plants such as cotton fields. The resistance ratio of deltamethrin-resistant *S. frugiperda* population selected under laboratory condition was ≈ 14 -fold. Thus, confirming the existence of a significant potential for selecting deltamethrin-resistant individuals in the field. Also, the diagnostic doses selected in this work were suitable for monitoring the susceptibility of the pest populations to deltamethrin. Overall, the efficacy of *S. frugiperda* insecticide resistance management programs in a specific region should rely on the fine evaluation of the availability of crop systems and the intensity of cultivating different host plants of the pest over the crop season.

Keywords: Insecticide resistance, monitoring, pyrethroid, host plants

2.1 Introdução

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) (J.E. Smith) é considerada a praga-chave da cultura do milho (*Zea mays* L.) no Brasil. Nos últimos anos, este inseto tem ocorrido como sério problema fitossanitário também na cultura do algodão (*Gossypium hirsutum* L.) principalmente na região Centro-Oeste. Entre os fatores que provavelmente tem contribuído para a ocorrência de elevadas infestações de *S. frugiperda* na cultura do algodão podem ser citados os plantios sucessivos de milho, aplicações excessivas e inadequadas de inseticidas, a existência de condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da praga, e por fim a implantação de cultivos de algodão no sistema de plantio direto.

As lagartas de *S. frugiperda* podem causar sérios prejuízos à produção de algodão, principalmente em decorrência dos danos causados às maçãs (DEGRANDE, 1998). Em função da capacidade de destruição que *S. frugiperda* exerce sobre as diferentes plantas hospedeiras atacadas, o controle químico deste inseto tem sido a tática mais utilizada pelos agricultores para controle das infestações desta praga em diferentes culturas. Assim, o uso muitas vezes indiscriminado de inseticidas tem contribuído para o estabelecimento de populações de *S. frugiperda* resistentes as principais classes de inseticidas disponíveis no mercado (DIEZ-RODRIGUEZ; OMOTO, 2001; YU, 1991, 1992, 2006; YU; NGUYEN; ABO-ELGHAR, 2003). Como conseqüências da presença de uma frequência elevada de insetos-pragas resistentes em uma determinada área agrícola, têm-se o aumento na intensidade de uso de inseticidas, a utilização de doses do produto acima da recomendada (GEORGHIOU, 1983), além de um elevado custo econômico e social (PIMENTEL et al., 1980).

A resistência a inseticidas é entendida como um processo evolutivo afetado por diferentes fatores bioecológicos e genéticos ligados à praga alvo, e de fatores operacionais que se referem ao produto químico e à sua utilização (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977ab; ROUSH; McKENZIE, 1987). A resistência a inseticidas tem sido definida como a habilidade de uma população de um organismo em tolerar as doses de um tóxico que seriam letais para a maioria dos indivíduos da espécie (WORLD HEALTH ORGANIZATION apud CROFT; Van de BANN, 1988). Segundo Dobzhansky (1951) a resistência a inseticidas caracteriza-se por ser pré-adaptativa, genética e, hereditária. No contexto agrícola a resistência tem sido identificada como uma das mais sérias ameaças ao desenvolvimento e manutenção de práticas de MIP (LABBE; LENORMAND;

RAYMOND, 2005; MATSON et al., 1997; METCALF, 1980). Uma das explicações está no fato de que muitas das práticas de manejo de pragas, como o controle químico, a resistência de plantas a insetos e os agentes de controle biológico, são idealizadas e colocadas em prática com o objetivo de reduzir a população de uma praga mediante o aumento da mortalidade ou pela diminuição da fecundidade dos insetos. Deste modo, possíveis diferenças na sobrevivência e ou fecundidade entre os indivíduos de uma população, após a utilização de alguma destas práticas de manejo, podem resultar na seleção de insetos resistentes a táticas de controle (VIA, 1990). Neste caso, a existência de variabilidade suficiente na população de insetos com relação a quaisquer características fisiológicas ou comportamentais que possam sobrepujar as medidas de controle, torna um processo inevitável a evolução de pragas melhores adaptadas e mais difíceis de serem controladas (GOULD, 1988ab, 1991).

O primeiro relato de resistência a inseticidas em *S. frugiperda* foi realizado por Young e McMillian, 1979. Neste trabalho, os autores identificaram a resistência ao inseticida carbaryl em uma população coletada em milho no estado da Flórida, EUA. Posteriormente, McCord e Yu, 1987 demonstraram que o mecanismo de resistência presente nesta população envolvia principalmente a destoxificação pelo carbaryl pela atividade de oxidases microssomais por meio de reações de hidroxilação e epoxidação. Desde então, já foi identificada a resistência as principais classes de inseticidas de populações *S. frugiperda* coletadas no campo. Yu (1991) detectou razões de resistência que variaram de 2 a 216 vezes para piretróides, 12 a 271 vezes para fosforados e de 14 a 192 vezes para carbamatos. Em outro trabalho, Yu (1992) encontrou resistência em *S. frugiperda* ao piretróide fluvalinate (263 vezes), ao fosforado metil-parathion (516 vezes) e ao carbamato carbaryl (560 vezes). Nos trabalhos de Yu (1991, 1992) os mecanismos de resistência detectados nas populações de *S. frugiperda* envolveram geralmente uma maior atividade de enzimas que atuaram nos processos de destoxificação por inseticidas tais como: oxidases microssomais, glutathione-S-transferases e hidrolases. Entretanto, foram identificados indícios de insensibilidade de sítio de ação, tais como a acetilcolinesterase, para inseticidas fosforados e carbamatos (YU, 1992). A insensibilidade de sítio de ação como mecanismo de resistência a inseticidas de *S. frugiperda* foi posteriormente confirmada por Yu; Nguyen e Albo-Elghar (2003) e Yu (2006).

O manejo de *S. frugiperda* não tem se apresentado como uma tarefa simples e bem definida. Raças de *S. frugiperda* foram inicialmente caracterizadas através de eletroforese de

isoenzimas com a identificação de grupos de insetos associadas às plantas de milho e algodão (Raça C) e a plantas de arroz (Raça R) (PASHLEY; JOHNSON; SPARKS, 1985). Estas duas raças já foram identificadas e caracterizadas nos Estados Unidos da América (PASHLEY, 1986; PASHLEY; HAMMOND; HARDY, 1992) e no Brasil (BUSATO et al., 2002; BUSATO et al., 2004). No Brasil já foram inclusive detectadas diferenças na suscetibilidade a diferentes inseticidas entre estas raças da praga (BUSATO, 2006). Grande parte da literatura científica disponível classifica os insetos de *S. frugiperda* que ocorrem em milho e algodão como pertencentes a uma mesma raça (Raça C). Deste modo, a colonização de campos de produção de algodão e milho por esta praga em uma mesma região agrícola do Brasil pode ter exposto populações deste inseto, com potencial de se intercruzarem, a repetidas pressões de seleção por inseticidas em diferentes culturas ao longo do ano agrícola. Nos últimos anos, este cenário pode ter sido decisivo para o agravamento em âmbito regional dos problemas da resistência a inseticidas de *S. frugiperda*.

Apesar da importância de *S. frugiperda* nas culturas do milho e do algodão, não há estudos comparando a suscetibilidade a diferentes inseticidas entre populações de *S. frugiperda* coletadas nessas duas culturas em diferentes regiões agrícolas do Brasil. Essas informações são de grande relevância para o estabelecimento de estratégias de manejo de *S. frugiperda*. Sendo assim, no presente trabalho os seguintes estudos específicos foram conduzidos: (a) determinação da linha básica de suscetibilidade ao inseticida piretróide deltametrina e estabelecimento de concentrações diagnósticas para monitoramento da suscetibilidade; (b) comparação da suscetibilidade a deltametrina entre populações de *S. frugiperda* coletadas em culturas de algodão e milho; e (c) avaliação da resposta de *S. frugiperda* à seleção com deltametrina em condições de laboratório.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Material e Métodos

2.2.1.1 Coleta das populações de *Spodoptera frugiperda* no campo

As populações de *S. frugiperda* foram coletadas em diferentes localidades produtoras de algodão e milho nas safras agrícolas 2001/2002, 2002/2003 e 2003/2004 (Quadro 2.1). A coleta foi realizada no início da infestação da praga e, preferencialmente, num momento anterior à aplicação de inseticida para o controle do inseto. No trabalho de amostragem das populações, os vários pontos de coleta dos insetos foram distribuídos aleatoriamente nas áreas para garantir a representatividade das amostras. Foram coletadas no mínimo 200 lagartas da praga por amostra. As estruturas vegetais de plantas de algodão ou milho com lagartas de *S. frugiperda* foram acondicionadas em caixas de isopor e encaminhadas ao Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas da ESALQ/USP, Piracicaba-SP.

Safra	Região	População	Hospedeiro	Município	Longitude	Latitude	Data de coleta
2001/2002	Bahia	BA-1	Algodão	Barreiras	44° 59' 24'' O	12° 09' 10'' S	15/04/2002
		BA-2	Milho				30/01/2002
	Goiás	GO-1	Algodão	Acreúna	50° 22' 37'' O	17° 23' 44'' S	27/03/2002
		GO-2	Milho	Rio Verde	50° 55' 41'' O	17° 47' 53'' S	21/11/2001
	Mato Grosso	MT-1	Algodão	Primavera do Leste	54° 17' 46'' O	15° 33' 32'' S	30/04/2002
		MT-2	Milho	Rondonópolis	54° 38' 08'' O	16° 28' 15'' S	15/11/2001
2002/2003	Bahia	BA-3	Algodão	Barreiras	44° 59' 24'' O	12° 09' 10'' S	18/03/2003
		BA-4	Milho				22/05/2003
	Goiás	GO-3	Algodão	St. Helena de Goiás	50° 35' 49'' O	17° 48' 49'' S	25/03/2003
		GO-4	Milho	Rio Verde	50° 55' 41'' O	17° 47' 53'' S	04/04/2003
2003/2004	Bahia	BA-5	Algodão	Barreiras	44° 59' 24'' O	12° 09' 10'' S	11/03/2004
		BA-6	Milho				09/02/2004
	Goiás	GO-5	Algodão	Acreúna	50° 22' 37'' O	17° 23' 44'' S	11/03/2004
		GO-6	Milho	Rio Verde	50° 55' 41'' O	17° 47' 53'' S	16/03/2004
	Mato Grosso	MT-3	Algodão	Primavera do Leste	54° 17' 46'' O	15° 33' 32'' S	04/03/2004
		MT-4	Milho	Rondonópolis	54° 38' 08'' O	16° 28' 15'' S	14/04/2004
	Minas Gerais	MG-1	Algodão	Unai	46° 54' 22'' O	16° 21' 27'' S	17/03/2004
		MG-2	Milho				05/03/2004
	São Paulo	SP-1	Algodão	Jales	50° 32' 45'' O	20° 16' 08'' S	06/02/2004
		SP-2	Milho				08/03/2004

Quadro 2.1 - Identificação das populações de *Spodoptera frugiperda* amostradas em diferentes safras agrícolas, regiões, hospedeiros, municípios, coordenadas geográficas e datas de coleta

2.2.1.2 Criação de *Spodoptera frugiperda* em condições de laboratório

2.2.1.2.1 Criação para a manutenção das populações

As lagartas coletadas no campo foram utilizadas para a fundação das populações dos insetos que foram mantidas em condições de laboratório em dieta artificial. A população suscetível de referência (SUS) utilizada no projeto foi uma população de *S. frugiperda* obtida junto à EMBRAPA Sete Lagoas, MG em 1995, e que tem sido mantida em laboratório na ausência de pressão de seleção por inseticidas.

A criação de *S. frugiperda* no laboratório foi realizada de acordo com o método apresentado por Parra (2001). Para a manutenção de cada população coletada no campo foram inoculadas mensalmente duas lagartas de 1º instar em 200 tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro por 8 cm de altura) contendo dieta artificial formulada à base de feijão, germe de trigo e levedura de cerveja. As pupas dos insetos foram retiradas dos tubos de vidro e dispostas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro por 1,5 cm de altura forrada com papel filtro e, cobertas com um copo plástico até a emergência dos adultos. As mariposas recém-emergidas foram acondicionadas em gaiolas constituídas de tubos de PCV (cloreto de polivinila) de 10 cm de diâmetro por 20 cm de altura revestidos internamente com papel jornal, o qual serviu como substrato para a oviposição. Foram acondicionados 15 casais de mariposas de *S. frugiperda* por gaiola em sala de criação mantida a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. Os adultos foram alimentados com solução de mel na concentração de 10%. A solução de mel e o substrato para postura foram substituídos a cada dois dias. Desta maneira, as massas de ovos de *S. frugiperda* eram recortadas dos papéis jornal e acondicionadas em copos plásticos transparentes de 100 mL juntamente com uma fita de papel de filtro umedecida com água. Estes copos plásticos eram mantidos em câmara de germinação, mantida a 20°C e fotofase de 14 h, até a eclosão das lagartas.

2.2.1.2.2 Criação para os bioensaios

Os bioensaios toxicológicos foram realizados com lagartas de *S. frugiperda* de 3º instar. As lagartas para os bioensaios foram criadas em recipientes plásticos transparentes de 100 mL providos de tampa. Para tanto, uma camada de aproximadamente 1 cm de dieta artificial foi

colocada no fundo do recipiente plástico, e foram transferidas de 50 a 100 lagartas recém-eclodidas. Estes recipientes foram acondicionados em uma sala de criação climatizada, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 h. Os recipientes de criação permaneceram na sala de criação dos insetos até as lagartas atingirem o ínstar para os bioensaios.

2.2.1.3 Procedimentos do bioensaio de aplicação tópica

O bioensaio de aplicação tópica consistiu no tratamento de lagartas de *S. frugiperda* de 3º ínstar com uma alíquota de 1 μL de solução do inseticida técnico deltametrina [98,5% de pureza] diluído em acetona PA (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil). O inseticida foi aplicado na região do pronoto das lagartas com o auxílio um microaplicador automático Arnold LV6 (Burkard Manufacturing, Rickmansworth, Hertfordshire, Reino Unido). As lagartas do tratamento testemunha receberam apenas acetona. Após a aplicação do inseticida, as lagartas foram transferidas para placas de acrílico de 12 células (Costar, Cambridge, Massachusetts, EUA) contendo uma porção de dieta artificial. As placas foram mantidas em câmara climatizada regulada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 14 h. A mortalidade das lagartas foi avaliada 24 h após a aplicação do produto. O critério de mortalidade foi definido a partir do toque de cada lagarta com o auxílio de um estilete. Os indivíduos que não responderam ao toque com estilete com movimentos vigorosos e coordenados foram considerados mortos.

2.2.1.4 Caracterização da suscetibilidade a deltametrina de populações de *Spodoptera frugiperda*

Para a caracterização toxicológica da população suscetível de referência de *S. frugiperda* a deltametrina foram utilizadas de seis a oito concentrações do produto espaçadas logaritmicamente entre 0,02 e 4,03 μg de deltametrina / g de lagarta [ppm (I.A.)], as quais foram veiculadas por meio de um bioensaio de aplicação tópica (item 2.2.1.3). Estas doses de deltametrina proporcionaram uma mortalidade nas lagartas de *S. frugiperda* da população suscetível de referência na faixa entre 5% e 95%. Foram realizadas de oito a 10 repetições do bioensaio para cada dose, sendo testadas no mínimo 96 lagartas por dose. Os dados de mortalidade nos bioensaios foram submetidos à análise de Probit mediante o uso do programa

POLO-PC (LEORA SOFTWARE, 1987). Foram estimados os valores da DL_{50} , (DL = dose letal), respectivos intervalos de confiança (IC 95%) e coeficiente angular. Após a caracterização da suscetibilidade a deltametrina da população suscetível de referência de *S. frugiperda* (SUS) as doses letais 95 e 97% foram escolhidas como doses diagnósticas. (ROUSH; MILLER, 1986; FFRENCH-CONSTANT; ROUSH, 1990). Estas doses diagnósticas foram posteriormente utilizadas no monitoramento da suscetibilidade a deltametrina em diferentes populações de *S. frugiperda* nas safras agrícolas 2002/2003 e 2003/2004.

Ainda nesta etapa do trabalho foi realizada a avaliação preliminar da suscetibilidade a deltametrina em populações de *S. frugiperda* associadas às culturas do algodão e milho com populações da praga coletadas na safra 2001/2002 (Quadro 2.1). A caracterização toxicológica das diferentes populações de *S. frugiperda* associadas às culturas do algodão e milho a deltametrina foi realizada a partir do uso de seis a oito doses do produto espaçadas logaritmicamente entre 0,01 e 12,89 µg de deltametrina / g de lagarta [ppm (I.A.)] por meio de um bioensaio de aplicação tópica (item 2.2.1.3).

Os dados de mortalidade obtidos nos bioensaios foram submetidos à análise de Probit, mediante utilização do programa POLO-PC (LEORA SOFTWARE, 1987). Foram estimados os valores da DL_{50} , (DL = dose letal) e intervalos de confiança (IC 95%), valores de coeficiente angular, razões de resistência (RR) e intervalos de confiança (IC 95%). A razão de resistência (RR) foi estimada mediante a divisão da DL_{50} da população de campo pela DL_{50} da população suscetível de referência, e o intervalo de confiança determinado de acordo com o método descrito por Robertson e Preisler (1992).

2.2.1.5 Isolamento e caracterização da resistência a deltametrina de *Spodoptera frugiperda*

Para a obtenção de uma população de *S. frugiperda* resistente à deltametrina, a população de campo MT-3 que havia sido coletada na cultura do algodão no estado do Mato Grosso na safra 2003/2004 foi submetida a cinco ciclos de seleção com o inseticida em condições de laboratório. No início do processo de seleção foi utilizada uma dose intermediária entre a DL_{50} e a DL_{95} da população suscetível de referência (SUS). Os indivíduos sobreviventes em cada ciclo de seleção foram resgatados e criados conforme descrito nos itens 2.2.1.2.1 e 2.2.1.2.2. A dose do inseticida utilizada na seleção dos indivíduos foi aumentada no terceiro ciclo de seleção para a DL_{95} da

população suscetível de referência (4,03 µg de deltametrina / g de lagarta [ppm (I.A.)]). Para a obtenção de uma população de *S. frugiperda* considerada resistente a deltametrina (população Delta-R). Os dados de mortalidade obtidos para a população resistente foram submetidos à análise de Probit (LEORA SOFTWARE, 1987). A razão de resistência foi estimada mediante a divisão da DL_{50} da população resistente pela DL_{50} da população suscetível de referência, e o intervalo de confiança da razão de resistência estimado segundo método descrito por Robertson e Preisler (1992).

