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

**Suscetibilidade à proteína Cry1Ac e estrutura genética em populações de
Heliothis virescens (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil**

Karina Cordeiro Albernaz

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

**Piracicaba
2011**

Karina Cordeiro Albernaz
Engenheiro Agrônomo

Suscetibilidade à proteína Cry1Ac e estrutura genética em populações de
***Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil**

Orientador:
Prof. Dr. **CELSO OMOTO**

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

Piracicaba
2011

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Albernaz, Karina Cordeiro

Suscetibilidade à proteína Cry1Ac e estrutura genética em populações de *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil / Albernaz, Karina Cordeiro. - - Piracicaba, 2011.
83 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Algodão 2. Lagartas 3. Manejo integrado 4. Marcador molecular 5. Plantas transgênicas
6. Variação genética I. Título

CDD 632.78
A331s

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

A Deus, minha fortaleza...

À minha querida mãe Wilma, ao meu querido pai Irineu
e a minha irmã Kelly, pelo afeto, dedicação e incentivo

À minha amiga Josiani Ometto, pelo carinho e imprecidível apoio

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso Omoto pelas oportunidades concedidas, confiança, ensinamentos, e orientação para a realização desse trabalho.

À Dra. Karina Lucas Silva-Brandão pelo incentivo, conhecimentos transmitidos, e orientação na condução do trabalho com marcador molecular.

Ao Prof. Dr. Fernando Luis Cônsoli pela disponibilização do laboratório para condução do trabalho com marcador molecular e conhecimentos transmitidos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, pelos conhecimentos e apoio transmitidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) pelo financiamento parcial da pesquisa (Processo 578509/2008-3) e ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

À Monsanto do Brasil Ltda. pelo apoio técnico-financeiro para os trabalhos de monitoramento da resistência.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ/USP pelo agradável convívio e companheirismo.

Aos queridos amigos Nádia Fernanda Bertan Casarin, Oderlei Bernardi, Felipe Antônio Domingues e Eloisa Salmeron pelo convívio, companheirismo, amizade, conhecimentos transmitidos, apoio e essenciais auxílios prestados na condução desse trabalho.

Aos queridos amigos e colegas que são ou foram do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas, ESALQ/USP, Oscar Arnaldo Batista Neto e Silva, Alex Sandro Poltronieri, Edgar Francisco Gaona Mena, Juliano Farias, José Bruno Malaquias, Rodrigo José

Sorgatto, Vitor Antônio Correa Pavinato, Beatriz Maria Ferrari, Danielle Thomazoni, Patrick Marques Dourado, Fernando Joly Campos, Samuel Martinelli, Everaldo Batista Alves e Cláudio Roberto Franco, pelo convívio, companheirismo e auxílios prestados.

Aos técnicos do laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas, ESALQ/USP, Gislaine O. Campos e Luis Ricardo Sesso, pelo convívio agradável e essenciais auxílios prestados.

Aos estagiários do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas, ESALQ/USP, Rebeca da Silva Ribeiro, Dalton Camapacci Pavan, Isabela Maganeti Dal Pozzo, Guilherme Libardi Miraldo e Vinícius Durrer, pelo convívio e em especial a Bruna Laís Merlin por todo auxílio prestado na condução desse trabalho.

À equipe do Laboratório de Interação de insetos, ESALQ/USP, em especial ao estagiário Thiago Vieira dos Santos, por todo auxílio no trabalho com marcador molecular e a Aline Guidolin e Guilherme Rossi, pela disposição e paciência para me ensinar.

À minha querida amiga Anna Frida Hatsue Modro, pelo apoio, companheirismo, incentivo e auxílios prestados.

À minha querida amiga Tathiana Tímoteo, com quem morei todos esses anos, obrigada pelo convívio agradável, apoio em todos os momentos, companheirismo, incentivo e por ter sido minha família nesse período em Piracicaba.

Às queridas amigas Renata Alvarenga, Caroline Rabelo, Anna Carla Luccas e Débora Carvalho pelo carinho, incentivo, apoio e por tornarem esse período em Piracicaba tão agradável.

A todos os amigos da Igreja Batista Nova Vida de Piracicaba, por todo apoio e orações.