2.2.1.6 Monitoramento da suscetibilidade a deltametrina de populações de *Spodoptera frugiperda*

O monitoramento da suscetibilidade a deltametrina foi realizado com populações de *S. frugiperda* coletadas nas safras agrícolas 2002/2003 e 2003/2004. Foram amostradas populações da praga que infestavam as culturas algodão ou do milho nas diferentes regiões de coleta (Quadro 2.1). O monitoramento da suscetibilidade das populações de *S. frugiperda* foi realizado por meio de bioensaios de aplicação tópica (item 2.2.1.3) com a utilização de doses diagnósticas (4,03 µg de deltametrina / g de lagarta e 7,25 µg de deltametrina / g de lagarta [ppm (I.A.)]). Estas doses diagnósticas foram definidas com base na estimativa linha de dose-mortalidade da população suscetível de referência de *S. frugiperda*. Para cada uma das populações monitoradas foram realizadas de oito a nove repetições (quatro placas por repetição, 12 lagartas por placa) para cada dose diagnóstica testada. Os resultados de porcentagem de sobrevivência (X) das populações de *S. frugiperda* nas diferentes regiões e safras foram transformados para $\arcsen\sqrt{(X/100)}$. Os resultados de porcentagem de sobrevivência foram submetidos à análise de variância (ANOVA) obedecendo ao esquema fatorial com interação. Foram considerados a região e o hospedeiro de coleta das populações como fatores principais. Quando necessário, as médias de porcentagem de sobrevivência foram separadas pelo teste de Tukey com nível de significância de $\alpha=0,05$ (SAS INSTITUTE, 1993).

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Caracterização da suscetibilidade a deltametrina de populações de *Spodoptera frugiperda*

Para a caracterização da linha básica suscetibilidade a deltametrina de *S. frugiperda* foram utilizadas 1.220 lagartas da população suscetível de referência (SUS) (Tabela 2.1). A DL_{50} estimada foi de 0,34 μg de deltametrina / g de lagarta [ppm (I.A.)] (I.C. 95% 0,27-0,44) e coeficiente angular ($\pm$ erro padrão) de 1,31 ($\pm$ 0,07), χ^2 de 17,81 [graus de liberdade (g.l.) = 6; $P > 0,05$]. Com base na linha de dose-mortalidade da população SUS foram definidas as doses diagnósticas de 4,03 e 7,25 μg de deltametrina/g de lagarta [ppm (I.A.)]. Na dose de 4,03 μg de deltametrina / g de lagarta [ppm (I.A.)] a mortalidade da população SUS foi de aproximadamente 95% (DL_{95}), enquanto na dose de 7,25 μg de deltametrina/g de lagarta [ppm (I.A.)] a mortalidade foi de aproximadamente 97% (DL_{97}). Estas doses foram posteriormente utilizadas em programas de monitoramento da suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* a deltametrina.

A escolha de doses diagnósticas é um passo fundamental para o início de um plano para o manejo da resistência de insetos a inseticidas. Na prática, o manejo da resistência de insetos pode ser definido como o conjunto de procedimentos que quando adotados auxiliam na redução do potencial para a evolução da resistência numa população da praga (DENHOLM; ROWLAND, 1992). As estratégias para o manejo da resistência devem ser dinâmicas e ter a capacidade de se adaptarem às alterações que porventura ocorram nos agrossistemas (FORRESTER, 1990). Todavia, para que o desempenho das estratégias de manejo seja acompanhado ao longo do tempo, é necessário o conhecimento da variabilidade na suscetibilidade a inseticidas das populações de uma praga, e posteriormente o estabelecimento de programas com métodos sensíveis para o monitoramento e identificação de alterações significativas na suscetibilidade das pragas-alvo (ANDOW; IVES, 2002; DENNEHY; GRANNET, 1984; FRENCH-CONSTANT; ROUSH, 1990; ROUSH; MILLER, 1986).

Os programas de monitoramento da suscetibilidade a inseticidas, tradicionalmente, se baseiam em comparações de doses letais e coeficientes angulares de curvas de dose-mortalidade estimadas para diferentes populações de um inseto-praga (TWINE; REYNOLDS, 1980). Este tipo de metodologia para realização do monitoramento da suscetibilidade a inseticidas é mais

adequado para situações em que a resistência a um determinado químico já tenha atingido frequências mais elevadas. Porém, nas ocasiões em que o programa de monitoramento tem caráter preventivo, a comparação de doses letais e de coeficientes angulares pode ser ineficiente para detectar a resistência porque a frequência de resistência na população ainda é baixa (ROUSH; MILLER, 1986). Nestas situações em que a frequência de resistência é baixa e, sobretudo quando há um método de bioensaio bem definido, seria mais adequado o monitoramento da suscetibilidade aos inseticidas em populações da praga por meio da técnica de doses diagnósticas. Com o uso de doses diagnósticas, um número maior de insetos é testado apenas nas doses com maior capacidade de informar sobre a suscetibilidade a um determinado inseticida na população da praga, e conseqüentemente os resultados podem ser obtidos de uma forma mais rápida e precisa (ROUSH; MILLER, 1986).

Na comparação da suscetibilidade a deltametrina de populações de *S. frugiperda* associadas às culturas do algodão e milho, as populações de *S. frugiperda* coletadas na Bahia nas culturas do algodão e milho apresentaram uma resposta distinta de dose-mortalidade a deltametrina (Tabela 2.1). A DL_{50} estimada para a população de algodão (BA-1) foi de 1,18 μ g de deltametrina / g de lagarta [ppm (I.A.)] (I.C. 95% 0,90-1,56), com coeficiente angular ($\pm$ erro padrão) de 1,58 ($\pm$ 0,09), χ^2 de 10,89 [graus de liberdade (g.l.)=5; $P<0,05$] e heterogeneidade de 2,02. Por sua vez, para a população de milho (BA-2) a DL_{50} foi estimada em 0,48 μ g de deltametrina / g de lagarta [ppm (I.A.)] (I.C. 95% 0,29-0,77), com coeficiente angular ($\pm$ erro padrão) de 1,50 ($\pm$ 0,09), χ^2 de 20,73 [graus de liberdade (g.l.)=5; $P>0,05$] com heterogeneidade igual a 4,95. Não houve sobreposição dos intervalos de confiança dos valores estimados de DL_{50} entre as populações coletadas no algodão e no milho na Bahia na safra 2001/2002. O teste de igualdade das linhas de dose-mortalidade destas populações assinalou as curvas como significativamente diferentes ($\chi^2=62,55$; g.l. =2; $P<0,05$), porém as retas foram paralelas, ou seja, os valores de coeficiente angular estimados para as duas populações foram apontados como significativamente iguais ($\chi^2=0,35$; g.l. =1; $P>0,05$). O coeficiente angular pode ser interpretado biologicamente como um indicador da homogeneidade genotípica das populações testadas (HOSKINS; GORDON, 1956), ou ainda interpretado como um resultado ocasionado pelo método de bioensaio utilizado para a caracterização toxicológica (FFRENCH-CONSTANT; ROUSH, 1990).

As populações de *S. frugiperda* coletadas em Goiás nas culturas do algodão e milho apresentaram respostas de dose-mortalidade semelhantes (Tabela 2.2). A DL_{50} estimada para a população de algodão (GO-1) foi de 0,45 µg de deltametrina / g de lagarta [ppm (I.A.)] (I.C. 95% 0,35-0,47), com coeficiente angular ($\pm$ erro padrão) de 1,36 ($\pm$ 0,09), χ^2 de 6,91 [graus de liberdade (g.l.) =5; $P < 0,05$] com heterogeneidade de 1,49. Por sua vez, para a população de milho (GO-2) a DL_{50} foi estimada em 0,54 µg de deltametrina / g de lagarta [ppm (I.A.)] e (I.C. 95% 0,40-0,71) com coeficiente angular ($\pm$ erro padrão) de 1,34 ($\pm$ 0,09), χ^2 de 8,93 [graus de liberdade (g.l.) =5; $P < 0,05$] e heterogeneidade igual a 1,15. Ainda com relação às populações de *S. frugiperda* coletadas no Goiás na safra 2001/2002, foi detectada a sobreposição dos intervalos de confiança dos valores de DL_{50} que foram estimados entre ambas as populações e entre a população suscetível de referência (SUS) (Tabela 2.1). O teste de igualdade de retas de dose-mortalidade indicou que as linhas de dose-mortalidade estimadas para a população proveniente de algodão e milho eram iguais ($\chi^2 = 1,99$; g.l. =2; $P > 0,05$).

A DL_{50} estimada para a população de algodão (MT-1) coletada no Mato Grosso foi de 0,84 µg de deltametrina / g de lagarta [ppm (I.A.)] (I.C. 95% 0,66-1,08), coeficiente angular ($\pm$ erro padrão) de 1,55 ($\pm$ 0,09), χ^2 de 8,54 [graus de liberdade (g.l.) =6; $P < 0,05$] e heterogeneidade de 1,42. Para a população de milho (MT-2) a DL_{50} foi estimada em 0,16 µg de deltametrina / g de lagarta [ppm (I.A.)] (I.C. 95% 0,09-0,27), com coeficiente angular ($\pm$ erro padrão) de 1,08 ($\pm$ 0,08), χ^2 de 14,27 [graus de liberdade (g.l.) =5; $P > 0,05$] com heterogeneidade igual a 2,85. Portanto, não houve sobreposição dos intervalos de confiança dos valores estimados de DL_{50} entre as populações coletadas no algodão e no milho no Mato Grosso na safra 2001/2002.

Tabela 2.1 - Respostas de dose-mortalidade de populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas nas culturas do algodão e milho na safra 2001/2002 ao inseticida deltametrina aplicado por meio de bioensaio de aplicação tópica

Região	População	Hospedeiro	n ^a	DL ₅₀ (µg de I.A./g de lagarta) (95% I.C.) ^b	Coefficiente angular (± erro padrão)	g.l. ^c	χ ²	RR ^d 95% (I.C.)
	SUS	-	1220	0,34 (0,27-0,44)	1,31 ± 0,07	6	17,81	-
Bahia	BA-1	Algodão	840	1,18 (0,90-1,56)	1,58 ± 0,09	5	10,09	3,47 (1,78-6,68)
	BA-2	Milho	768	0,48 (0,29-0,77)	1,50 ± 0,09	6	29,73	1,41 (0,67-2,95)
Goiás	GO-1	Algodão	732	0,54 (0,40-0,71)	1,34 ± 0,09	6	8,93	1,59 (0,74-3,34)
	GO-2	Milho	768	0,45 (0,35-0,57)	1,36 ± 0,09	6	6,91	1,32 (0,62-2,78)
Mato Grosso	MT-1	Algodão	768	0,84 (0,66-1,08)	1,55 ± 0,09	6	8,54	2,47 (1,22-4,95)
	MT-2	Milho	672	0,16 (0,09-0,27)	1,08 ± 0,08	5	14,27	0,47 (0,19-1,14)

^{a/} Número de lagartas testadas

^{b/} µg de deltametrina/g de lagarta

^{c/} Graus de liberdade

^{d/} Razão de resistência: DL₅₀ da população de campo/DL₅₀ da população suscetível de referência (SUS)

O teste de igualdade e paralelismo das linhas de dose-mortalidade para as populações coletadas em algodão e milho no Mato Grosso na safra agrícola 2001/2001 assinalou as retas como significativamente diferentes ($\chi^2=117,85$; g.l. =2; $P<0,05$) e não paralelas ($\chi^2=7,76$; g.l. =1; $P>0,05$). Não houve sobreposição do intervalo de confiança da estimativa de DL_{50} das populações coletada em milho com o intervalo de confiança estimado para a DL_{50} população suscetível de referência (SUS) (Tabela 2.1), todavia a população de algodão coletada naquele estado diferiu significativamente da população SUS.

As populações coletadas nas três regiões brasileiras na safra 2001/2002 apresentaram respostas variadas de dose-mortalidade a deltametrina (Tabela 2.1). Entretanto, os valores de RR estimados para as diferentes populações de *S. frugiperda* coletadas na safra 2001/2002 foram baixos. Além disso, houve a sobreposição dos intervalos de confiança da razão de resistência estimada para todas as populações coletadas no campo. A população de *S. frugiperda* coletada no estado da Bahia na cultura do algodão na safra 2001/2002 apresentou o maior valor de razão de resistência estimado (RR=3,47). Todavia, cabe ressaltar que houve a sobreposição dos intervalos de confiança das razões de resistência estimadas para todas as populações de *S. frugiperda* da safra 2001/2002 (Tabela 2.1).

No entanto, Busato et al. (2006) detectaram diferenças na suscetibilidade a diversos inseticidas com mecanismos de ação distintos em lagartas de *S. frugiperda* associadas a diferentes plantas hospedeiras após a exposição, e Adamczyk et al. (1997) observaram tais diferenças em relação à resposta a toxinas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) expressas em plantas de algodão geneticamente modificado. Parte dessas diferenças na suscetibilidade a xenobióticos vinculadas às raças de *S. frugiperda* associadas às plantas hospedeiras têm sido atribuídas a fatores fisiológicos como variação na atividade de enzimas de destoxificantes como as oxidases de função mista (VEENSTRA; PASHLEY; OTTEA, 1995). As diferenças encontradas nas linhas de dose-mortalidade entre populações de *S. frugiperda* coletadas nas culturas do algodão e do milho foram estatisticamente significativas em duas das três regiões de coleta de *S. frugiperda*. Além disso, ficou evidente nos valores estimados de DL_{50} a discriminação na resposta a deltametrina entre a população BA-1, cujos insetos foram coletados em algodão na Bahia, e as demais populações de *S. frugiperda*. Todavia, as interpretações destes resultados com base apenas nos métodos utilizados indicaram que o fator determinante no nível de suscetibilidade detectado numa determinada população de *S. frugiperda* esteve provavelmente

relacionado ao momento de coleta dos insetos no campo em relação à sucessão de culturas no ano agrícola.

A atividade agrícola de alto desempenho no Brasil caracteriza-se por ser intensiva, de modo que os agricultores e as modernas empresas agrícolas têm por objetivo cultivar o maior número de safras ao longo de um mesmo ano agrícola. Aliado a este fato, tem-se a enorme capacidade de *S. frugiperda* de se desenvolver em diferentes plantas hospedeiras. Portanto, é intuitivo se formular a hipótese de que o aumento na intensidade de ataques desta praga pode estar associado à expansão dos cultivos das culturas do algodão e milho, entre outros hospedeiros da praga, ao longo do ano agrícola. As populações de *S. frugiperda* coletadas na cultura do algodão na Bahia (BA-1) e no Mato Grosso (MT-1) foram amostradas em Abril de 2002, ou seja, tardiamente no calendário da época tradicional de produção de algodão. Estas duas populações foram mais resistentes e apresentaram resposta distinta quanta à aplicação de deltametrina quando comparadas às populações de milho coletadas nas mesmas regiões, porém em Fevereiro de 2002 (BA-2), e em Novembro de 2001 (MT-2) respectivamente. Assim, considerando que em uma mesma região as infestações de *S. frugiperda* que atacam as diferentes culturas como integrantes de uma mesma metapopulação, a exposição a inseticidas em diferentes agroecossistemas ao longo do ano agrícola poderia explicar este padrão encontrado na suscetibilidade a deltametrina. Entretanto, para o entendimento dessas relações são necessários estudos que avaliem o impacto da fragmentação da paisagem agrícola sobre a conectividade das populações de *S. frugiperda*.

2.3.2 Isolamento e caracterização da resistência a deltametrina de *Spodoptera frugiperda*

Na caracterização da suscetibilidade da população de *S. frugiperda* resistente a deltametrina (Delta-R) foram utilizadas 552 lagartas (Tabela 2.2). A DL_{50} estimada para a população Delta-R foi de 4,86 μg de deltametrina / g de lagarta [ppm (I.A.)] (I.C. 95%), com coeficiente angular ($\pm$ erro padrão) de 1,69 ($\pm 0,19$), χ^2 de 9,77 [graus de liberdade (g.l.) = 5; $P < 0,05$) com uma razão de resistência de 14,29 vezes (Tabela 2.2 e Figura 2.1). O teste de igualdade e paralelismo das curvas de dose-resposta mostrou diferença significativa na resposta a deltametrina entre as populações resistente e suscetível ($\chi^2 = 2,92$; g.l. = 1; $P < 0,05$). Os coeficientes angulares estimados para a população SUS e Delta-R foram significativamente

diferentes ($\chi^2=5,80$; g.l. =1; $P<0,05$). Neste caso, o mesmo método de bioensaio foi utilizado para seleção da população resistente (Delta-R) e para estimativa da curva de dose-mortalidade da população SUS. Portanto, o maior valor coeficiente angular estimado para a população resistente (Delta-R) foi provavelmente relacionado à sua maior homogeneidade genotípica. Houve sobreposição entre os valores das linhas de dose-resposta a deltametrina estimadas para as populações SUS e Delta R. Logo, não foi possível o estabelecimento de doses discriminatórias para o refinamento de trabalhos futuros de monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda* à deltametrina.

A resistência de *S. frugiperda* a inseticidas do grupo dos piretróides já havia sido caracterizada após seleção em condições de laboratório. Brewer et al. (1990) encontraram uma razão de resistência ao piretróide fenvalerate em uma população de *S. frugiperda* selecionada em laboratório da ordem de 8,4 vezes após 20 ciclos de seleção com o produto. Diez-Rodríguez e Omoto (2001) mostraram a existência de uma razão de resistência a lambda-cialotrina (piretróide) de *S. frugiperda* de ≈ 13 vezes. Estes mesmos autores determinaram que a resistência era um caráter autossomal, incompletamente recessivo e sob o controle de vários genes com efeitos secundários sob a manifestação da resistência. Morillo e Notz (2001) também realizaram a seleção de *S. frugiperda* em laboratório com lambda-cialotrina a partir de uma população coletada em campo de milho na Argentina. Estes autores encontraram uma razão de resistência de 41,9 vezes de *S. frugiperda* a lambda-cialotrina. De modo geral, os trabalhos de seleção de populações de *S. frugiperda* a piretróides em condições de laboratório têm demonstrado o real potencial de evolução da resistência a estes produtos no campo.

Tabela 2.2 - Resposta de dose-mortalidade da população suscetível de referência (SUS) e da população resistente (Delta-R) de *Spodoptera frugiperda* a deltametrina

População	n ^a	DL ₅₀ (µg de I.A./g de lagarta) (95% I.C.)	Coefficiente angular (± erro padrão)	g.l. ^c	χ ²	RR ^d (95% I.C.)
SUS	1220	0,34 (0,27-0,44)	1,31 (± 0,07)	6	17,81	-
MT-3	588	0,96 (0,78-1,18)	1,41 (± 0,12)	4	3,93	2,82 (1,67-4,66)
Delta-R	552	4,87 (2,35-7,48)	1,69 (± 0,19)	4	9,75	14,32 (12,87-15,72)

^{a/} Número de lagartas testadas

^{b/} µg de deltametrina / g de lagarta

^{c/} Graus de liberdade

^{d/} Razão de resistência: DL₅₀ da população resistente / DL₅₀ da população suscetível de referência

Figura 2.1 - Linhas de dose-resposta das populações de *Spodoptera frugiperda* suscetível de referência (SUS) e resistente a deltametrina (Delta-R)

2.3.3 Monitoramento da suscetibilidade a deltametrina de populações de *Spodoptera frugiperda*

Foram observadas diferenças significativas na suscetibilidade a deltametrina em populações de *S. frugiperda* coletadas na safra 2002/2003 nas regiões da Bahia e de Goiás, baseado nas doses diagnósticas testadas (DL_{95} e DL_{97}) (Tabela 2.3 e 2.4). Além disso, foi observada diferença significativa na sobrevivência a deltametrina na dose diagnóstica equivalente à DL_{97} entre os insetos coletados em milho e algodão (Tabela 2.4). Entretanto, a interação da região com o hospedeiro de coleta dos insetos não foi significativa para nenhuma das doses testadas (Tabela 2.4).

Na safra 2003/2004, os resultados do monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda* a deltametrina com a DL_{95} da população suscetível indicaram diferenças significativas na sobrevivência ao inseticida não apenas entre as regiões, mas também entre os hospedeiros de coleta das populações (Tabela 2.5 e Figura 2.2). Todavia, a interação dos fatores principais (a região e o hospedeiro de coleta) não foi significativa nessa dose diagnóstica. No monitoramento com a DL_{97} as diferenças na sobrevivência a deltametrina também foram significativas entre as regiões e os hospedeiros de coleta dos insetos (Tabela 2.6 e Figura 2.3). Entretanto, nessa dose diagnóstica a interação da região com a planta hospedeira de coleta foi significativa (Tabela 2.6). Dessa maneira, houve diferença significativa na porcentagem de sobrevivência entre as populações de algodão e milho coletadas nas regiões da Bahia ($F=4,88$; g.l. =1, 80; $P=0,03$), Minas Gerais ($F=7,55$; g.l. =1, 80; $P=0,0074$) e Mato Grosso ($F=6,64$; g.l. =1, 80; $P=0,0018$).

As diferenças significativas na resposta das populações coletadas na Bahia e no Goiás na safra 2002/2003 indicaram uma possível existência de contrastes no regime de uso de inseticidas entre estas regiões. No entanto, o manejo das culturas e a situação ecológica nestas localidades são conhecidamente bem distintos. A agricultura na região de Barreiras, Estado da Bahia, é reconhecida como um pólo de agricultura irrigada e de elevado desempenho, tanto na cultura do algodão como na do milho. Além disso, nestas áreas irrigadas do Oeste da Bahia, há uma menor disponibilidade de refúgios com hospedeiros alternativos uma vez que as áreas agrícolas são concentradas no espaço e se sucedem durante o ano agrícola.

Tabela 2.3 - Porcentagem de sobrevivência ($\pm$ erro padrão) de *Spodoptera frugiperda* coletadas nas culturas do algodão e milho na safra 2002/2003 após a exposição à DL₉₅ da população suscetível de referência^a por meio de bioensaio de aplicação tópica

Região	Planta Hospedeira				Média
	n ^b	Algodão	n ^b	Milho	
Bahia	420	31,02 ($\pm$ 3,25)	408	36,81 ($\pm$ 3,85)	33,91 ($\pm$ 2,54)
Goiás	432	16,20 ($\pm$ 2,22)	408	13,88 ($\pm$ 2,90)	15,04 ($\pm$ 1,79)
Média		23,61 ($\pm$ 2,62)		25,34 ($\pm$ 3,63)	
Fonte de variação		<i>F</i>	g.l. ^c	<i>P</i>	
Região		24,93	1; 32	<0,0001 ^{***}	
Hospedeiro		0,05	1; 32	0,8212 ^{NS}	
Região $\times$ Hospedeiro		1,75	1; 32	0,1952 ^{NS}	

^a/ 4,23 μ g de deltametrina/g de lagarta

^b/ Número de lagartas testadas

^c/ Graus de liberdade

^{***}/ Significativo ao nível de 5% de probabilidade

^{NS}/ Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 2.4 - Porcentagem de sobrevivência ($\pm$ erro padrão) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* coletadas nas culturas do algodão e milho na safra 2002/2003 após a exposição à DL₉₇ da população suscetível de referência^a por meio de bioensaio de aplicação tópica

Região	Planta Hospedeira				Média
	n ^b	Algodão	n ^b	Milho	
Bahia	408	18,29 ($\pm$ 1,80)	408	13,89 ($\pm$ 2,86)	16,09 ($\pm$ 1,72)
Goiás	432	8,33 ($\pm$ 1,55)	408	5,56 ($\pm$ 1,30)	6,94 ($\pm$ 1,04)
Média		13,31 ($\pm$ 1,67)		9,72 ($\pm$ 1,83)	
Fonte de variação		<i>F</i>	g.l. ^c	<i>P</i>	
Região		20,54	1; 32	<0,0001 ^{***}	
Hospedeiro		4,52	1; 32	0,0412 ^{***}	
Região $\times$ Hospedeiro		0,00	1; 32	0,9519 ^{NS}	

^a/ 7,25 μ g de deltametrina / g de lagarta

^b/ Número de lagartas testadas

^c/ Graus de liberdade

^{***}/ Significativo ao nível de 5% de probabilidade

^{NS}/ Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 2.5 - Porcentagem de sobrevivência ($\pm$ erro padrão) de *Spodoptera frugiperda* coletadas nas culturas do algodão e milho na safra 2003/2004 após a exposição à DL₉₅ da população suscetível de referência^a por meio de bioensaio de aplicação tópica

Região	Planta Hospedeira				Média ^d
	n ^b	Algodão	n ^b	Milho	
Bahia	408	45,83 ($\pm$ 4,50)	432	30,79 ($\pm$ 3,36)	38,31 ($\pm$ 3,28) a
Minas Gerais	432	40,28 ($\pm$ 3,91)	432	30,79 ($\pm$ 1,99)	35,53 ($\pm$ 2,42) a
Mato Grosso	432	29,25 ($\pm$ 1,93)	432	24,07 ($\pm$ 3,16)	26,66 ($\pm$ 1,90) b
São Paulo	432	20,83 ($\pm$ 1,84)	432	17,82 ($\pm$ 1,94)	19,32 ($\pm$ 1,35) b
Goiás	432	17,59 ($\pm$ 2,33)	432	14,35 ($\pm$ 1,85)	15,97 ($\pm$ 1,50) c
Média		30,76 ($\pm$ 2,10)		23,56 ($\pm$ 1,48)	
Fonte de variação		<i>F</i>	g.l. ^c	<i>P</i>	
Região		24,74	4; 80	<0,0001 ***	
Hospedeiro		15,94	1; 80	0,0001 ***	
Região $\times$ Hospedeiro		1,19	4; 80	0,3220 ^{NS}	

^a/ 4,23 μ g de deltametrina / g de lagarta;

^b/ Número de lagartas testadas;

^c/ Graus de liberdade

^d/ Médias das regiões seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=5\%$)

***/ Significativo ao nível de 5% de probabilidade

^{NS}/ Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Figura 2.2 - Porcentagem média de sobrevivência de populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas nas diferentes regiões do Brasil nas culturas do algodão e milho na safra 2003/2004 na dose diagnóstica equivalente à DL_{95} da população suscetível de referência

Tabela 2.6 - Porcentagem de sobrevivência ($\pm$ erro padrão) de *Spodoptera frugiperda* coletadas nas culturas do algodão e milho na safra 2003/2004 após a exposição à DL₉₇ da população suscetível de referência^a por meio de bioensaio de aplicação tópica

Região	Planta Hospedeira				Média ^d
	n ^b	Algodão	n ^b	Milho	
Bahia	408	25,23 ($\pm$ 2,36)	432	18,06 ($\pm$ 1,15)	21,64 ($\pm$ 1,54) a
Minas Gerais	432	24,31 ($\pm$ 2,25)	432	15,74 ($\pm$ 1,26)	20,02 ($\pm$ 1,62) a
Mato Grosso	432	12,27 ($\pm$ 0,88)	432	20,60 ($\pm$ 3,79)	16,43 ($\pm$ 2,14) a
São Paulo	432	12,50 ($\pm$ 1,84)	432	7,87 ($\pm$ 1,03)	10,18 ($\pm$ 1,16) b
Goiás	432	6,94 ($\pm$ 0,77)	432	5,55 ($\pm$ 1,39)	6,24 ($\pm$ 0,79) c
Média		16,25 ($\pm$ 2,10)		13,56 ($\pm$ 1,23)	
Fonte de variação		<i>F</i>	g.l. ^c	<i>P</i>	
Região		27,21	4; 80	<0,0001 ^{***}	
Hospedeiro		6,13	1; 80	0,0154 ^{***}	
Região $\times$ Hospedeiro		4,15	4; 80	0,0024 ^{***}	

^a/ 7,25 μ g de deltametrina / g de lagarta;

^b/ Número de lagartas testadas;

^c/ Graus de liberdade

^d/ Médias das regiões seguidas de letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=5\%$)

^{***}/ Significativo ao nível de 5% de probabilidade

Figura 2.3 - Porcentagem média de sobrevivência de populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas nas diferentes regiões do Brasil nas culturas do algodão e milho na safra 2003/2004 na dose diagnóstica equivalente à DL_{97} da população suscetível de referência

Este cenário característico da região Oeste da Bahia não favorece, por exemplo, o restabelecimento da suscetibilidade a inseticidas nas populações da praga e pode sobremaneira ter contribuído para os menores níveis de suscetibilidade de *S. frugiperda* a deltametrina encontrados naquela região nas três safras agrícolas avaliadas.

Com base nos dados obtidos neste trabalho, é possível se concluir que a infestação das áreas de algodão por *S. frugiperda* com insetos previamente selecionados com inseticidas pulverizados na cultura do milho cultivado na safra e o manejo com inseticidas na cultura do algodão tem favorecido o estabelecimento de populações de *S. frugiperda* resistentes a inseticidas naquela cultura independentemente da região alvo de estudo.

O monitoramento de populações de *S. frugiperda* coletados na safra 2003/2004 reitera a cultura do algodão como um sistema agrícola com maior potencial para estabelecimento de populações resistentes. As coletas dos insetos no campo nas culturas do algodão e milho nesta safra foram realizadas em datas próximas, com uma diferença de no máximo 40 dias. Este é o caso da população de milho coletada no Mato Grosso (MT-4) amostrada no campo antes que a população de algodão. A população MT-4 apresentou sobrevivência à DL_{97} de deltametrina maior que a população coletada em algodão, e foi responsável pela interação significativa da região com o hospedeiro de coleta (Tabela 2.5).

Com o uso de doses diagnósticas na etapa de monitoramento foi possível a discriminar das populações de *S. frugiperda* coletadas nas diversas regiões quanto suscetibilidade a deltametrina. Esta discriminação entre as populações não foi obtida com a estimativa das linhas de doses-resposta e valores de DL_{50} devido provavelmente à heterogeneidade das populações conforme discutido por Roush e Miller (1986). A partir dos resultados de monitoramento da suscetibilidade das populações de algodão e de milho coletadas nas safras 2002/2003 e 2003/2004 pode-se concluir que há indicativos da ocorrência de seleção por inseticidas de indivíduos na cultura do milho, os quais mais tarde colonizaram a cultura do algodão.

O monitoramento da suscetibilidade a deltametrina em populações de *S. frugiperda* forneceu informações sobre a variabilidade existente entre as diferentes populações deste inseto na resposta a deltametrina. O objetivo do manejo da resistência de pragas é evitar a seleção de populações resistentes e dessa forma retardar ao máximo o estabelecimento da resistência como um problema no campo (METCALF, 1980). Todavia, a implementação de um programa de manejo da resistência é mais efetiva quando a frequência de indivíduos resistentes ainda é baixa,

e não foram ainda detectadas falhas no controle. Em geral, a resistência apenas tem sido diagnosticada após a presença de falhas de controle com a aplicação de um determinado produto químico (FFRENCH-CONSTANT; ROUSH, 1990). Neste trabalho, foram obtidos fortes indicativos de que a cultura do milho cultivada na época tradicional, com plantios no início do verão, pode estar funcionando como uma área de concentração e seleção de indivíduos de *S. frugiperda* resistentes a deltametrina. Desta maneira, os programas de manejo da resistência a inseticidas de populações de *S. frugiperda* devem ser elaborados e colocados em prática no âmbito regional, de modo a integrar o sistema de cultivo misto das culturas do algodão e do milho em uma mesma região agrícola.

2.4 Conclusões

- Há diferenças na suscetibilidade a deltametrina entre as populações de *S. frugiperda* coletadas nas diferentes regiões do Brasil;
- A suscetibilidade a deltametrina de populações de *S. frugiperda* coletadas em algodão e milho varia de acordo com o sistema de produção agrícola de cada região;
- Há resposta à pressão de seleção de *S. frugiperda* com deltametrina em condições de laboratório.

Referências

ANDOW, D.A.; IVES, A.R. Monitoring and adaptative resistance management. **Ecological Applications**, Washington, v.15, p. 1378-1390, 2002.

ADAMCZYK, J.J.JUNIOR.; HOLLOWAY, J.W.; LEONARD, B.R.; GRAVES, J.B. Susceptibility of fall armyworm collected from different plant host to selected insecticides and transgenic Bt cotton. **The Journal of Cotton Science**, Memphis, v.1, p.21-28, 1997.

BREWER, M.J.; TRUMBLE, J.T.; ALVARADO-RODRÍGUEZ, B.; CHANEY, E. Beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) adult and larval susceptibility to three insecticides in managed habitats and relationship to laboratory selection for resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 83, p. 2136-2146, 1990.

BUSATO, G.R.; GRUTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S.; GIOLO, F.P.; MARTINS, A.F. Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul nas culturas do milho e arroz irrigado. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, p. 525-529, 2002.

BUSATO, G.R.; GRUTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S.; GIOLO, F.P.; MARTIN, A.F. Suscetibilidade de lagartas dos biótipos milho e arroz de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas com diferentes modos de ação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, p.15-20, 2006.

BUSATO, G.R.; GRUTZMACHER, A.D.; OLIVEIRA, A.C.; VIEIRA, E.A.; ZIMMER, P.D.; KOPP, M.M.; BANDEIRA, J.M.; MAGALHÃES, T.R. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas do milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, p. 709-716, 2004.

CROFT, B.A.; VAN DE BANN, H.E. Ecological and genetic factors influencing evolution of pesticide resistance in tetranychid and phytoseiid mites. **Experimental & Applied Acarology**, Amsterdam, v.4, p. 277-300, 1988.

DEGRANDE, P.E. **Guia prático de controle das pragas do algodoeiro**. Dourados: UFM, 1998, 60p.

DENHOLM, I.; ROWLAND, M. W. Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 37, p. 91-112, 1992.

DENNEHY, T.J.; GRANETT, J. Monitoring dicofol resistant spider mites (Acari: Tetranychidae) in California cotton. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 77, p. 1386-1392, 1984.

DIEZ-RODRIGUEZ, G.I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 311-316, 2001.

DOBZHANSKY, T. **Genetics and the origin of species**. 3rd ed. New York: Columbia University Press, 1951. 364p.

FORRESTER, N.W. Designing, implementing and servicing an insecticide resistance management strategy. **Science**, Washington, v. 28, p. 167-179, 1990.

FFRENCH-CONSTANT, R.H.; ROUSH, R.T. Resistance detection and documentation: the relative roles of pesticidal and biochemical assays. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**. New York: Chapman and Hall, 1990, p.4-38.

GEORGHIOU, G.P. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIOU, G.P.; SAITO, T. (Ed.). **Pest resistance to pesticides**. New York: Plenum, 1983. cap. 3, p. 769-792.

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C.E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, p. 319-323, 1997a.

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C.E. Operational influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, p. 653-658, 1977b.

GOULD, F. Evolutionary biology and genetically engineered crops. **Bioscience**, Washington, v. 38, p. 26-33, 1988a

GOULD, F. Genetic engineering, integrated pest management, and the evolution of pests. **Trend in Biotechnology**, Amsterdam, v. 6S, p. 15-19, 1988b.

GOULD, F. The evolutionary potential of crop pests. **American Scientist**, New Haven, v. 79, p. 496-507, 1991.

HOSKINS, W.M.; GORDON, H.T. Arthropod resistance to chemicals. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 1, p. 89-122, 1956.

LABBE, P.; LENORMAND, T.; RAYMOND, M. On the world wide spread of an insect resistance gene: a role for local selection. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 18, p. 1471-1484, 2005.

LEORA SOFTWARE, **POLO-PC**: a user's guide to Probit or Logit analysis. Berkeley, 1987. 20p.

McCORD, E. JUNIOR.; YU, S.J. The mechanism of carbaryl resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 27, p. 114-117, 1987.

MATSON, P.A; PARTON, W.J.; POWER, A.G.; SWIFT, M.J. Agricultural intensification and ecosystem properties. **Science**, Washington, v. 277, p. 504-508, 1997.

METCALF, R.L. Changing role of insecticides in crop protection. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 25, p. 219-256, 1980.

MORRILLO, F.; NOTZ, A. Resistencia de *Spodoptera frugiperda* a lambdacialotrina y metomil. **Entomotropica**, Maracay, v. 16, p. 79-87, 2001.

PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: ESALQ, 2001. 134p.

PASHLEY, D.P. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex? **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 79, p. 898-904, 1986.

PASHLEY, D.P.; HAMMOND, A.M; HARDY, T.N. Reproductive isolating mechanisms in fall armyworm host strains. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 85, p. 400-405, 1992.

PASHLEY, D.P.; JOHNSON, S.J; SPARKS, A.N. Genetic population structure of migratory moths: the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 78, p. 756-762, 1985.

PIMENTEL, D.; ANDOW, D.A.; GALLAHAN, D.; SCHREINER, I.; THOMPSON, T.; DYSON-HUDSON, R.; JACBSON, S.; IRISH, M; KROOP, S.; MOSS, A.; SHEPARD, M.; VINZANT, B. **Environmental and social costs of pesticides**: a preliminary assessment. **Oikos**, Copenhagen, v. 34, p. 126-140, 1990.

ROBERTSON, J.L.; PREISLER, H.K. **Pesticide bioassay with arthropods**. Boca Ranton: CRC Press, 1992. 127p.

ROUSH, R.T.; MILLER, G.L. Considerations for the design of insecticide monitoring programs. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 79, p. 293-298, 1986.

ROUSH, R.T.; MCKENZIE, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 32, p. 361-380, 1987.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: user's guide. Cary, 1993. 1022 p.

TWINE, P.H.; REYNOLDS, H.T. Relative susceptibility and resistance of the tobacco budworm to methyl parathion and synthetic pyrethroids in Southern California. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 73, p. 239-242, 1980.

VEENSTRA, K.H.; PASHLEY, D.P.; OTTEA, J.A. Host plant adaptation in fall armyworm host strains: comparison of food consumption, utilization and detoxication enzyme activities. **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 88, p. 80-91, 1995.

VIA, S. Ecological genetics and host adaptation in herbivorous insects: the experimental study of evolution in natural and agricultural systems. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 35, p. 421-446, 1990.

YOUNG, J.R.; MCMILLIAN, W.W. Differential feeding by two strains of fall armyworm larvae on carbaryl surfaces. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 72, p. 202-204, 1979.