Ao Paulo Edimar Saran e Germison Tomquelski pelo auxílio na coleta da praga na cultura da soja.

A todos os colegas e amigos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, pelo companheirismo e incentivo.

A todos os funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP pela dedicação aos serviços prestados.

Às bibliotecárias Eliana Maria Garcia e Silvia Maria Zinsly da Biblioteca Central da ESALQ/USP, pelo auxílio na formatação deste trabalho.

E a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO.....	15
Referências	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 Aspectos bioecológicos de <i>Heliothis virescens</i>	19
2.2 Resistência de lepidópteros a plantas geneticamente modificadas.....	20
2.3 Monitoramento da suscetibilidade das pragas-alvo de controle das plantas <i>Bt</i>	23
2.4 Estrutura genética de populações e manejo da resistência	24
Referências	27
3 SUSCETIBILIDADE À PROTEÍNA Cry1Ac EM POPULAÇÕES DE <i>Heliothis virescens</i> (Fabricius) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) COLETADAS NA CULTURA DO ALGODÃO NO BRASIL	33
Resumo	33
Abstract.....	33
3.1 Introdução.....	34
3.2 Material e Métodos.....	35
3.2.1 Populações de <i>Heliothis virescens</i>	35
3.2.2 Criação e manutenção das populações de <i>H. virescens</i>	37
3.2.3 Procedimentos de bioensaio com incorporação da proteína Cry1Ac na dieta	38
3.2.4 Linhas-básica de suscetibilidade de <i>H. virescens</i> à proteína Cry1Ac	38
3.2.5 Monitoramento da suscetibilidade de <i>H. virescens</i> à proteína Cry1Ac.....	39
3.3 Resultados.....	40
3.3.1 Caracterização da suscetibilidade de <i>H. virescens</i> à proteína Cry1Ac.....	40
3.3.2 Monitoramento da suscetibilidade de <i>H. virescens</i> à proteína Cry1Ac.....	44
3.4 Discussão	45
3.5 Conclusões.....	48
Referências	48

4 VARIABILIDADE GENÉTICA E FLUXO GÊNICO INFERIDOS POR MARCADORES MITOCONDRIAIS EM POPULAÇÕES DE <i>Heliothis virescens</i> (Fabricius) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NO BRASIL	53
Resumo.....	53
Abstract	53
4.1 Introdução	54
4.2 Material e Métodos	56
4.2.1 Espécimes.....	56
4.2.2 Extração, amplificação e sequenciamento do DNAmít	59
4.2.3 Medidas de variabilidade genética.....	60
4.3 Resultados	63
4.3.1- Medidas de variabilidade genética.....	63
4.4 Discussão	75
4.5 Conclusões	78
Referências.....	78

RESUMO

Suscetibilidade à proteína Cry1Ac e estrutura genética em populações de *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil

Heliothis virescens (Fabricius) é uma das pragas-alvo do algodão geneticamente modificado que expressa a proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*). Estudos sobre a suscetibilidade de *H. virescens* à proteína Cry1Ac e sobre a estrutura genética e padrões de fluxo gênico nas escalas locais e regionais desse inseto são fundamentais para a implementação de programas de Manejo da Resistência de Insetos (MRI) no Brasil. Dessa forma, os principais objetivos do trabalho foram: (a) avaliar a suscetibilidade à proteína Cry1Ac em populações de *H. virescens* coletadas nas principais regiões produtoras de algodão no Brasil (Bahia, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) durante as safras agrícolas 2007/08 e 2008/09; e (b) avaliar a variabilidade genética e fluxo gênico de populações de *H. virescens* provenientes das culturas de algodão (safras 2007/08, 2008/09 e 2009/10) e de soja (safra 2009/10) utilizando sequências de DNA mitocondrial (DNAMit). As linhas-básica de suscetibilidade à proteína Cry1Ac foram estabelecidas mediante o uso de lagartas neonatas, por meio de bioensaios de incorporação das diferentes concentrações da proteína em dieta artificial. Para avaliar a variabilidade genética e o fluxo gênico entre populações de *H. virescens* utilizou-se sequências de DNAMit das subunidades I e II da citocromo oxidase – *COI* e *COII* – e a subunidade 6 da desidrogenase dinucleotídica da adenina nicotinamida – *nad6*. As CL_{50} estimadas variaram de 0,18 a 0,66 µg de Cry1Ac/mL de dieta para as populações coletadas na safra 2007/08 (variação de $\approx 3,7$ vezes). Da mesma forma, as concentrações efetivas médias para a inibição do desenvolvimento larval (CE_{50}) variaram de 0,0053 a 0,0161 µg de Cry1Ac/mL dieta (variação de $\approx 3,0$ vezes). A partir da análise conjunta dos dados de concentração-mortalidade de todas as populações avaliadas, foram definidas e validadas as concentrações diagnósticas de 3,1 e 5,6 µg de Cry1Ac/mL de dieta para programas de monitoramento da resistência de *H. virescens* à proteína Cry1Ac no Brasil. Baseadas em análises de agrupamento (“Neighbor-Joining” e Análise de Componentes Principais) e Bayesiana (“Structure”) foram verificadas uma baixa estruturação entre as populações de *H. virescens* de diferentes regiões, bem como para aquelas coletadas em plantas hospedeiras diferentes. As análises de AMOVA também indicaram baixa estruturação genética entre as populações de *H. virescens* estudadas independente da cultura ($F_{st} = 0,019$) ou escala geográfica ($F_{st} = 0,012$), sugerindo um nível significativo de fluxo gênico. Em média, a distância genética entre as amostras foi de 0,1%. Uma rede de haplótipos obtida com os dados combinados resultou em 35 haplótipos, com quatro haplótipos únicos presentes somente nas amostras coletadas em soja. A principal característica dessa rede é a forma de estrela na distribuição dos haplótipos, bem como a ocorrência de muitos alelos em baixa frequência. Esse tipo de rede é característico de populações que passaram por uma recente expansão populacional e, de fato, a história demográfica de *H. virescens*, baseada no teste de distribuição da diferença genética par-a-par entre haplótipos (distribuição de *Mismatch*) e nos resultados negativos nos testes de neutralidade seletiva indicam também um episódio de expansão populacional recente. As informações obtidas no presente trabalho serão fundamentais para o acompanhamento da efetividade das estratégias de manejo da resistência de *H. virescens* à proteína Cry1Ac no Brasil.

Palavras-chave: *Heliothis virescens*; Algodão; Resistência; Marcadores mitocondriais; Estrutura genética; Fluxo gênico; Manejo da resistência

ABSTRACT

Susceptibility to Cry1Ac protein and genetic structure in populations of *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil

The tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Fabricius), is one of target pests of genetically modified cotton expressing Cry1Ac insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis* Berliner. Studies on susceptibility of *H. virescens* to Cry1Ac and the genetic structure and gene flow patterns at local and regional levels are crucial for establishing an Insect Resistance Management (IRM) program for Bt cotton in Brazil. Thus, the objectives of this study were (a) to evaluate the susceptibility of field-collected populations of *H. virescens* to Cry1Ac from major cotton-growing regions in Brazil (Bahia, Goiás, Mato Grosso and Mato Grosso do Sul) in the cropping seasons of 2007/08 and 2008/09; and (b) to evaluate the genetic variability and gene flow among *H. virescens* populations from cotton (2007/08, 2008/09 and 2009/10 cropping seasons) and soybean (2009/10 cropping season) with mitochondrial DNA markers. Baseline susceptibility data to Cry1Ac protein were estimated with neonate larvae thereby using diet incorporation bioassays. Genetic variation and gene flow among *H. virescens* populations were evaluated by using mitDNA sequences of cytochrome oxidase subunits I and II – *COI* e *COII* and the subunit 6 of dinucleotide dehydrogenase of adenine nicotinamide – *nad6*. The estimated LC₅₀ values varied from 0.18 to 0.66 µg of Cry1Ac/mL of diet among the 2007/08 populations (≈3.7 fold variation). Similarly, the EC₅₀ values based on growth inhibition ranged from 0.0053 to 0.0161 µg of Cry1Ac/mL of diet for the 2007/08 populations (≈3.0 fold variation). A joint analysis of the mortality data across all tested populations was used to develop candidate diagnostic concentrations for future monitoring programs. The proposed diagnostic concentrations of 3.1 and 5.6 µg of Cry1Ac/mL of diet were validated against field-collected populations from 2008/09 and will form the basis for future resistance monitoring programs with *H. virescens*. Based on cluster analysis (Neighbor-Joining and Principal Coordinate Analysis) and Bayesian analysis (Structure), a low structure was detected among *H. virescens* populations either by regions or host plants. AMOVA analysis also indicated low genetic structure among *H. virescens* populations across crops (F_{st} = 0.019) or geographic scale (F_{st} = 0.012), suggesting a significant gene flow. The mean genetic distance among samples was 0.1%. The haplotype network obtained with joint data resulted in 35 haplotypes, with four unique haplotypes present only in samples collected from soybean crop. The major characteristics of the haplotype network were the star-like pattern and the occurrence of many alleles at low frequencies. This type of network is typical for populations that passed through a recent population expansion and, in fact, the demographic history of *H. virescens*, based on distribution test of pair-wise genetic difference among haplotypes (*Mismatch distribution*) and negative results from tests of selective neutrality also indicate an episode of a recent population expansion.