YU, S.J. Insecticide resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 39, p. 94-91, 1991.

YU, S.J. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, p. 675-682, 1992.

YU, S.J. Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 84, p. 135-142, 2006.

YU, S.J.; NGUYEN, S.N; ABO-ELGHAR, G.E. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 77, p. 1-11, 2003.

3 VARIABILIDADE MOLECULAR AVALIADA POR MEIO DE MARCADORES RAPD EM POPULAÇÕES DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) COLETADAS NAS CULTURAS DO ALGODÃO E MILHO E NO BRASIL

Resumo

Variabilidade molecular avaliada por meio de marcadores RAPD em populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) coletadas nas culturas do algodão e milho e no Brasil

A variabilidade molecular foi avaliada, através da técnica de RAPD, em 10 populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) coletadas plantações de algodão e milho localizadas em diferentes regiões geográficas do Brasil. As relações moleculares entre essas populações foram analisadas através de matrizes de similaridade genética obtidas pelos índices Simple Matching e Jaccard, dendrogramas UPGMA, análise molecular de variância (AMOVA) e de coordenadas principais (PCOA). Foram avaliados 208 marcadores RAPD dentre os quais 98,56% foram polimórficos. A similaridade genética média detectada entre as populações foi 0,66 pelo índice Simple Matching e 0,25 pelo índice de Jaccard. Em síntese, os dendrogramas foram capazes de classificar as populações da praga em grupos proximamente relacionados com a região de coleta dos insetos. Não foi identificado nenhum ramo dos dendrogramas capaz de separar e associar as populações de *S. frugiperda* a nenhuma das duas plantas hospedeiras avaliadas. AMOVA revelou que 18,36% da variação genética estavam distribuídos entre grupos de populações e 81,64% dentro destes grupos. A análise de coordenadas principais (PCOA) reforçou o padrão de agrupamento encontrado através dos dendrogramas UPGMA. Os resultados obtidos sugeriram que as populações de *S. frugiperda* de algodão e milho numa mesma região do Brasil apresentam um nível significativo de fluxo gênico. Assim, para o manejo efetivo desta praga existe a necessidade de um melhor entendimento e quantificação do fluxo gênico entre as populações de *S. frugiperda* associadas às diferentes plantas hospedeiras dentro da faixa de distribuição da praga e nos diferentes sistemas agrícolas.

Palavras-chaves: marcadores moleculares, similaridade genética, manejo integrado de pragas

Abstract

Molecular variability evaluated through RAPD in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) (J.E. Smith) populations collected in cotton and maize crops in Brazil

The molecular variability was assessed by RAPD technique by sampling 10 populations of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) in cotton and maize fields located at distinctive geographical regions in Brazil. These populations were analyzed by using Simple Matching and Jaccard genetic similarity matrices, UPGMA dendrograms, analysis of molecular variance (AMOVA) and principal coordinate analysis (PCOA). A total of 208 RAPD markers were evaluated of which 98% were polymorphic. The mean genetic similarity was 0.66 and 0.25 by the Simple Matching and Jaccard matrices respectively. In general, the UPGMA dendrograms classified the populations into clusters related to the geographical origin of the samples. It has not been identified any branch of the dendrograms underpinning a molecular association of *S.*

frugiperda with neither of the two host plants. AMOVA showed that 18 and 82% of the genetic variation was distributed among and within the groups of populations respectively. The principal coordinate analysis (PCOA) reinforced the pattern of population clustering found with the UPGMA method. The results suggested the existence of considerable gene flow between cotton and maize populations of *S. frugiperda* collected at the same region in Brazil. Therefore, for an effective management of this pest, there is a need for a better understanding of the gene flow of *S. frugiperda* populations associated to different host plants along the distribution range of this pest over time in a specific agro system.

Keywords: molecular markers, genetic similarity, integrated pest management

3.1 Introdução

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) é uma praga de elevada importância econômica em diversas culturas agrícolas em vários países do mundo (CRUZ; TURPIN, 1982; CORTEZ; WAQUIL, 1997; MÉNDEZ et. 2002). Existem algumas características particulares à biologia de *S. frugiperda* que contribuem para a severidade de seus ataques. Os adultos de *S. frugiperda* apresentam grande capacidade de dispersão, e o hábito migratório da espécie resulta em uma elevada taxa de movimento. Esta espécie apresenta um comportamento alimentar polífago, que inclui o consumo de diferentes plantas cultivadas como o milho, algodão e o arroz (YU; NGUYEN; ABO-ELGHAR, 2003). Apesar da característica de polifagia de *S. frugiperda*, a existência de duas raças deste inseto associadas às plantas hospedeiras já foi caracterizada nos Estados Unidos da América e no Brasil. Estas raças de *S. frugiperda* estavam associadas às plantas de milho e algodão (Raça C) e às plantas de arroz e a certas gramíneas de pastagens (Raça R) (PASHLEY, 1986; PASHLEY; HAMMOND; HARDY, 1992; PASHLEY; JOHNSON; SPARKS, 1985; BUSATO et al., 2002; BUSATO et al., 2004).

O uso de inseticidas tem sido o principal método de controle empregado pelos agricultores nos programas de manejo de *S. frugiperda*. O uso indiscriminado de inseticidas tem contribuído para o estabelecimento de populações de *S. frugiperda* resistentes a principais classes de inseticidas disponíveis no mercado (DIEZ-RODRIGUEZ; OMOTO, 2001; YU, 1991, 1992, 2006). A evolução da resistência a inseticidas em populações de pragas pode ser equacionado principalmente como uma função da frequência do alelo de resistência, intensidade da pressão de seleção, padrão de herança da resistência, custo adaptativo e fluxo gênico (GEORGHIOU;

TAYLOR, 1977ab). Deste modo, estudos envolvendo a detecção e caracterização de similaridade genética entre populações de insetos é uma etapa muito importante no processo de aprimoramento de programas de manejo de pragas (ROUSH; DALY, 1990; TABASHNIK, 1991; CAPRIO; TABASHNIK, 1992).

Nos últimos anos os avanços alcançados na área de biologia molecular possibilitaram aos entomólogos o emprego de um conjunto de técnicas que aumentaram significativamente o grau de resolução de estudos, por exemplo, nas áreas da taxonomia e ecologia de insetos (LOXDALE; LUSHAI, 1998). Nesta direção, a técnica de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (WILLIAMS et al., 1990) foi utilizada com sucesso para separar populações de *Ostrinia nubilalis* (Hübner) com base em diferenças moleculares associadas a distintos padrões de voltinismo (PORKULWAT et al., 1998). Por sua vez, o fluxo gênico e a similaridade genética existente entre populações de *Papilio machaon* (L.) foram avaliados mediante o uso de eletroforese de aloenzimas a marcadores RAPD (HOOLE, JOYCE; PULLIN, 1999). Nesta mesma direção, marcadores RAPD foram utilizados para avaliar a variabilidade genética a fluxo gênico entre populações de *Cochiliomyia hominivorax* (Coquerel) (INFANTE-MALACHIAS; YOTOKO; AZEREDO SPIN, 1999; SKODA; PORKULWAT; FOSTER, 2002). Por sua vez, a associação de pulgões a plantas hospedeiras tem sido amplamente explorada com o uso de marcadores RAPD (BLACK, et al., 1992; FIGUEROA; LOYAYZA-MURO; NIEMEYER, 2002; LUSHAI; MARKOVITCH; LOXDALE, 2002; HALLDORSON et al., 2004). No Brasil a técnica RAPD foi recentemente utilizada para avaliar a similaridade genética ente biótipos do pulgão *Schizaphis graminum* (Rodani) (LOPES-DASILVA; TONET; VIEIRA, 2004) e para estimar a diferenciação molecular entre populações do percevejo *Euchistus heros* (Fabricius) (SOSA-GOMEZ et al., 2004) e da lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (SOSA-GOMEZ, 2004).

No Brasil, *S. frugiperda* é prontamente reconhecida como a principal praga da cultura do milho (CRUZ, 1995; SENA JÚNIOR et al., 2003). Entretanto, a ocorrência de ataques severos deste inseto tem sido detectada, pelo menos nos últimos anos, na cultura do algodão. O aumento recente registrado na intensidade de ataques de *S. frugiperda*, particularmente na região Centro-Oeste do Brasil, pode estar associado à expansão e intensificação dos cultivos das culturas do algodão e milho. Neste contexto, muito embora *S. frugiperda* seja reconhecida como uma das pragas de maior relevância para o MIP (Manejo Integrado de Pragas) nas culturas do milho e

algodão, não existem informações suficientes sobre a organização da variabilidade molecular de populações desta praga. Os poucos resultados de pesquisa se concentram em estudar a variabilidade por meio de marcadores moleculares em populações de *S. frugiperda* pertencentes às raças associadas às plantas de milho e arroz no estado do Rio Grande do Sul (BUSATO et al., 2004). Entretanto, ao se analisar a literatura que classifica de modo consistente as populações de *S. frugiperda* que atacam algodão e milho como pertencentes à mesma raça (Raça C), e a ocorrência da sobreposição espacial e temporal das áreas de cultivo em muitas das regiões do Brasil, torna plausível a hipótese de existência de comunicação genética entre as populações desta praga que atacam estas culturas.

Neste trabalho, a técnica de RAPD foi utilizada com o objetivo de testar a hipótese de que não há variabilidade molecular entre populações de *S. frugiperda* coletadas nas culturas do algodão e milho no Brasil. Para tanto, foi avaliada a similaridade genética entre populações de *S. frugiperda* coletadas no algodão e no milho em diferentes regiões geográficas do Brasil.

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Material e Métodos

3.2.1.1 Coleta das populações de *Spodoptera frugiperda*

As lagartas de *S. frugiperda* coletadas no campo foram criadas em dieta artificial no Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas (USP/ESALQ). Adultos da geração F1 de laboratório foram conservados em freezer à -80°C até o momento da extração do DNA. As etapas de extração do DNA e o protocolo de RAPD foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas (USP/ESALQ) coordenado pelo Prof. Márcio de Castro Silva-Filho.

3.2.1.2 Extração e quantificação do DNA genômico

Para a extração do DNA foi utilizado o método CTAB (*N-cetyl-N, N, N-trimethylammonium bromide*) conforme descrito por Boyce; Zwick e Aquadro (1989) com algumas modificações. O tórax de cada inseto foi isolado do restante do corpo e transferido para um tubo

tipo Eppendorf de 1,5 mL que continha 500 μ L do tampão de extração (1M Tris-HCl pH 8,0; 5M NaCl; 500 mM EDTA pH 8,0; 2% (p/v) de CTAB, aquecido a 65°C em banho-maria, ao qual foi adicionado 0,2% (v/v) de β -mercaptoetanol. Em seguida, o material foi homogeneizado com o auxílio de uma ponteira plástica autoclavada. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 45 minutos e cuidadosamente invertidos a cada 10 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a $10.000 \times g$ (Hettich Zentrifugen, Mikro 22 R, Tuttlingen, Alemanha) por 15 segundos à temperatura ambiente. Após a centrifugação, foram transferidos 200 μ L da fase aquosa ou sobrenadante, para um novo tubo do tipo Eppendorf de 1,5 mL que foi acondicionado em caixa de isopor contendo gelo. Foram então adicionados 300 μ L do tampão de extração aos tubos contendo o material inicialmente homogeneizado. Estes tubos contendo as amostras foram mantidos por 10 minutos em banho-maria a 65°C e centrifugados a $5.000 \times g$ por 10 minutos à temperatura ambiente. Assim, foram recuperados em média 500 μ L da fase aquosa, contendo o DNA. Este volume foi transferido e adicionado à fase aquosa anteriormente retirada após a primeira centrifugação. Para a etapa de extração do material genético foram adicionados 700 μ L de uma mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) (v/v) (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) aos tubos contendo a fase aquosa. A homogeneização das fases foi realizada através de inversão constante dos tubos por 10 minutos. Os tubos foram então centrifugados a $2.700 \times g$ por 10 minutos à temperatura ambiente, e o novo sobrenadante foi transferido para um novo tubo do tipo Eppendorf de 1,5 mL. A precipitação do DNA foi realizada através da adição de 500 μ L de isopropanol (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), e com a inversão cuidadosa dos tubos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a $10.000 \times g$ por 20 minutos a temperatura ambiente. Ao fim deste processo, o *pellet* de DNA foi visualizado no fundo do tubo e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* de DNA foi então lavado com a adição de 500 μ L de etanol 70% (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) e centrifugados a $10.000 \times g$ por 2 minutos a temperatura ambiente. O etanol foi descartado e o DNA ressuscitado em 30 μ L de água Mill-Q autoclavada. As amostras de DNA foram quantificadas através de um fluorômetro Dyna 200 (Hofner Scientific Instruments, San Francisco, Califórnia, EUA). O DNA quantificado de 10 indivíduos de *S. frugiperda* foi utilizado para formação de *pools* de cada uma das populações da praga. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento do uso.

População	Hospedeiro	Estado	Município	Longitude	Latitude	Data de coleta
BA-1	Algodão	Bahia	Barreiras	44° 59' 24'' O	12° 09' 10'' S	Maio / 2003
BA-2	Milho					
GO-1	Algodão	Goiás	Santa Helena de Goiás	50° 35' 49'' O	17° 48' 49'' S	Março / 2003
GO-2	Milho		Rio Verde	50° 55' 41'' O	17° 47' 53'' S	Abril / 2003
MG-1	Algodão	Minas Gerais	Unai	46° 54' 22'' O	16° 21' 27'' S	Abril / 2003
MG-2	Milho					Julho / 2003
SP-1	Milho	São Paulo	Guaíra	48° 18' 38'' O	20° 19' 06'' S	Abril / 2003
PR-1	Milho	Paraná	Cascavel	53° 27' 19'' O	24° 57' 21'' S	Abril / 2003
MT-1	Milho	Mato Grosso	Rondonópolis	54° 38' 08'' O	16° 28' 15'' S	Março / 2003
MS-1	Milho	Mato Grosso do Sul	Chapadão do Sul	52° 37' 22'' O	18° 47' 39'' S	Março / 2003

Quadro 3.1 - Identificação das populações de *Spodoptera frugiperda*, plantas hospedeiras e municípios amostrados, posição geográfica e data da coleta dos insetos no campo para estudo de similaridade genética através de marcadores RAPD

3.2.1.3 Procedimentos para RAPD

O perfil de temperatura e a duração das etapas da reação de PCR foram ajustados mediante os resultados obtidos com DNA de *S. frugiperda* tomando-se como referência o protocolo executado por Dowdy e McGaughey (1996). Os testes preliminares para a otimização das reações de PCR e a escolha dos oligonucleotídeos foram realizados com populações de *S. frugiperda* coletadas em regiões geográficas distintas. Os resultados foram visualizados em gel de agarose (1,5%) e documentados em transiluminador ultravioleta (Bio-Rad Fluor-S Multimager, Hercules, Califórnia, EUA). Os oligonucleotídeos utilizados no trabalho foram selecionados de acordo com a capacidade dos mesmos em produzir bandas polimórficas e reproduzíveis após a reação de amplificação do DNA. As reações de PCR foram preparadas obedecendo ao volume final de 25 µL e aproximadamente 20 ng de DNA genômico. As condições de amplificação por reação foram as seguintes 2,5 µL do tampão 10 × PCR, 0,25 µM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 µM dos oligonucleotídeos decâmeros (Operon Technologies, Alameda, EUA) , 1,5 U de *Taq* polimerase (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) . Além disso, cada reação foi coberta com duas gotas de óleo mineral para prevenir a evaporação. As reações foram realizadas em um termociclador PTC-100 (M.J. Research, Waltham, Massachusetts, EUA) programado para uma desnaturação inicial de 95°C por 5 min, seguido de 45 ciclos a 94°C por 1 min, 48°C por 1 min, 72°C por 2 min e uma etapa mais longa de elongação a 72°C por 10 min no passo final da programação.

Os produtos da amplificação por PCR foram separados em gel de agarose a 1,5% (p/v) em tampão TBE 0,5 ×. Os géis foram corados com brometo de etídio e a eletroforese realizada a 3,0 V/cm por 3,5 h para se assegurar a migração dos fragmentos de DNA amplificados e dos padrões de peso molecular. Após a eletroforese, os géis foram fotografados sobre luz ultravioleta.

3.2.1.4 Análise estatística dos marcadores RAPD

Na interpretação e análise dos géis, apenas as bandas mais visíveis e reproduzíveis foram selecionadas como marcadores moleculares. As bandas nos géis de agarose foram identificadas visualmente assinalando-se a presença (um) ou a ausência (zero) destes marcadores entre as diferentes populações de *S. frugiperda*. Deste modo, foi obtida uma matriz binária de valores um

e zero que relacionou a presença ou ausência dos marcadores nos diferentes “locos” selecionados e as populações da praga.

A matriz binária de valores um e zero foi utilizada para se estimar os índices de similaridade genética baseados nos coeficientes Simple Matching (SM) e Jaccard (Jac). O coeficiente médio de variação (CV) foi obtido após 1.000 re-amostragens pelo procedimento de *bootstrap* com o programa DBOOT, versão 1.1 (COELHO, 2001a). Em seguida, as matrizes de similaridade genética entre as populações de *S. frugiperda* foram utilizadas para construção de dendrogramas (SNEATH; SOKAL 1973) e, análise de componentes principais (PCOA) através do programa NTSYS 2.1 (ROHLF, 2000). O procedimento de *bootstrap* com 10.000 re-amostragens foi utilizado para avaliar o grau de confiança na topologia dos dendrogramas obtidos por meio do programa BOOD, versão 3.1 (COELHO, 2001b). A análise molecular de variância (AMOVA) foi realizada para avaliar a estrutura genética entre populações de *S. frugiperda* de acordo com Excoffier; Smouse; Quattro (1992) através do programa ARLEQUIN (SCHNEIDER; ROESSLI; EXCOFFIER, 2000).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Seleção dos oligonucleotídeos iniciadores

Os iniciadores com potencial de uso para análise das populações de *S. frugiperda* foram escolhidos a partir dos produtos de PCR obtidos de 20 oligonucleotídeos iniciadores. Foram identificados os oligonucleotídeos OPA-01, OPA-02, OPA-11, OPA-06, OPB-08, OPB-10, OPB-11, OPB-12, OPC-15 e OPE-02 para a análise da similaridade das populações de *S. frugiperda*. Estes iniciadores foram selecionados porque forneceram padrões de bandas reproduzíveis e consistentes.

As amplificações do DNA das amostras de *S. frugiperda* com os 10 iniciadores utilizados neste trabalho produziram um total de 208 marcas RAPD. Dentre essas marcas, 98,56% foram polimórficas (Tabela 3.1). O oligonucleotídeo OPA-12 forneceu o maior número de locos totais e polimórficos, enquanto o iniciador OPB-11 gerou o menor número de locos polimórficos (Tabela 3.1). De acordo com a taxa de decréscimo no valor de coeficiente de variação (Figura 3.1), as 208 marcas RAPD analisadas foram suficientes para a estabilidade dos dendrogramas. A partir de 208

marcas foi notado que o aumento no número de marcas RAPD, provavelmente não seria acompanhado de uma diminuição significativa nos valores de coeficiente de variação.