Keywords: *Heliothis virescens*; Cotton; Resistance; Mitochondrial markers; Genetic structure; Gene flow; Resistance management

1 INTRODUÇÃO

Plantas geneticamente modificadas (GM) resistentes a insetos representam um novo método de controle de insetos-praga para programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) em diversos agroecossistemas. A utilização de plantas GM contendo genes da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*) que codificam proteína com ação inseticida tem sido crescente na agricultura mundial desde 1996 (JAMES, 2009). No Brasil, somente em 2005, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) aprovou a primeira planta GM para o controle de insetos, o algodão *Gossypium hirsutum* L. que expressa a proteína inseticida Cry1Ac de *Bt* (Bollgard®). As pragas-alvo desse algodão *Bt* no Brasil são *Alabama argillacea* (Hübner), *Pectinophora gossypiella* (Saunders) e *Heliothis virescens* (Fabricius). Em 2009, a CTNBio aprovou a liberação de mais dois eventos de algodão *Bt* que expressam as proteínas Cry1Ac e Cry2Ab2 (Bollgard® II) e Cry1Ac e Cry1F (WideStrike®). Esses novos eventos conhecidos como “piramidados” além de controlarem as pragas-alvo do Bollgard® I, apresentam atividade de controle de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) e *Pseudoplusia includens* (Walker), entre outros lepidópteros-praga da cultura. Em todas as plantas *Bt* comercialmente disponíveis que usam proteína Cry, devido aos promotores constitutivos, a expressão da proteína inseticida é contínua, em todos os tecidos da planta, e em todo seu estágio de desenvolvimento, podendo exercer uma elevada pressão de seleção sobre as populações de pragas-alvo desta tecnologia, possibilitando a evolução da resistência em insetos, caso as estratégias de manejo da resistência não sejam devidamente implementadas.

H. virescens é considerada uma das pragas-chave da cultura do algodão, podendo causar sérios prejuízos à produção em decorrência dos danos causados às maçãs das plantas de algodão (DEGRANDE, 1998). Nos últimos anos, este inseto também tem se destacado como importante problema fitossanitário na cultura da soja, principalmente, nas regiões produtoras do cerrado (TOMQUELSKI; MARUYAMA, 2009). É uma espécie amplamente distribuída no Brasil, polífaga, com hábito migratório e alta capacidade reprodutiva, podendo ter de duas a três gerações por ciclo da cultura dependendo da região (FITT et al., 2006). Com a aprovação da soja *Bt*/RR2 MON 87701 × MON 89788 no Brasil, que expressa a proteína Cry1Ac, em algumas regiões, devido à possibilidade de sobreposição e/ou sucessão de diferentes cultivos de plantas *Bt*, eleva a probabilidade de uma maior exposição de *H. virescens* à proteína Cry1Ac que é expressa na soja

Bt e em todos os eventos de algodão *Bt* liberados comercialmente no Brasil, aumentando assim o risco da evolução de resistência.