3.3.2 Similaridade genética das populações de *Spodoptera frugiperda*

A similaridade genética média entre as populações de *S. frugiperda* obtida pelo índice de Simple Matching foi de 0,66 e pelo índice de Jaccard foi de 0,25 (Tabela 3.2; Tabela 3.3). Nesse caso, as matrizes obtidas por ambos os métodos mostraram que MT-1 e MS-1 foram as populações com maior índice de similaridade genética. O dendrograma obtido através do método Simple Matching indicou com valor de *bootstrap* de 100% a existência de um ramo capaz de separar os insetos coletados na Bahia em milho e algodão das demais populações (Figura 3.2). Além disso, o dendrograma da matriz de similaridade estimada pelo método Simple Matching classificou as populações de *S. frugiperda* de acordo com as regiões geográficas de coleta dos insetos.

Entretanto, a classificação das populações a partir da matriz de similaridade genética que foi estimada pelo índice de Jaccard apresentou uma variação maior nos valores *bootstrap* que conferiram suporte aos nós do dendrograma (Figura 3.3). Os valores significativos de correlação cofenética mostraram que as classificações das populações de *S. frugiperda* pelos dendrogramas explicaram 75 e 72% dos resultados obtidos pelas matrizes de similaridade genética. Além disso, os dendrogramas não indicaram estruturação genética das populações vinculada às plantas hospedeiras nas quais os insetos foram coletados (Figuras 3.2 e 3.3). A análise de coordenadas principais (PCOA) que foi realizada com a matriz de similaridade genética obtida pelo índice Simple Matching reiterou o padrão de agrupamento das populações de *S. frugiperda* obtido pelos dendrogramas UPGMA (Figura 3.4).

A análise molecular de variância (AMOVA) a partir das 208 marcas RAPD revelou a existência de variabilidade molecular entre os cinco grupos de *S. frugiperda* previamente definidos. A AMOVA indicou que 18% da variabilidade molecular estavam localizados entre os grupos e 85% dentro dos grupos de populações de *S. frugiperda* ($p < 0,001$) (Tabela 3.4).

Tabela 3.1 - Sequência e padrão de polimorfismo dos oligonucleotídeos selecionados para análise de populações de *Spodoptera frugiperda* através de marcadores RAPD

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Número de locos obtidos	Número de locos polimórficos	Porcentagem de polimorfismo
OPA-01	CAGGCCCTTC	7	6	85,71
OPA-02	TGCCGAGCTG	13	12	92,30
OPA-11	CAATCGCCGT	32	31	96,88
OPB-06	TGCTCTGCCC	14	14	100,00
OPB-08	GTCCACACGG	28	28	100,00
OPB-10	CTGCTGGGAC	25	25	100,00
OPB-11	GTAGACCCGT	6	6	100,00
OPB-12	CCTTGACGCA	43	43	100,00
OPC-15	GACGGATCAG	10	10	100,00
OPE-02	GGTGCGGGAA	30	30	100,00

Figura 3.1 - Variância nas amostras de *Spodoptera frugiperda* a partir do procedimento de *bootstrap* após 1.000 re-amostragens, ilustrando a relação entre o coeficiente médio de variação e o número de marcadores RAPD avaliados pelo método Simple Matching

Tabela 3.2 - Matriz de similaridade genética entre as populações de *Spodoptera frugiperda* obtida através de marcadores RAPD após aplicação do índice de Simple Matching

População	BA-1	BA-2	GO-1	GO-2	MG-1	MG-2	SP-1	PR-1	MT-1	MS-1
BA-1	1,00									
BA-2	0,69	1,00								
GO-1	0,66	0,63	1,00							
GO-2	0,63	0,60	0,72	1,00						
MG-1	0,60	0,56	0,70	0,61	1,00					
MG-2	0,63	0,57	0,68	0,60	0,65	1,00				
SP-1	0,62	0,59	0,70	0,64	0,65	0,64	1,00			
PR-1	0,63	0,66	0,68	0,65	0,61	0,67	0,73	1,00		
MT-1	0,64	0,57	0,72	0,63	0,65	0,61	0,72	0,68	1,00	
MS-1	0,65	0,57	0,68	0,62	0,66	0,62	0,69	0,67	0,76	1,00

Tabela 3.3 - Matriz de similaridade genética entre as populações de *Spodoptera frugiperda* obtida através de marcadores RAPD após aplicação do índice de Jaccard

População	BA-1	BA-2	GO-1	GO-2	MG-1	MG-2	SP-1	PR-1	MT-1	MS-1
BA-1	1,00									
BA-2	0,36	1,00								
GO-1	0,23	0,20	1,00							
GO-2	0,22	0,21	0,25	1,00						
MG-1	0,23	0,19	0,27	0,17	1,00					
MG-2	0,22	0,15	0,20	0,11	0,24	1,00				
SP-1	0,20	0,18	0,22	0,18	0,23	0,19	1,00			
PR-1	0,20	0,24	0,15	0,13	0,15	0,19	0,26	1,00		
MT-1	0,23	0,16	0,25	0,12	0,24	0,16	0,26	0,18	1,00	
MS-1	0,25	0,16	0,20	0,16	0,25	0,16	0,22	0,19	0,38	1,00

Figura 3.2 - Dendrograma com o padrão de similaridade genética para as populações de *Spodoptera frugiperda* obtido pelo método UPGMA a partir de matriz estimada pelo índice de Simple Matching através de marcadores RAPD. Correlação cofenética = 0,75

Figura 3.3 - Dendrograma com o padrão de similaridade genética para as populações de *Spodoptera frugiperda* obtido pelo método UPGMA a partir de matriz estimada pelo índice de Jaccard através de marcadores RAPD. Correlação cofenética = 0,72

Figura 3.4 - Relações entre as populações de *Spodoptera frugiperda* estimada através da análise de coordenadas principais (PCOA)

Tabela 3.4 - Resultados da análise molecular da variância (AMOVA) entre e dentro de grupos de populações de *Spodoptera frugiperda* a partir de dados obtidos com marcadores RAPD

Fonte de variação	GL	S.Q.	Porcentagem da variação total
Entre grupos	4	158,90	18,36 ***
Dentro de grupos	5	137,00	81,64 ***
Total	9	295,90	

$\phi_{RT}^* 0,18$

*** $P < 0,001$

O uso do marcador molecular RAPD permitiu a obtenção de informações preliminares sobre a organização da variabilidade molecular nas populações brasileiras de *S. frugiperda*. O número de marcadores analisados (208) foi suficiente para a estabilidade dos dendrogramas UPGMA, uma vez que a taxa de decréscimo no valor de coeficiente de variação seria mínima mesmo com o aumento no número de marcas RAPD analisadas. Os dendrogramas UPGMA que foram estimados a partir das matrizes de similaridade genéticas geradas pelos índices de Simple Matching e Jaccard devem ser comparados com cautela, já que estes índices utilizam diferentes algoritmos para a estimativa de seus respectivos parâmetros. Todavia, as populações de *S. frugiperda* foram classificadas de modo similar nos dendrogramas gerados a partir dos índices de similaridade genética (Figuras 3.2 e 3.3).

Em nenhum dos dendrogramas obtidos foi detectado um ramo capaz de separar as populações de *S. frugiperda* em grupos distintos associados às culturas do algodão ou do milho. A ausência desses dois grupos de insetos indicou que as populações coletadas em algodão e milho eram proximamente relacionadas. As diferenças genéticas deferentes populações podem evoluir desde que as adaptações fisiológicas de um inseto para um determinado hospedeiro acarretarem diminuição de desempenho ou valor adaptativo deste inseto num hospedeiro alternativo (GOULD, 1979; VIA, 1991; BUSATO et al., 2002; IKONEN et al., 2003).

A existência de raças simpátricas de *S. frugiperda* associadas a plantas hospedeiras foi inicialmente identificada por Pashley; Johnson e Sparks (1985) através da técnica de eletroforese de isoenzimas. De acordo com estes autores, a raça arroz de *S. frugiperda* associada a plantas de arroz e *Cynodon dactylon* (grama seda), enquanto a raça milho ocorre em plantas de milho e algodão no Hemisfério Norte. Posteriormente, McMichel e Prowell (1999) e Busato et al. (2004) separaram molecularmente as raças milho e arroz utilizando marcadores AFLP. De acordo com aqueles autores, trabalhos preliminares com marcadores RAPD não foram convenientes para a separação dessas raças de *S. frugiperda*. Entretanto, com base na estabilidade dos dendrogramas e na taxa de decréscimo do coeficiente de variação, concluiu-se que o número de marcas RAPD utilizadas no presente estudo foi suficiente para a análise das populações de *S. frugiperda* coletadas na cultura do milho e algodão no Brasil. De modo geral, os dendrogramas classificaram as populações de *S. frugiperda* de acordo com a região de coleta dos insetos. A análise de coordenadas principais reforçou esta tendência de agrupamento das populações. No entanto, a classificação das populações com base na variabilidade molecular acessada pelos marcadores

RAPD foi muito parecida com a classificação de populações desta praga coletadas nas mesmas regiões com base na sobrevivência dos insetos a doses diagnósticas do inseticida deltametrina (Capítulo 2). Este tipo de resultado já havia sido encontrado por Suinaga et al. (2004). Estes autores observaram que a classificação de populações da traça do tomateiro, *Tuta absoluta*, através de marcadores neutros do tipo AFLP se sobrepôs com a classificação das mesmas populações desta praga com base em diferenças na resposta a inseticidas realizada por Siqueira; Guedes e Picanço, 2000ab.

Aproximadamente 18% da variação molecular foram encontrados entre os cinco grupos formados com as 10 populações de *S. frugiperda* e 82% foi vinculada à variação dentro desses grupos (Tabela 3.4). Essa percentagem de variação entre grupos de insetos separados geograficamente sugeriu a ocorrência de fatores que favorecem a estruturação das populações de *S. frugiperda* originais de regiões distintas. Neste sentido, o valor de *bootstrap* de 100% de suporte à separação das populações de *S. frugiperda* coletadas em algodão e milho na Bahia (BA-1 e BA-2) encontrado na Figura 3.3, reforça a sugestão da existência de fluxo gênico limitado entre os diferentes grupos de populações de *S. frugiperda* no Brasil. O grupo de insetos coletados no estado da Bahia foi responsável pela maior contribuição para o nível de variação molecular encontrado nesse estudo. Entretanto, a validação dos resultados com marcadores moleculares direcionados ao entendimento da organização da variabilidade e da estrutura genética de populações de insetos é dependente de observações ecológicas referentes ao comportamento de vôo e à capacidade de dispersão da espécie (SOSA-GOMEZ et al. 2004).

A área cultivada com algodão tem crescido significativamente nos últimos anos na região Central do Brasil. Frequentemente, as lavouras de algodão são instaladas nessas localidades em áreas adjacentes ou inclusive em seqüência à cultura do milho. Assim, há uma elevada probabilidade de que a proximidade física e temporal das culturas de algodão e milho tenha contribuído para a intensificação dos ataques de *S. frugiperda* recentemente registrados no Brasil.

Os dados obtidos através de marcadores RAPD sugeriram a existência de níveis consideráveis de fluxo gênico entre populações de *S. frugiperda* que ocorrem nas culturas do milho e algodão. Essas evidências são extremamente importantes uma vez que *S. frugiperda* é amplamente conhecida por ocorrer em infestações críticas e danosas nas culturas do milho e algodão. Com a recente aprovação do uso comercial de plantas geneticamente modificadas (GM) resistentes ao ataque de insetos da ordem Lepidoptera no Brasil, o conhecimento gerado nesse

trabalho é particularmente importante para o delineamento das estratégias de manejo da resistência a toxinas expressas em plantas de milho e algodão Bt num mesmo agroecossistema (WU; FENG; GUO, 2004). De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, o movimento de adultos de *S. frugiperda* entre as culturas de milho e algodão deve ser prioritariamente considerado diante da liberação comercial de plantios de plantas geneticamente modificadas resistentes a insetos numa região geográfica. Portanto, há a necessidade de que marcadores moleculares apropriados sejam desenvolvidos para a estimativa da taxa de fluxo gênico entre populações de *S. frugiperda* que atacam as diferentes culturas agrícolas e plantas hospedeiras selvagens nas diferentes regiões do Brasil ao longo do tempo.

3.4 Conclusões

Com base nos marcadores RAPD avaliados, pode-se concluir que:

- Há variabilidade genética entre as populações de *S. frugiperda* coletadas em diferentes regiões geográficas no Brasil;
- Não há separação molecular entre populações de *S. frugiperda* coletadas na cultura do milho e algodão em uma determinada região geográfica.

Referências

BLACK, W.C. (IV); DuTEAU, N.M.; PUTERKA, G.J.; NECHOLS, J.R.; PETTRONI, J.M. Use of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphism in aphids (Homoptera: Aphididae). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 82, p. 151-159, 1992.

BOYCE, T.M.; ZWICK, M.E.; AQUADRO, C.F. Mitochondrial DNA in the pine weevil: size, structure and heteroplasmy. **Genetics**, Dordrecht, v. 123, p. 825-836, 1999.

BUSATO, G.R.; GRUTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S.; GIOLO, F.P.; MARTINS, A.F. Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, nas culturas do milho e arroz irrigado. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, p. 525-529, 2002.

BUSATO, G.R.; GRUTZMACHER, A.D.; OLIVEIRA, A.C.; VIEIRA, E.A.; ZIMMER, P.D.; KOPP, M. M.; BANDEIRA, J.M.; MAGALHÃES, T.R. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas do milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, p. 709-716, 2004.

CAPRIO, M.A.; TABASHNIK, B.E. Gene flow accelerates local adaptation among finite populations: simulating the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, p. 611-620, 1992.

COELHO, A.S.G. **BOOD-P**: avaliação de dendogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap; versão 3.0. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, 2001a.

COELHO, A.S.G. **DBOOT**: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores; versão 1.1. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, 2001b.

CORTEZ, M.G.R.; WAQUIL, J.M. Influência de cultivar e nível de infestação de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) no rendimento do sorgo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 26, p. 407-410, 1997.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho do milho**. Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1995. 45p. (Circular técnica, 21).

CRUZ, I.; TURPIN, F.T. Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estádios de crescimento da cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 355-359, 1982.

DIEZ-RODRIGUEZ, G.I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 311-316, 2001.

DOWDY, A.K.; MCGAUGHEY, W.H. Using random amplified polymorphic DNA to differentiate strains of the Indian meal moth (Lepidoptera: Pyralidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 25, p. 396-400, 1996.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Dordrecht, v. 131, p. 479-491, 1999.

FIGUEROA, C.C.; LOYAYZA-MURO, R.; NIEMEYER, H.M. Temporal variation of RAPD-PCR phenotype composition of the grain aphid *Sitobion avenae* (Hemiptera: Aphididae) on wheat: the role of hydroxamic acids. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 91, p. 148-156, 2002.

GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, p. 319-323, 1997a.

GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Operational influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, p. 653-658, 1977b.

GOULD, F. Rapid host range evolution in a population of the phytophagous mite *Tetranychus urticae* Koch. **Evolution**, Lancaster, v. 33, p. 791-802, 1979.

HALLDÓRSSON, G.; SIGURDSSON, A.E.; THÓRSSON, T.H.; ODDSDÓTTIR, E.S., SIURGEIRSSON, A.; ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K. Genetic diversity of the green spruce aphid (*Elatobium abietinum* Walker) in north-west Europe. **Agricultural and Forest Entomology**, London, v. 6, p. 31-37, 2004.

HOOLE, J.C.; JOYCE, D.A.; PULLIN, A.S. Estimates of gene flow between populations of the swallowtail butterfly, *Papilio machaon* in Broadland, UK and implications for conservation. **Biological Conservation**, Essex, v. 89, p. 293-299, 1999.

IKONEN, A.; SIPURA, M.; MIETTINEN, S.; TAHVANAINEN, J. Evidence for host race formation in the leaf beetle *Galerucella lineola*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 108, p. 179-185, 2003.

INFANTE-MALACHIAS, M.E.; YOTOKO, K.S.C.; AZEREDO SPIN, A.M.L. Random amplified polymorphic DNA of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) from southeastern Brazil and northern Argentina. **Genome**, Ottawa, v. 139, p. 1371-1382, 1999.

LOXDALE, H.D.; LUSHAI, G. Molecular markers in entomology. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 88, p. 577-600, 1998.

LOPES-DA-SILVA, M.; TONET, G.E.L.; VIEIRA, L.G.E. Characterization and genetic relationships among Brazilian biotypes of *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae) using RAPD markers. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, p.43-49, 2004.

LUSHAI, G.; MARKOVITCH, O.; LOXDALE, H.D. Host-based genotype variation in insects revised. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 92, p. 159-164, 2002.

McMICHAEL, M.; PROWELL, DP. Differences in amplified fragment-length polymorphisms in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. **Annals of Entomological Society of America**, Coumbus, v. 92, p. 175-181, 1994.

MÉNDEZ, W.A.; VALLE, J.; IBARRA, J.E.; CISNEROS, J.; PENAGOS, D.I.; WILLIAMS, T. Spinosad and nucleopolyhedrovirus mixtures for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. **Biological Control**, Orlando, v. 25, p. 195-206, 2002.

PASHLEY, D.P. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex? **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 79, p. 898-904, 1986.

PASHLEY, D.P.; HAMMOND, A.M; HARDY, T.N. Reproductive isolating mechanisms in fall armyworm host strains. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 85, p. 400-405, 1992.

PASHLEY, D.P.; JOHNSON, S.J; SPARKS, A.N. Genetic population structure of migratory moths: the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 78, p. 756-762, 1985.

PORNKULWAT, S.; SKODA, S.R.; THOMAS, G.D.; FOSTER, J.E. Random amplified polymorphic DNA used to identify genetic variation in ecotypes of the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 91, p. 719-725, 1998.

ROHLF, F.J. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1, Cwner's Manual. New York, 2000. 470p.

ROUSH, R.T.; DALY, J.C. The role of population genetics in resistance research and management. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**. New York: Chapman and Hall, 1990. p. 97-152.

ROUSH, R.T.; McKENZIE, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 32, p. 361-380, 1987.

SCHNEIDER, S., KUEFFER, J. M, ROESSLI, D. ;EXCOFFIER, L. **ARLEQUIN version 2.0.:** a software for population genetic data analysis. Geneva: University of Geneva, Genetic and Biometry Laboratory, 2000.

SENA JÚNIOR, D.G.; PINTO, F.A.C.; GOMIDE, R.L.; TEIXEIRA, M.M. Avaliação de métodos automáticos de limiarização para imagens de plantas de milho atacadas por *Spodoptera frugiperda*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 7, p. 359-366, 2003.

SIQUEIRA, H.A.A.; GUEDES, R.N.C.; PICANÇO, M.C. Cartap resistance and synergism in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 124, p. 147-233-238, 2000a.

SIQUEIRA, H.A.A.; GUEDES, R.N.C.; PICANÇO, M.C. Insecticide resistance in populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Agricultural and Forest Entomology**, London, v. 2, p. 147-153, 2000b.

SKODA, S.R.; PORNKULWAT, S.; FOSTER, J.E. Random amplified polymorphic DNA markers for discriminating *Cochliomyia hominivorax* from *C. macellaria* (Diptera: Calliphoridae). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 92, p. 89-96, 2002.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy:** the principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573 p.

SOSA-GOMEZ, D. R. Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hubner, and 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, p. 378-384, 2004.

SOSA-GOMEZ, D.R.; DELPIN. K.T.; ALVARO, M.R.; ALMEIDA, A.M.R.; HIROSE, E. Genetic differentiation among Brazilian populations of *Euchistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) based on RAPD analysis. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, p. 179-187, 2004.

SUINAGA, F.A.; CASALI, V.W.D.; PIKANÇO, M.; FOSTER, J.E. Genetic divergence among tomato leafminer populations base don AFLP analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p. 645-651, 2004.

TABASHNIK, B.E. Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with backcross experiments. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 38, p. 25-326, 1991.

VIA, S. The genetic structure of the of the host plant adaptation in a spatial patchwork: Demographic variability among reciprocally transplanted pea aphid clones. **Evolution**, Lancaster, v. 45, p. 827-852, 1991.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELICK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFASKI, J.A.; TINGEY, S.W. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Research**, New York, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WU, K.; FENG, H.; GUO, Y. Evaluation of maize as a refuge for management of resistance to Bt cotton by *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) (Hubner) in the yellow river cotton-farming region in China. **Crop Protection**, Guildford, v. 23, p. 523-530, 2004.

YU, S.J. Insecticide resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 39, p. 94-91, 1991.

YU, S.J. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, p. 675-682, 1992.

YU, S.J. Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 84, p. 135-142, 2006

YU, S.J.; NGUYEN, S.N.; ABO-ELGHAR, G.E. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Bichemistry and Phisiology**, San Diego, v. 77,p. 1-11, 2003.

4 ESTRUTURA GENÉTICA E VARIABILIDADE MOLECULAR EM POPULAÇÕES DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) DO BRASIL AVALIADAS ATRAVÉS DE MARCADORES AFLP

Resumo

Estrutura genética e variabilidade molecular em populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) do Brasil avaliadas através de marcadores AFLP

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a similaridade e a estrutura genética de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) coletadas nas culturas do algodão e do milho no Brasil através da técnica de AFLP. Além disso, as populações de *S. frugiperda* coletadas no Brasil foram comparadas com insetos coletados na Argentina, e populações do México e dos Estados Unidos foram adicionadas nas análises como grupo externos. Os resultados indicaram que as 119 marcas AFLP analisadas explicaram 82% da variação molecular total existente entre as populações da praga. A similaridade genética média detectada entre as populações de *S. frugiperda* foi de 0,45 de acordo com estimativa pelo índice de Jaccard. Os dendrogramas não separaram as populações de *S. frugiperda* em grupos relacionados às plantas nas quais os insetos foram coletados. Foi detectada alguma variação genética entre as populações da praga que pode ser atribuída à origem geográfica dos insetos. Não foi detectada correlação significativa entre a dissimilaridade genética e distância geográfica para as populações testadas. A análise molecular de variância indicou que (7%) da variação genética total poderia ser atribuído à divisão das populações de *S. frugiperda* nos grupos Brasil e Argentina. Além disso, foi detectado 0% de variação genética e um valor de fluxo gênico de $N_m=1,58$ entre o grupo de populações de *S. frugiperda* que foram coletados na cultura algodão e o grupo coletado na cultura do milho no Brasil. Assim, as infestações de *S. frugiperda* que ocorrem milho e algodão devem ser consideradas como subunidades potencialmente intercrucantes de uma mesma população. Estes resultados indicaram que a contribuição de infestações de insetos imigrantes das culturas de algodão e milho devem ser cuidadosamente consideradas no delineamento de programas de manejo de *S. frugiperda* no Brasil.

Palavras-chaves: marcadores moleculares, fluxo gênico, manejo integrado de pragas

Abstract

Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Brazil evaluated by AFLP markers

The objective of this research was to evaluate the genetic similarity and structure of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) populations collected from cotton and maize and fields in Brazil. Populations of *S. frugiperda* collected in Brazil were compared to the ones collected in Argentina. Furthermore, populations from Mexico and United States of America were added into the analysis as outgroups. A total of 119 AFLP markers were analyzed and explained 82% of the total molecular variation. The mean genetic similarity was 0.45 by the Jaccard algorithm. The dendrograms did not classify the populations of *S. frugiperda* into clusters related to the host plant in which the insects were collected. No significant correlation was detected between genetic

dissimilarity and geographical distances. It has been observed some genetic variation attributed to the geography. The analysis of molecular variance pointed out that 7% of the total molecular variation could be attributed to the division of the *S. frugiperda* populations into Brazilian and Argentine groups. Also, there has been found 0% of variation and a gene flow of $Nm=1.58$ between the group of *S. frugiperda* populations collected at cotton and the group collected at maize fields in Brazil. Thus, populations of *S. frugiperda* infest that infest the cotton and maize crops are the same. These results suggested that the contribution of *S. frugiperda* immigrants from maize and cotton fields should be carefully considered in designing insect management programs in Brazil.

Keywords: molecular markers, gene flow, integrated pest management

4.1 Introdução

A evolução da resistência a inseticidas tem sido identificada mundialmente como uma das mais sérias ameaças ao desenvolvimento e manutenção de práticas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) (LABBE et al., 2005). O desenvolvimento da resistência é um processo evolutivo (DOBZHANSKY, 1951) e multidisciplinar, que é influenciado pela interação de diversos fatores tais como a frequência inicial do alelo de resistência, grau de dominância da resistência, valor adaptativo relativo dos diferentes genótipos, práticas de manejo entre outros (GEORGHIOU, 1983; GEORGHIOU; TAYLOR, 1977ab). Além disso, a variação no espaço e no tempo da estrutura genética da população de uma praga, juntamente com o fluxo gênico entre as suas subpopulações, tem grande influência sobre a taxa de evolução da resistência (DALY, 1993; HOY, 1998).

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) é uma praga migratória e endêmica no Hemisfério Ocidental. O principal hospedeiro desta praga é o milho (*Zea mays* L.), que tem sido atacado em níveis variáveis em regiões tropicais e subtropicais da América Latina (MOLINA-OCHOA et al. 2003). A elevada capacidade de dispersão dos adultos dessa praga permite que este inseto se dissemine rapidamente ao longo da faixa de distribuição de suas plantas hospedeiras (SPARKS, 1979). Além disso, *S. frugiperda* apresenta comportamento alimentar polífago que inclui o consumo de diferentes plantas cultivadas além do milho, tais como, o algodão e o arroz (YU; NGUYEN; ABO-ELGHAR, 2003). Raças de *S. frugiperda* associadas a plantas hospedeiras foram identificadas nos EUA (McMICHAEL; PROWELL, 1999; LEVY; GARCIA-MARUNIAK; MARUNIAK, 2002; MEAGHER; NAGOSHI, 2004) e também no Brasil

(BUSATO et al., 2002; BUSATO et al., 2004). Devido ao uso excessivo de inseticidas para o controle desta praga, já foram identificadas de populações de *S. frugiperda* resistentes a diferentes classes de inseticidas (DIEZ-RODRIGUEZ; OMOTO, 2001; YU, 1991, 1992, 2006).

A estrutura genética das populações dos insetos descreve como estas populações se dividem em menores unidades finitas de acasalamento (ROUSH; DALY, 1990). A formação destas unidades pode ser explicada pela atuação da seleção natural local, padrões de seleção para acasalamento e fluxo gênico (McKENZIE, 1996). Desse modo, o entendimento da estrutura genética e do nível intra-específico de fluxo gênico entre populações de uma praga é essencial para o delineamento de práticas de manejo para retardar a evolução da resistência a qualquer tática de controle de insetos (TABASHNIK, 1991; CAPRIO; TABASHNIK, 1992). Por sua vez, a estimativa do fluxo gênico é bastante difícil, mas tem sido realizada a partir do uso de marcadores genéticos, e funcionado como um índice para conhecimento das taxas de dispersão entre diferentes populações de insetos (SLATKIN, 1985; RODERICK, 1996). Tem sido crescente o número de trabalhos com o uso diferentes tipos de marcadores moleculares para se estudar aspectos tais como a similaridade, a estrutura genética e o fluxo gênico dentro e entre grupos de populações de diferentes organismos (KOSMAN; LEONARD, 2005), com recentes aplicações no estudo de populações de insetos de importância econômica (DE BARRO, 2005; ENDERSBY et al., 2006).

Dentre as diferentes classes e tipos de marcadores moleculares existentes (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996), a técnica do AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (VOS et al., 1995) tem sido bastante utilizada na entomologia. A técnica do AFLP foi empregada na análise da variação genética entre populações de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (GÖÇMEN; DEVRAN, 2002), para estimativa da similaridade genética entre biótipos de *B. tabaci* (CERVERA et al., 2000) e para a detecção da diversidade genética entre populações de *B. tabaci* na China (ZHANG et al., 2005). Além disso, o AFLP também foi utilizado para avaliar a estrutura genética dos gafanhotos *Clorthippus bruneus* (Thunberg) e *C. jacobsi* Harz (TATSUTA; BUTLIN, 2001), e de lepidópteros do gênero *Pieris* (TAKAMI et al., 2004). No Brasil, a técnica do AFLP já foi utilizada para estudo de diversidade genética entre populações de traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* (Meyrick) (SUINAGA et al., 2004) e, entre as raças de *S. frugiperda* associadas às plantas de arroz e milho (BUSATO et al., 2004).

No Brasil, *S. frugiperda* é conhecida como o inseto praga mais destrutivo e, portanto de maior importância no manejo da cultura do milho (CRUZ, 1995; SENA et al., 2003). No entanto, nos últimos anos, esta praga tem ocorrido em elevadas infestações e causando dano econômico na cultura do algodão no Brasil. Todavia, não existem dados sobre o impacto dos cultivos de algodão e milho na organização da variabilidade e na estrutura genética de populações de *S. frugiperda* no Brasil.

Apesar da escassez de dados sobre a genética de populações de *S. frugiperda* no Brasil, nos últimos anos houve um aumento na necessidade de obtenção dessas informações em uma escala geográfica maior devido à participação cada vez mais efetiva de países como a Argentina no agronegócio brasileiro, e à tendência de adoção de táticas cada vez mais similares para o manejo de *S. frugiperda* nesses dois países. Na Argentina, *S. frugiperda* foi considerada uma praga nacional em 1988, sendo posicionada como o inseto mais limitante ao cultivo de milho na região nordeste daquele país (BERRETA; RIOS; DE CAP, 1998). Deste modo, há necessidade de que seja explorada a relevância de diferentes populações de *S. frugiperda* na estrutura genética desta importante praga agrícola no contexto Brasil e Argentina.

O objetivo deste trabalho foi testar as seguintes hipóteses (a) não há variabilidade molecular entre as populações de *S. frugiperda* coletadas no Brasil e na Argentina, e (b) no Brasil, os indivíduos de *S. frugiperda* coletado nas culturas do algodão e do milho são pertencentes à mesma população de insetos.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Material e Métodos

4.2.1.1 Coleta das populações de *Spodoptera frugiperda*

Lagartas de *S. frugiperda* foram coletadas em plantas milho e ou de algodão em localidades no Brasil e na Argentina. Foram ainda utilizadas duas populações da praga coletadas nos Estados Unidos e México como grupos externos (Quadro 4.1). Os insetos coletados no campo foram mantidos em freezer à -80°C até o momento da extração do DNA.

População	País de coleta	Estado/Província	Planta hospedeira	Longitude	Latitude	Data de coleta
Mex	México	San Luis Potosi	Milho	100° 58' O	22° 09' N	Outubro/2002
BR1	Brasil	Minas Gerais	Milho	48° 09' O	18° 56' S	Novembro/2003
EUA	EUA	Flórida	Milho	82° 33' O	29° 65' N	Agosto//2004
ARG1	Argentina	Santa Fé	Milho	59° 40' O	29° 09' S	Março/2004
ARG2	Argentina	Santiago del Estero	Milho	63° 53' O	27° 55' S	Dezembro/2004
ARG3	Argentina	Chaco	Milho	60° 27' O	26° 48' S	Março/2004
ARG4	Argentina	Salta	Milho	64° 04' O	25° 18' S	Março/2004
BR2	Brasil	São Paulo	Milho	50° 32' O	20° 16' S	Março/2004
BR3	Brasil	Minas Gerais	Milho	46° 54' O	16° 21' S	Março/2004
BR4	Brasil	Bahia	Milho	44° 59' O	12° 06' S	Fevereiro/2004
BR5	Brasil	Goiás	Algodão	50° 55' O	17° 48' S	Março/2004
BR6	Brasil	Mato Grosso	Algodão	54° 17' O	15° 33' S	Março/2004
BR7	Brasil	Rio Grande do Sul	Milho	58° 48' O	29° 41' S	Março/2004

Quadro 4.1 - Identificação das populações de *Spodoptera frugiperda*, local de coleta e planta plantas hospedeiras nas quais os insetos foram amostrados e data da coleta no campo das diferentes amostras para estudo de estrutura e similaridade genética através de marcadores AFLP

4.2.1.2 Extração e quantificação do DNA genômico

Para a extração do DNA foi utilizado o método CTAB, conforme descrito por Boyce; Zwick e Aquadro, (1989) com algumas modificações. O DNA foi extraído de sete indivíduos adultos de *S. frugiperda* das populações coletadas no campo (Quadro 4.1). O tórax de cada inseto foi isolado do restante do corpo e transferido para um tubo do tipo Eppendorf de 1,5 mL que continha 500 µL do tampão de extração (1M Tris-HCl pH 8,0; 5M NaCl; 500 mM EDTA pH 8,0; 2% (p/v) de CTAB pré-aquecido, as quais foram adicionados 0,2% de β-mercaptoetanol (v/v).

Em seguida, o material foi homogeneizado com o auxílio de uma ponteira plástica autoclavada. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 65°C por 45 minutos e levemente invertidos a cada 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a $10.000 \times g$ (Hettich Zentrifugen, Mikro 22 R, Tuttlingen, Alemanha). Após a centrifugação, foram transferidos 200µL do sobrenadante, ou fase aquosa, para um novo tubo do tipo Eppendorf de 1,5 mL, o qual foi acondicionado em caixa de isopor contendo gelo. Foram então adicionados 300 µL do tampão de extração aos tubos contendo o material orgânico inicialmente homogeneizado. Estes tubos foram mantidos por 10 minutos em banho-maria a 65°C e centrifugados a $5.000 \times g$ por 10 minutos. Assim, foram recuperados em média mais 500 µL da fase aquosa, contendo o DNA, os quais foram transferidos e adicionados aos tubos que continham sobrenadante retirado após a primeira centrifugação.

Para a etapa de extração do material genético foram adicionados 700 µL de uma mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) (v/v) (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) aos tubos contendo a fase aquosa. A homogeneização das fases foi realizada através de inversão constante dos tubos por 10 minutos. Os tubos foram então centrifugados a $2.700 \times g$ por 10 minutos a temperatura ambiente, e o sobrenadante transferido para um novo tubo do tipo Eppendorf de 1,5 mL. A precipitação do DNA foi realizada através da adição de 500 µL de isopropanol (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil), e com a inversão cuidadosa dos tubos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a $10.000 \times g$ por 20 minutos a temperatura ambiente. Após este procedimento um *pellet* de DNA pode ser visualizado no fundo do tubo. O sobrenadante foi então descartado dos tubos e o *pellet* de DNA foi lavado com a adição de 500µL de etanol 70% (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) e centrifugado a $10.000 \times g$ por 2 minutos a temperatura ambiente. O etanol foi descartado e o DNA ressuspendido em 30 µL de água Mill-Q autoclavada. As amostras de DNA

foram quantificadas a partir de eletroforese em gel de agarose a 1% carregado também com padrão de peso molecular fago λ na concentração de 22.2 ng/ μ L. Em seguida, foi adicionado tampão TBE (1 $\times$) para a diluição das amostras de DNA até que estas atingissem a concentração de aproximadamente 22,2 ng/ μ L. Os géis de agarose foram corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz ultravioleta.

4.2.1.3 Método AFLP para análise das populações de *Spodoptera frugiperda*

Para a análise da variabilidade molecular e estrutura genética das populações de *S. frugiperda* pela técnica AFLP foi utilizado um protocolo modificado a partir de Vos et al. (1995). O protocolo de AFLP foi desenvolvido em três etapas básicas: 1) preparo das amostras mediante a digestão do DNA e ligação dos adaptadores; 2) amplificação pré-seletiva das amostras de DNA preparadas ou pré-amplificação; 3) amplificação seletiva das amostras de DNA pré-amplificadas.

4.2.1.3.1 Preparo das amostras através da digestão do DNA e ligação dos adaptadores

Foram conduzidas reações de digestão e restrição das amostras de *S. frugiperda* a partir de 155,5 ng de DNA previamente quantificado. As reações de digestão foram preparadas com o volume final de 5,5 μ L e continham 125 μ L do tampão “One-Phor-All” 10 $\times$ (GE Healthcare, Piscataway, New Jersey, EUA), 0,125 μ L da enzima *Mse*I na concentração de 10 U/ μ L (1,25U/reação), 0,0625 μ L da enzima *Eco*RI na concentração de 20 U/ μ L (1,25 U/reação), 0,125 μ L de uma solução de albumina de soro bovina (BSA) na concentração de 10 ng/mL (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, EUA), e 3,94 μ L de água Mill-Q. As reações de digestão do DNA foram incubadas por à 37°C por 2,5 h em um termociclador MJ Research PTC-200 Peltier (MJ Research, Waltham, Massachusetts, EUA).

Especificação	Seqüência
Adaptadores <i>Eco</i> R1	5' - CTCGTAGACTGCGTACC - 3' 3' - CATCTGACGCATGGTTAA - 5'
Iniciador <i>Eco</i> R1 da pré-amplificação	5' - GACTGCGTACCAATTC - 3'
Adaptadores <i>Mse</i> I	5' - GACGATGAGTCCTGAG - 3' 3' - TACTCAGGACTCAT - 5'
Iniciador <i>Mse</i> I da pré-amplificação	5' - GATGAGTCCTGAGTAAC - 3'

Quadro 4.2 – Seqüência dos adaptadores e iniciadores utilizados nas reações de ligação e pré-amplificação das amostras de *Spodoptera frugiperda*

Após a digestão, as amostras foram submetidas a um tratamento térmico por 15 minutos a 70°C para a inativação das enzimas de restrição presentes nas reações. Em seguida, foram adicionados 5 µL do *mix* de ligação dos adaptadores com 0,15 µL de T4 DNA ligase, 0,5 µL do tampão 10 × da T4 ligase (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, EUA), 0,5 µL do adaptador *EcoRI* (5 pmoles/µL), 0,5 µL do adaptador *MseI* (5 pmoles/µL) (Quadro 4.2) (Operon Technologies, Alameda, Califórnia, EUA), e 3,35 µL de água Mill-Q autoclavada a cada tubo contendo o produto da reação de digestão. As amostras foram então incubadas a 25°C por 10 h em um termociclador MJ Research PTC-200 Peltier. Após o período de incubação, as amostras foram diluídas através da adição de 135 µL de tampão TE 1 × (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH=8) por tubo contendo o produto da reação de ligação.