Trabalhos realizados em laboratório têm mostrado que há variabilidade natural de quatro a oito vezes na suscetibilidade à proteína Cry1Ac em populações de *H. virescens* nos EUA (STONE; SIMS, 1993; LUTTRELL; WAN; KNIGHTEN, 1999; ALI; LUTTRELL; YOUNG, 2006; BLANCO et al., 2009). Gould et al. (1995) constataram razão de resistência > 10.000 vezes para proteína Cry1Ac em uma população de *H. virescens* submetida a 19 gerações de pressão de seleção. Estudos de estimativa da frequência inicial de alelos que conferem resistência de *H. virescens* a Cry1Ac, constataram uma frequência inicial relativamente alta de $1,5 \times 10^{-3}$ (GOULD et al., 1997) e de 0,0036 a 0,0263 (BLANCO et al., 2009), o que evidenciam a presença de variabilidade genética para a evolução da resistência de *H. virescens* a essa proteína em condições de campo (GOULD et al., 1997; BLANCO et al., 2009).

Embora várias estratégias de manejo tenham sido propostas para retardar a evolução da resistência às plantas GM (TABASHNIK, 1994; ALSTAD; ANDOW, 1995), o principal foco tem sido a estratégia de refúgio, ou seja, áreas de cultivos de plantas hospedeiras que não expressam proteína de *Bt* mantidas nas proximidades das plantas GM tóxicas, associadas às estratégias de alta dose ou de pirâmide de genes (GOULD, 1998). O princípio dessa estratégia de refúgio é que qualquer inseto resistente oriundo da planta *Bt* tem maiores chances de acasalar com um número muito maior de adultos suscetíveis presentes nos refúgios do que com outro adulto resistente, diminuindo assim a seleção para os alelos resistentes ao tóxico. Em relação às plantas GM *Bt*, a experiência de uso em larga escala no exterior tem demonstrado que a evolução da resistência pode ser retardada quando as estratégias de refúgio são usadas de forma efetiva (TABASHNIK; CARRIÈRE, 2008). Dessa forma, o conhecimento de processos ecológicos que influenciam a variabilidade genética entre populações são de grande importância para o delineamento de estratégias de manejo da resistência (GOULD, 1998), além do conhecimento da estrutura genética e do fluxo gênico entre populações da praga. Em adição, o monitoramento da suscetibilidade desses insetos-praga a proteínas de plantas GM no Brasil representa um desafio na conciliação das necessidades práticas com as exigências técnicas de um programa de MIP em um ambiente agrícola altamente diversificado.

Sendo assim, para gerar informações que possibilitem a elaboração de um programa pró-ativo de manejo da resistência de *H. virescens* à proteína Cry1Ac na cultura do algodão no Brasil, objetivou-se:

- Avaliar a suscetibilidade à proteína Cry1Ac em populações de *H. virescens* coletadas na cultura do algodão no Brasil;
- Avaliar a variabilidade genética e fluxo gênico em populações de *H. virescens* utilizando sequências de DNA mitocondrial (DNAMit).

Referências

- ALI, M.I.; LUTTRELL, R.G.; YOUNG, S.I. III Suscetibilities of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, p. 164-175, 2006.
- ALSTAD, D.N.; ANDOW, D.A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. **Science**, Washington, v. 268, p. 1394-1396, 1995.
- BLANCO, C.A.; GOULD, F.; VEGA-AQUINO, P.; JURAT-FUENTES, J.L.; PERERA, O.P.; ABEL, C.A. Response of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strains to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac incorporated into different insect artificial diets. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 4, p. 1599-1606, 2009.
- DEGRANDE, P.E. **Guia prático de controle de pragas do algodoeiro**. Dourados: UFM, 1998. 60 p.
- FITT, G.P.; OMOTO, C.; MAIA, A.H.; WAQUIL, J.M.; CAPRIO, M.; OKECH, M.A.; IA, E.; HUAN, N.H.E.; ANDOW, D.A. Resistance risks of Bt cotton and their management in Brazil. In: HILBECK, A.; ANDOW, D.A.; FONTES, E.M.G. (Ed.). **Environmental risk assessment of genetically modified organisms: methodologies for assessing Bt cotton in Brazil**. Cambridge: CABI Publ., 2006. p. 300-345.
- GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars; integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 43, p. 701-726, 1998.
- GOULD, F.; ANDERSON, A.; REYNOLDS, A.L.; BUNGARNER, L.; MOAR, W. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 88, p. 1545-1559, 1995.