4.2.1.3.2 Pré-amplificação das amostras de *Spodoptera frugiperda*

As amostras foram pré-amplificadas em reações de PCR com volume final de 12 µL. Foram utilizados 1,25 µL do produto diluído da ligação dos adaptadores como DNA molde. As reações foram realizadas nas seguintes condições: 10 µL de AFLP Pre-amp Primer Mix II (Invitrogen, Carlsberg, Califórnia, EUA), 1,25 µL do tampão de PCR 10 ×, 0,75 µL de MgCl₂ (25 mM) e 0,25 µL de AmpliTaq DNA polimerase na concentração de 5 U/µL (1,25 U por reação) (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). As reações foram executadas em termociclador PTC-200 Peltier programado para realizar 20 ciclos de PCR de acordo com o seguinte protocolo: 94°C por 30 s, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto. Os iniciadores utilizados na pré-amplificação eram complementares aos sítios de restrição e ligação dos adaptadores. O iniciador *Mse I* continha um nucleotídeo seletivo (M + 1) e o iniciador *EcoRI* não continha nenhum nucleotídeo seletivo em sua sequência (E + 0) (Quadro 4.2). Os dNTP's já se encontravam em solução no AFLP Pré-Amp Primer Mix II. Após a amplificação, cada amostra foi diluída com a adição de 190 µL de água Milli-Q autoclavada.

4.2.1.3.3 Amplificação seletiva das amostras de *Spodoptera frugiperda*

Na etapa de amplificação seletiva foram utilizadas quatro combinações de oligonucleotídeos iniciadores *EcoRI* e *MseI* sendo ambos dotados de três nucleotídeos adicionais

que foram inseridos na extremidade 3' do iniciador (Tabela 4.1). As reações de PCR foram preparadas obedecendo as seguintes condições: 2 µL de produto diluído da pré-amplificação, 4,2 µL da água ultra pura autoclavada, 1,2 µL do tampão de PCR 10 ×, 0,72 µL de MgCl₂ 25 mM, 2,0 µL do iniciador da enzima de corte freqüente *Mse*I (Invitrogen, Carlsberg, Califórnia, EUA) e 0,3 µL do iniciador da enzima de corte raro *Eco*RI IRD (LI-COR, Lincoln, EUA) (Quadro 3) e 0,08 µL de *AmpliTa*q polimerase na concentração de 5 U/µL (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Em todas as reações de amplificação seletiva foi utilizado um programa de PCR contendo o procedimento de *touchdown*: um ciclo a 94°C por 30s, 65°C por 30s, e 72°C por 1 min seguido por 12 ciclos de a 94°C por 30 s, 65°C por 30 s (abaixando-se a temperatura de anelamento 0,7°C por ciclo) e 72°C por 1 min, e finalmente 23 ciclos a 94°C por 30 s, 56°C por 30 s, 72°C por 1 min com as amostras sendo mantidas a 4°C ao final do programa de PCR.

4.2.1.3.4 Eletroforese dos fragmentos AFLP

Após o encerramento da amplificação seletiva, foram adicionados 2,5 µL da solução de parada Blue Stop Solution (Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nebraska, EUA) nas reações. As amostras de PCR foram então desnaturadas a 95°C por 3 min e mantidas a 4°C até o momento de serem carregadas em gel de poliacrilamida denaturante (PAGE). Os géis de poliacrilamida foram preparados com o uso da solução KBplus 6.5% Ready-to-Use Gel Matrix (Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nebraska, EUA). No processo de montagem dos géis foram utilizadas placas de vidro com 25 cm de comprimento, espaçadores de 0,25 mm de espessura e um pente com 48 poços retangulares. Foram carregadas 42 amostras amplificadas de *S. frugiperda*, e o marcador de peso molecular IRD-labeled 50-700 bp (Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nebraska, EUA) foi carregado no primeiro e último poço do gel. Deste modo, os produtos AFLP foram separados em géis de poliacrilamida (6,5%) e visualizados em um seqüenciador Li-Cor Gene Read IR 4200 DNA Sequencer (Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nebraska, EUA). As condições de eletroforese foram definidas da seguinte maneira: voltagem de 1.500 V, força de 40W, corrente de 40 mA e temperatura de 45°C. Os géis PAGE foram corridos por 2,5 h para assegurar a migração das amostras e dos marcadores moleculares.

Tabela 4.1 - Combinações de iniciadores utilizadas na amplificação seletiva, número de marcadores AFLP selecionados por combinação de iniciadores e faixa do tamanho dos fragmentos gerados em pares de bases

Código dos iniciadores	Seqüências (5' - 3')	Número de marcadores AFLP	Tamanho dos fragmentos (pares de bases)
EM01	GACTGCGTACCAATTCACT GATGAGTCCTGATAACAC	30	77 – 270
EM02	GACTGCGTACCAATTCACT GATGAGTCCTGAGTAACAG	30	72 – 394
EM03	GACTGCGTACCAATTCACT GATGAGTCCTGAGTAACTA	26	71 – 382
EM04	GACTGCGTACCAATTCACT GATGAGTCCTGAGTAACTC	33	56 – 338

4.2.1.3.5 Coleta e análise estatística dos resultados AFLP

As bandas AFLP foram avaliadas utilizando-se o marcador IRD-700 50-700 pb como referência para o tamanho dos fragmentos gerados. As marcas moleculares foram identificadas com o uso do programa SAGA Generation 2 (Li-Cor Biosciences, Lincoln, Nebraska, EUA) e confirmadas visualmente e utilizadas como marcadores moleculares. Desta maneira, as bandas nos géis de poliacrilamida foram identificadas assinalando-se a presença (um) ou a ausência (zero) destes marcadores entre as diferentes populações da praga para cada respectiva combinação de pares de iniciadores utilizados na amplificação seletiva.

O coeficiente médio de variação (CV) baseado na avaliação de erros associados com a estimativa da similaridade genética foi obtido após 1.000 *bootstraps* através do programa DBOOT, versão 1.1 (COELHO, 2000b). A matriz binária de dados zero e um coletadas com programa SAGA foi utilizada para se estimar o índice de similaridade genética entre as populações de *S. frugiperda* com base no algoritmo de Jaccard, através do procedimento SINQUAL disponível no programa NTSYS 2.1 (ROHLF, 2000). Os dendrogramas foram construídos seguindo Sneath e Sokal (1973). O programa BOOD-P, versão 3.1 (COELHO, 2001a), foi utilizado para se avaliar o grau de confiança na topologia das árvores obtidas pelo método de *bootstrap* após 10.000 re-amostragens. A adequação dos dendrogramas aos resultados das matrizes de similaridade genética foi avaliada através dos procedimentos CPH e MAXCOMP do programa NTSYS 2.1 (ROHLF, 2000).

A análise molecular de variância (AMOVA) foi realizada para a avaliação da estrutura genética e fluxo gênico entre populações de *S. frugiperda* de acordo com Excoffier; Smouse; Quattro (1992) por meio do programa ARLEQUIN (SCHNEIDER; ROESSLI; EXCOFFIER, 2000). Assim, foram conduzidos três tipos de análises para se testar a existência de variação molecular atribuída à presença de estrutura genética: (a) entre indivíduos em todas as populações, (b) entre indivíduos dentro dos grupos Brasil e Argentina e (c) entre grupos de insetos que foram coletados em milho e algodão no Brasil. A significância das fontes de variação foi testada através do procedimento de *bootstrap* após 1.000 re-amostragens. Além disso, também foi estimada a divergência genética (Φ_{ST}) entre as populações de *S. frugiperda*, e avaliada a significância desses valores através do programa Arlequin. O fluxo gênico (Nm) foi calculado segundo método proposto por Wright (1951): $Nm=0,25(1/F_{ST} - 1)$, com a substituição do valor de F_{ST} por Φ_{ST}

(LACERDA et al., 2001). O dendrograma com os valores Φ_{ST} foi elaborado através do procedimento SAHN no programa NTSYS 2.1. O teste da hipótese de isolamento genético causado pela distância geográfica foi realizado por meio do teste de Mantel com 9.999 permutações (MANTEL, 1967; ROHLF, 2000).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Seleção de oligonucleotídeos para AFLP

No processo de seleção de oligonucleotídeos iniciadores apropriados para análise de diversidade molecular entre as populações de *S. frugiperda*, foram testados sete diferentes combinações de iniciadores. Os resultados mostraram que quatro combinações de iniciadores (Quadro 4.3) foram facilmente amplificadas e forneceram padrões de bandas polimórficos, consistentes e de fácil interpretação. A estimativa do coeficiente de variação indicou que 91,16% da variação total foram explicadas pelos 119 marcadores AFLP avaliados (Figura 4.1). Deste modo, foi concluído que os 119 marcadores AFLP testados foram suficientes para a estabilidade dos dendrogramas UPGMA.

4.3.2 Estrutura genética de *Spodoptera frugiperda* através de marcadores AFLP

A similaridade genética média entre as populações de *S. frugiperda* estimada através do índice de Jaccard foi de 0,45. A matriz de similaridade indicou que as populações da Argentina ARG3 e ARG4 foram as mais similares (0,72) (Tabela 4.1). Por outro lado, o menor valor de similaridade genética foi encontrado entre as populações BR1 e ARG1 (0,14).

Figura 4.1 - Coeficiente de variação das amostras de *Spodoptera frugiperda* a partir do procedimento de *bootstrap* com 1000 re-amostragens, ilustrando a relação entre o coeficiente médio de variação e o número de marcadores AFLP utilizados no índice de Jaccard

Tabela 4.1 - Matriz de similaridade genética entre as populações de *Spodoptera frugiperda* obtida através de marcadores AFLP pelo índice de Jaccard

População	MEX	BR1	EUA	ARG1	ARG2	ARG3	ARG4	BR2	BR3	BR4	BR5	BR6	BR7
MEX	1,00												
BR1	0,22	1,00											
EUA	0,35	0,28	1,00										
ARG1	0,14	0,14	0,17	1,00									
ARG2	0,16	0,14	0,17	0,16	1,00								
ARG3	0,45	0,27	0,47	0,15	0,20	1,00							
ARG4	0,44	0,27	0,47	0,16	0,19	0,72	1,00						
BR2	0,36	0,23	0,39	0,15	0,18	0,50	0,49	1,00					
BR3	0,34	0,25	0,39	0,16	0,18	0,52	0,50	0,43	1,00				
BR4	0,37	0,24	0,39	0,15	0,19	0,52	0,53	0,43	0,44	1,00			
BR5	0,41	0,24	0,43	0,16	0,19	0,59	0,58	0,51	0,50	0,49	1,00		
BR6	0,38	0,24	0,41	0,16	0,19	0,56	0,54	0,47	0,46	0,44	0,55	1,00	
BR7	0,39	0,28	0,45	0,17	0,19	0,60	0,58	0,48	0,49	0,48	0,57	0,53	1,00

O agrupamento UPGMA com todos os insetos utilizados evidenciou clara sobreposição de alguns indivíduos que pertenciam a diferentes populações. Entretanto, após o preparo dos dados organizados de modo que as populações da praga representassem a unidade taxonômica de interesse, foi observado na grande maioria dos casos o agrupamento dos insetos originalmente pertencentes a uma mesma população de *S. frugiperda*. A árvore UPGMA obtida pelo índice de Jaccard e o procedimento de *bootstrap* (Figura 4.2) destacaram o grau de similaridade genética, e os elevados valores de confiança dos nós do dendrograma que sustentaram a topologia da árvore. Além disso, o dendrograma mostrou que ARG1 foi a população mais dissimilar dentre todas as populações de *S. frugiperda* investigadas pela técnica AFLP (Figura 4.2).

O dendrograma UPGMA de similaridade genética não indicou uma associação molecular entre as populações e as plantas hospedeiras nas quais os insetos foram coletados (Figura 4.2). Por exemplo, as populações BR7 e BR5 foram as mais similares dentre as coletadas no Brasil, no entanto estes insetos foram obtidos em plantas de milho e algodão respectivamente (Tabela 4.1).

A AMOVA não hierárquica (Tabela 4.2a) indicou que 32,19% da variação molecular foram atribuídos à variação entre as populações de *S. frugiperda* testadas. Por sua vez, a AMOVA hierárquica suportou a hipótese de um efeito de população, uma vez que 7,01% da variação molecular total foram atribuídos à divisão das populações da praga nos grupos Brasil e Argentina (Tabela 4.2b). Além disso, a AMOVA reforçou a ausência de variação molecular entre as populações de *S. frugiperda* coletadas em plantas de milho e algodão no Brasil (Tabela 4.2c). Deste modo, não foi observada a presença de estruturação genética das populações de *S. frugiperda* associada às plantas de milho ou algodão. O teste da hipótese de isolamento genético causado pela distância geográfica não mostrou correlação significativa entre as matrizes de dissimilaridade genética ($1 - \text{índice de similaridade de Jaccard}$) e de distâncias geográficas entre as populações ($n=78$, $r=0.04$, $P=0.3917$). As comparações dos valores de Φ_{st} entre todas as populações de *S. frugiperda* confirmaram a ausência de estrutura genética associada às plantas de milho e algodão (Tabela 4.3). No entanto, estas comparações de valores de Φ_{st} corroboraram alguma das divergências geográficas e temporais encontradas através dos dendrogramas UPGMA e realçadas pelos resultados da AMOVA (Figura 4.3).

Figura 4.2 - Relações de similaridade genética entre as populações de *Spodoptera frugiperda* pelo índice de Jaccard. Correlação cofenética = 0,98

Tabela 4.2 - Análise molecular de variância para explorar a variação geográfica e a associação à planta hospedeira de coleta dos insetos na distribuição da variabilidade genética presente nas populações de *Spodoptera frugiperda* e estimativa de fluxo gênico (Nm) pelo método de Wright (1951)

Fonte de variação	GL	SQ	Porcentagem do total da variação	Φ_{ST}	Nm
(a) Entre populações	12	931,92	32,19***	0,3219	0,53
Nas populações	76	1.389,23	67,81***		
Total	88	2.321,15	100,00		
(b) Entre regiões	1	152,62	7,01***	0,3538	0,46
Entre populações nas regiões	10	726,95	28,37***		
Nas populações	70	1.273,80	64,62***		
Total	81	2.153,67	100,00		
(c) Entre plantas hospedeiras	1	43,60	0,00***	0,1588	1,32
Entre populações nos hospedeiros	5	230,95	16,65***		
Nas populações	40	796,94	84,12***		
Total	46	1.071,49	100,00		

*** $P < 0,001$

Tabela 4.3 - Divergência genética (Φ_{ST}) entre as populações de *Spodoptera frugiperda* estimada pela análise molecular de variância (AMOVA)

População	MEX	BR1	EUA	ARG1	ARG2	ARG3	ARG4	BR2	BR3	BR4	BR5	BR6	BR7
MEX	0,00												
BR1	0,42 ^{***}	0,00											
EUA	0,23 ^{***}	0,42 ^{***}	0,00										
ARG1	0,32 ^{***}	0,78 ^{***}	0,56 ^{***}	0,00									
ARG2	0,24 ^{***}	0,70 ^{***}	0,48 ^{***}	0,03†	0,00								
ARG3	0,31 ^{***}	0,34 ^{***}	0,30 ^{***}	0,70 ^{***}	0,62 ^{***}	0,00							
ARG4	0,30 ^{***}	0,31 ^{***}	0,31 ^{***}	0,68 ^{***}	0,60 ^{***}	0,14 ^{***}	0,00						
BR2	0,10 ^{***}	0,41 ^{***}	0,21 ^{***}	0,43 ^{***}	0,33 ^{***}	0,33 ^{***}	0,30 ^{***}	0,00					
BR3	0,13 ^{***}	0,36 ^{***}	0,18 ^{***}	0,41 ^{***}	0,33 ^{***}	0,28 ^{***}	0,27 ^{***}	0,07 ^{***}	0,00				
BR4	0,06†	0,30 ^{***}	0,13 ^{***}	0,40 ^{***}	0,30 ^{***}	0,22 ^{***}	0,18 ^{***}	0,03†	0,01†	0,00			
BR5	0,22 ^{***}	0,44 ^{***}	0,29 ^{***}	0,59 ^{***}	0,51 ^{***}	0,34 ^{***}	0,32 ^{***}	0,12 ^{***}	0,14 ^{***}	0,11 ^{***}	0,00		
BR6	0,14 ^{***}	0,34 ^{***}	0,20 ^{***}	0,48 ^{***}	0,40 ^{***}	0,25 ^{***}	0,25 ^{***}	0,04†	0,07†	0,07†	0,10 ^{***}	0,00	
BR7	0,19 ^{***}	0,36 ^{***}	0,22 ^{***}	0,55 ^{***}	0,46 ^{***}	0,25 ^{***}	0,26 ^{***}	0,12 ^{***}	0,08†	0,05†	0,16 ^{***}	0,05†	0,00

^{***} $P < 0.001$; †NS

Figura 4.3 – Divergência genética (Φ_{ST}) detectada entre as populações de *Spodoptera frugiperda* pelos marcadores AFLP avaliados

Os resultados obtidos com a aplicação da teoria de genética de populações constituem os métodos indiretos para estimativa de fluxo gênico e análise da estrutura genética. Estes resultados podem ser utilizados para se inferir sobre o movimento de indivíduos e suas taxas de dispersão (RODERICK, 1996; STALKIN, 1985). Estas informações de base genética podem ser obtidas com diferentes técnicas de marcadores moleculares e são tradicionalmente analisadas através da medida da similaridade genética e ou do fluxo gênico entre as subpopulações pertinentes ao estudo (RODERICK, 1996). Esta relação pode explicada pelo fato da similaridade genética existente entre populações de insetos com hábito migratório ser provavelmente função do fluxo gênico existente entre as mesmas, ou ainda, uma função de um recente episódio de fragmentação populacional (PASHLEY; JOHNSON; SPARKS, 1985).

O uso dos marcadores AFLP além de fornecerem informações adicionais sobre a organização da variabilidade molecular de *S. frugiperda* no Brasil, também permitiu a avaliação da variabilidade genética e estrutura populacional de populações desta praga coletadas no Brasil e Argentina. Os insetos das populações ARG1 e ARG2 que foram coletadas na Argentina apresentaram a tendência de se agruparem de modo significativo. Deve-se destacar que foi encontrada uma maior similaridade entre as populações de *S. frugiperda* coletadas no Brasil com os insetos obtidos nos EUA (Flórida). Resultados semelhantes foram encontrados com *Anticarsia gemmatilis* Hüeb. (Lepidoptera: Noctuidae) (SOSA-GOMEZ, 2004).

O fluxo gênico é uma força evolutiva que age de modo contrário à deriva genética e seleção, e de modo incisivo resulta na homogeneização do conteúdo genético de populações mesmo em grandes escalas geográficas (VANDEWOESTIJNE et al., 1999). Na maioria das vezes em que o efeito de homogeneização não ocorre, podem ser detectados valores mais elevados de variação entre populações. Estes valores elevados de variação (Φ_{ST}) são comuns em espécies caracterizadas por uma estrutura genética dita “fechada”. A variação genética encontrada neste trabalho entre populações de *S. frugiperda* foi de 32% ($\Phi_{ST}=0,3219$). Este valor sugere baixo fluxo gênico entre as populações amostradas. Provavelmente, essa percentagem de variação pode ter sido encontrada devido ao procedimento da AMOVA não hierárquica foi levada em consideração populações da América do Sul (Brasil e Argentina) e América do Norte (México e Estados Unidos da América) as quais foram, portanto coletadas em áreas com padrões agroecológicos distintos. Deste modo, nesta grande escala geográfica e ecológica uma série de fatores biológicos e não biológicos que podem ter afetado em conjunto para moldar a estrutura

genética de populações de *S. frugiperda*. O entendimento completo dos processos e padrões de fluxo e adaptação local requer que os estudos de estrutura genética sejam abordados através da combinação de estudos de ecologia de sistemas e genética de populações (MANEL et al., 2003). Além disso, o fluxo gênico tem sido discutido em relação a sua magnitude e influência na estrutura genética das populações. A importância do fluxo gênico, principalmente em populações naturais, está na homogeneização das frequências alélicas. Deste modo, populações mesmo que separadas geograficamente podem comportar-se como uma grande população panmítica. Assim, o grau em que uma população pode ser limitada de outras depende do fluxo gênico existente entre as mesmas. Isto porque se a taxa de fluxo gênico entre duas populações for muito alta, estas populações se comportariam na realidade como uma população panmítica cujo tamanho populacional é a soma das duas populações. Portanto, o fluxo gênico influencia diretamente o tamanho efetivo da população e, conseqüentemente, a diversidade genética (SLATKIN, 1985).

A migração é um atributo complexo e com grande flexibilidade evolutiva na sua própria presença e ausência numa população. Além disso, diferenças no balanço entre os indivíduos migratórios e os residentes podem ocorrer em populações de uma mesma espécie (ALERSTAM et al., 2003). Os resultados obtidos por Sosa-Gomez (2004) sugeriram que determinadas populações *A. gemmatilis* do Brasil e Argentina possam ser compostas na sua maioria por genótipos não-migratórios ou permanentemente residentes. Entretanto, estudos mais refinados sobre a demografia de *S. frugiperda* devem ser conduzidos para testar esta hipótese. Os resultados deste trabalho não corroboram a teoria de uma intensa comunicação gênica entre todas as populações amostradas e sugere elevados níveis de variabilidade genética dentro das populações de *S. frugiperda*. A AMOVA hierárquica (Tabelas 4.2b e 4.2c) reforçou as populações locais como o maior reservatório de variabilidade e baixos níveis de diferenças devido à subdivisão em populações brasileiras e argentinas de *S. frugiperda*.

Portanto, o isolamento pela distância, que é capaz de acarretar aumento na variação genética com o aumento das distâncias devido à dispersão limitada no espaço (SLATKIN, 1993), não deve ter sido a causa principal da variação observada entre as populações de *S. frugiperda*. A variação genética também pode ser avaliada mediante a comparação de pares de valores de Φ_{ST} (Tabela 4.3). Apesar de alguma diferença ter sido encontrada entre as populações brasileiras de *S. frugiperda*, a maior parte destas não foram estatisticamente significativas.

A AMOVA hierárquica (Tabela 4.2c) mostrou valores significantes de imigrantes ($Nm=1,32$) entre as populações de milho e algodão, e destacou a existência de 0% entre os grupos de populações de *S. frugiperda* que foram coletadas naquelas culturas. Nenhum dos dendrogramas obtidos mostrou algum ramo ou agrupamento principal que pudesse separar as populações de *S. frugiperda* em grupos distintos associados com as plantas de milho ou algodão. Além disso, não foi encontrada nenhuma marca AFLP que pudesse diagnosticar populações coletadas nas diferentes plantas hospedeiras testadas.

Neste sentido, a invasão de herbívoros em um novo ambiente pode ser significativamente correlacionada com a faixa de distribuição de seus hospedeiros, ao se comparar organismos especialistas e polípagos quanto ao hábito alimentar (KOLAR; LODGE, 2001). Os dados obtidos com marcadores AFLP confirmaram a existência de intenso fluxo gênico entre as populações de *S. frugiperda* que atacam as culturas do milho e algodão no Brasil. Estas evidências são extremamente importantes, uma vez que *S. frugiperda* é amplamente conhecida como praga nas culturas do algodão e milho. O termo fluxo gênico congrega todos os possíveis mecanismos que resultam em movimentos de genes de uma população para outra. A migração é muitas vezes utilizada como um sinônimo para fluxo gênico, o que seria correto nas ocasiões em que a migração entre populações propriamente estabelecidas é o mecanismo de fluxo gênico (SLATKIN, 1985). Entretanto, o fluxo gênico também pode ser entendido como o produto da extinção e recolonização de subpopulações, acompanhado do estabelecimento de novas subpopulações inteiras (MARUYAMA; KIMURA, 1980; SLTAKIN, 1977). Porém, há divergências sobre qual a importância do fluxo gênico na conservação da variabilidade, e na inserção de novos genes em uma determinada população (MAYR, 1963).

O conhecimento gerado neste trabalho é particularmente importante em situações de cultivo em ambientes contíguos de plantas geneticamente modificadas resistentes ao ataque de lepidópteros como milho e algodão geneticamente modificado resistentes a insetos (plantas Bt). Esta preocupação surge em virtude da possibilidade de exploração das diferentes culturas geneticamente modificadas numa região pelas mesmas populações de insetos, o que aumentaria a pressão de seleção para resistência às toxinas inseticidas nas populações das pragas (WU; FENG; GUO, 2004). Neste caso, a similaridade genética e de modo mais apurado a conectividade entre estas subpopulações é de grande importância para o manejo da resistência. Por exemplo, a subdivisão da população de uma praga em unidades menores e intercruzantes têm uma influência

significativa na taxa de alteração de frequências alélicas por afetarem diretamente o fluxo gênico entre áreas (ROUSH; McKENZIE, 1987, CAPRIO; TABASHNIK, 1992, RODERICK, 1996).

Os resultados aqui apresentados sugerem que o movimento de *S. frugiperda* entre campos de milho e algodão deve ser cuidadosamente considerado dentro de uma mesma região agrícola. A entrada de insetos imigrantes poderia ter sérios impactos para os programas de manejo da resistência. Entretanto, é importante frisar que essa informação será útil não apenas para o delineamento de estratégias efetivas de manejo da resistência de *S. frugiperda* às proteínas inseticidas presentes em plantas geneticamente modificadas, mas também para inseticidas convencionais. Isto porque nas ocasiões em que uma pequena fração dos genótipos da uma população se estabelece em um novo ambiente, o nível de resistência a um determinado agente tóxico pode ser influenciado pela variabilidade genética presente nos insetos imigrantes (ROUSH; McKENZIE, 1987; ROUSH; DALY, 1990).

Deste modo, com base nos marcadores moleculares avaliados, a hipótese de que não há variabilidade molecular entre as populações de *S. frugiperda* coletadas no Brasil e na Argentina foi rejeitada. Na Argentina o milho e algodão resistente a insetos com base na produção de proteínas inseticidas de Bt têm sido cultivados desde 1998. O estabelecimento da resistência a essas proteínas nas populações de insetos foi um dos principais pontos considerados no momento da adoção desta tecnologia na Argentina. Em genética de populações os valores de $Nm > 1$ são considerados suficientes para que o fluxo gênico entre determinadas populações possa se sobrepor à deriva genética (WRIGHT, 1931) e conseqüentemente agir em favor da homogeneização do fundo genético destas populações. Neste sentido, com base nos resultados deste trabalho se aceita a hipótese de que são geneticamente as mesmas populações de *S. frugiperda* que atacam a cultura do algodão e milho no Brasil. Todavia, trabalhos mais refinados e com diferente escala geográfica são necessários para o melhor entendimento do fluxo gênico e parentesco entre populações da *S. frugiperda* que infestam outras plantas cultivadas e também hospedeiros selvagens em regiões geográficas e sistemas de cultivo específicos ao longo do tempo.

4.4 Conclusões

Com base nos marcadores AFLP avaliados, pode-se concluir que:

- Há variação molecular entre as populações de *S. frugiperda* coletadas na Argentina e no Brasil;
- Há fluxo gênico significativo e ausência de subdivisão entre as populações de *S. frugiperda* que infestam as culturas do algodão no Brasil.

Referências

ALERSTAM, T.; HENDERSTROM, A.; AKESSON. Long-distance migration: evolution and determinants. **Oikos**, Copenhagen, v. 103, p. 247-260, 2003.

BERRETA, M.F.; RIOS, M.L.; DE CAP, A.S. Characterization of a nuclear polyhedrosis virus of *Spodoptera frugiperda* from Argentina. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 71, p. 280-282, 1998.

BOYCE, T.M.; ZWICK, M.E.; AQUADRO, C.F. Mitochondrial DNA in the pine weevil: size, structure and heteroplasmy. **Genetics**, Dordrecht, v. 123, p. 825-836, 1999.

BUSATO, G.R.; GRUTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S.; GIOLO, F.P.; MARTINS, A.F. Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, nas culturas do milho e arroz irrigado. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, p. 525-529, 2002.

BUSATO, G.R.; GRUTZMACHER, A.D.; OLIVEIRA, A.C.; VIEIRA, E.A.; ZIMMER, P.D.; KOPP, M. M.; BANDEIRA, J.M.; MAGALHÃES, T.R. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas do milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, p. 709-716, 2004.

CAPRIO, M.A.; TABASHNIK, B.E. Gene flow accelerates local adaptation among finite populations: simulating the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, p. 611-620, 1992.

CERVERA, M.T.; CABEZAS, J.A.; SIMÓN, B.; MARTÍNES-ZAPATER, J.M.; BEITIA, F.; CENIS, J.L. Genetic relationships among the biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on AFLP analysis. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 90, p. 391-396, 2000.

COELHO, A.S.G. **BOOD-P**: avaliação de dendogramas baseados em estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap; versão 3.0. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, 2001a.

COELHO, A.S.G. **DBOOT**: avaliação dos erros associados a estimativas de distâncias/similaridades genéticas através do procedimento de bootstrap com número variável de marcadores; versão 1.1. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, 2001b.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1995. 45p.

DALY, J.C. Ecology and genetics of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera*: interactions between selection and gene flow. **Genetica**, Dordrecht, v. 90, p. 217-226, 1993.

DE BARRO, P.J. Genetic structure of whitefly *Bemisia tabaci* in the Asia-Pacific region revealed using microsatellite marker. **Molecular Ecology**, London, v. 14, p. 3695-3718, 2005.

DIEZ-RODRIGUEZ, G.I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) à lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 311-316, 2001.

DOBZHANSKY, T. **Genetics and the origin of species**. 3rd. ed. New York: Columbia University Press, 1957. 364p.

ENDERSBY, N.M.; McKECHNIE, S.W.; RIDLAND, P.M.; WEEKS, A.R. Microsatellites reveal a lack of structure in Australian populations of the diamond back moth, *Plutella xylostella*(L.). **Molecular Ecology**, London, v. 15, p. 107-118, 2006.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Dordrecht, v. 131, p. 479-491, 1999.

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1996. 220p.

GEORGHIOU, G.P. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIOU, G.P.; SAITO, T. (Ed). **Pest resistance to pesticides**. New York: Plenum, 1983, cap. 3, p. 769-792.

GEORGHIOU, G.P., TAYLOR, C.E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, p. 319-323, 1997a.

GEORGHIOU, G.P., TAYLOR, C.E. Operational influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, p. 653-658, 1977b.

GOÇMEN, H.; DEVRAN, Z. Determination of genetic variation in populations of *Bemisia tabaci* in Antalya. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, Ankara, v. 26, p. 211-216, 2002.

HOY, M.A. Myths, models and mitigation of resistance to pesticides. **Philosophical Transactions of the Royal Society London**, London, v. 353, 1787-1795, 1998.

HOY, M.A. Myths, models and mitigation of resistance to pesticides. **Philosophical Transactions of the Royal Society London**, London, v. 353, 1787-1795, 1998.

KOLAR, C.S.; LODGE, D.M. Progress in invasion biology: predicting invaders. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v.16, p. 199-204, 2001.

KOSMAN, E.; LEONARD, K.J. Similarity coefficients for molecular markers in studies if genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploidy species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, p. 415-424, 2005.

LABBE, P.; LENORMAND, T.; RAYMOND, M. On the world wide spread of an insect resistance gene: a role for local selection. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 18, p. 1471-1484, 2005.

LACERDA, D.R.; ACEDO, M.D.P.; LEMOS-FILHO, J.P.; LOVATO, M.B. Genetic diversity and structure of natural populations of *Plathlymenia reticulata* (Mimosoideae), a tropical tree from Brazilian cerrado. **Molecular Ecology**, London, v. 10, p. 1143-1152, 2001.

LEVY, H.C.; GARCIA-MARUNIAK, A.; MARUNIAK, J.E. Strain identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) insects and cell line: PCR-RFLP of cytochrome oxidase c subunit I gene. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 85, p. 186-190, 2002.

MANEL, S.; SCHATZ, M.K.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 18, p. 189-197, 2003.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, Baltimore, v. 27, p. 209-220, 1967.

MARUYAMA, T.; KIMURA, M. Genetic variability and effective population size when local extinction and recolonization are frequent. **Proceedings of National Academy of Science of USA**, Washington, v. 77, p. 6710-6714, 1980.

MAYR, E. **Animal species and evolution**. Cambridge: Harvard University Press, 1963. 797p.

McKENZIE, J.A. **Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1996. 185p.

McMICHAEL, M.; PROWELL, D.P. Differences in amplified fragment-length polymorphisms in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 92, p. 175-181, 1994.

MEAGHER, R.N.; NAGOSHI, R.L. Behavior and distribution of the two fall armyworm strains in Florida. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 87, p. 440-449, 2004.

MOLINA OCHOA, J.; CARPENTER, J.R.; HEINRICHS, E.A.; FOSTER, J.E. Parasitoids and parasites of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas and Caribbean basin: an inventory. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 86, p. 254-289, 2003.

PASHLEY, D.P. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex? **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 79, p. 898-904, 1986.

PASHLEY, D.P.; HAMMOND, A.M.; HARDY, T.N. Reproductive isolating mechanisms in fall armyworm host strains. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 85, p. 400-405, 1992.

PASHLEY, D.P.; JOHNSON, S.J.; SPARKS, A.N. Genetic population structure of migratory moths: the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 78, p. 756-762, 1985.

RODERICK, K. R. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 41, p. 325-352, 1996.

ROHLF, F. J. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.1, Cwner's Manual. New York, 2000. 470p.

ROUSH, R.T.; DALY, J.C. The role of population genetics in resistance research and management. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. (Ed.). **Pesticide resistance in arthropods**. New York: Chapman and Hall, 1990. p. 97-152.

ROUSH, R.T.; MCKENZIE, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, Stanford, 32, 361-380, 1987.

SCHNEIDER, S., KUEFFER, J. M, ROESSLI, D. ;EXCOFFIER, L. **ARLEQUIN version 2.0.:** a software for population genetic data analysis. Geneva: University of Geneva, Genetic and Biometry Laboratory, 2000.

SENA JUNIOR, D.G.; PINTO, F.A.C.; GOMIDE, R.L.; TEIXEIRA, M.M. Avaliação de métodos automáticos de limiarização para imagens de plantas de milho atacadas por *Spodoptera frugiperda*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 7, p.359-366, 2003.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy:** the principles and practice of numerical classification. San Francisco: W.H. Freeman, 1973. 573 p.

SOSA-GOMEZ, D. R. Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hubner, and 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, p. 378-384, 2004.

SLATKIN, M. Gene flow and genetic drift in a species subject to frequency local extinction. **Theoretical Population Biology**, New York, v. 12, p. 253-262, 1977.

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 16, p. 393-430, 1985.

SLATKIN, M. Isolation by distance in equilibrium and on equilibrium populations. **Evolution**, Lancaster, v. 47, p. 264-279, 1993.

SPARKS, A. N. A review of the biology of the fall armyworm. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 62, p. 82-87, 1979.

SUINAGA, F.A.; CASALI, V.W.D.; PICANÇO, M.; FOSTER, J.E. Genetic divergence among tomato leafminer populations base don AFLP analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p. 645-651, 2004.

TABASHNIK, B.E. Determining the mode of inheritance of pesticide resistance with backcross experiments. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 38, p. 25-326, 1991.

TAKAMI, Y.; KOSHIOU. C.; ISHII, M.; FUJII, H.; HIDAKA, T.; SHIMIZU, I. Genetic diversity and structure of urban populations of Pieris butterflies assessed using amplified fragment length polymorphism. **Molecular Ecology**, London, v. 13, p. 245-258, 2004.

TATSUTA, H.; BUTLIN, R.K. Amplified length polymorphism for the analysis of genetic structure in grasshopper populations. **Journal of Orthoptera Research**, Philadelphia, v. 10, p. 203-207, 2001.

VANDEWOESTIJNE, S; NEVE, G.; BAGUETTE, M. Spatial and temporal population genetic structure of the butterfly *Aglaia urticae* L. (Lepidoptera, Nymphalidae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, p. 1539-1543, 1999.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T van de; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprint. **Nucleic Acid Research**, New York, v. 23, p. 4407-4414, 1995.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, Dordrecht, v. 16, p. 97-157, 1931.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, London, v. 15, p. 395-420, 1951.

WU, K.; FENG, H.; GUO, Y. Evaluation of maize as a refuge for management of resistance to Bt cotton by *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) (Hubner) in the yellow river cotton-farming region in China. **Crop Protection**, Guildford, v. 23, p. 523-530, 2004.

YU, S.J. Insecticide resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 39, p. 94-91, 1991.

YU, S.J. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, p. 675-682, 1992.

YU, S.J. Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 84, p. 135-142, 2006.

YU, S.J.; NGUYEN, S.N.; ABO-ELGHAR, G.E. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 77, p. 1-11, 2003.

ZHANG, L.P.; ZHANG, Y.J.; ZHANG, W.J.; WU, Q.J.; XY, B.Y.; CHU, D. Analysis of genetic diversity among different geographical populations and determination of biotypes of *Bemisia tabaci* in China. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 129, p. 121-128, 2005.