GOULD, F.; ANDERSON, A.; JONES, A.; SUMERFORD, D.; HECKEL, D.G.; LOPEZ, J. MICINSKI, S.; LEONARDI, R.; LASTER, M. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 3519-3523, 1997.

JAMES, C. **Global status of commercialized biotech/GM crops**. Ithaca: ISAAA Briefs, 2009. 275 p.

LUTTRELL, R.G.; WAN, L.; KNIGHTEN, K. Variation in susceptibility of Noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, p. 21-32, 1999.

STONE, T.B.; SIMS, S.R. Geographic susceptibility of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 86, p. 989-994, 1993.

TABASHNIK, B. Evolution to resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 39, p. 47-79, 1994.

TABASHNIK B.E.; CARRIÈRE, Y. Evolution of insect resistance to transgenic plants. In: TILMON, K.J. (Ed.). **Specialization, speciation, and radiation: the evolutionary biology of herbivorous insects**. Berkeley: University of California Press, 2008. p. 267-279.

TOMQUELSKI, G.V.; MARUYAMA, L.C.T. Lagarta-da-maçã em soja. **Revista Cultivar**, Pelotas, v. 117, p. 20-22, 2009.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos bioecológicos de *Heliothis virescens*

Heliothis virescens (Fabricius) é uma espécie nativa de regiões tropicais e subtropicais, e encontra-se amplamente distribuída na América do Sul e América do Norte com populações permanentes na maioria das regiões entre as latitudes 40° N e 40° S (FITT, 1989). Como essa espécie apresenta mecanismo de diapausa, é capaz de sobreviver em clima temperado, sendo comum encontrá-la em regiões temperadas como nos Estados Unidos da América (EUA) e Canadá (POOLE; MITTER; HUETTEL, 1993). Nos EUA sua distribuição é limitada às regiões de temperatura mais elevada, tais como Flórida, Geórgia, Texas, Arizona, Carolina do Norte e Sul da Califórnia. Já no Canadá, tem sido encontrada nas regiões de Quebec e Ontário (POOLE; MITTER; HUETTEL, 1993). Entretanto, o maior centro de diversidade de *H. virescens* encontra-se nas regiões sudeste e centro-leste do Brasil (POOLE; MITTER; HUETTEL, 1993).

H. virescens é uma praga com alto potencial reprodutivo, sendo que cada fêmea pode colocar de 500 a 800 ovos durante seu ciclo de vida ($\approx$ 45 dias). Dependendo da região, podem ocorrer de duas a três gerações de *H. virescens* em um único ciclo da cultura (FITT et al., 2006). No Brasil, *H. virescens* é uma das pragas-chave da cultura do algodão, podendo ocasionar perdas que variam de 18 a 32%, dependendo da região (DEGRANDE, 1998). As lagartas recém-eclodidas raspam o parênquima foliar, enquanto as lagartas de segundo e terceiro ínstar, geralmente, raspam a epiderme das brácteas dos botões florais, flores e maçãs antes de perfurarem estas estruturas reprodutivas (DEGRANDE, 1998). Nos últimos anos, este inseto também tem se destacado como importante problema fitossanitário na cultura da soja, principalmente nas regiões produtoras do cerrado (TOMQUELSKI; MARUYAMA, 2009).

Com relação ao seu hábito alimentar, *H. virescens* é uma espécie polífaga. As lagartas desta espécie, além de causarem perdas na cultura do algodão e soja, alimentam-se de tabaco, tomate, milho, girassol e feijoeiro (FITT, 1989). A polifagia é uma característica que pode colaborar com a dinâmica populacional e condição de praga, uma vez que, as populações podem desenvolver-se simultaneamente em diferentes plantas hospedeiras dentro de uma região, ou podem persistir no ambiente em baixa densidade em áreas aparentemente inadequadas até a fêmea encontrar um hospedeiro capaz de sustentar o desenvolvimento das lagartas. Embora, exista muita variação na adequação de plantas hospedeiras para a sobrevivência das lagartas, desenvolvimento

e fecundidade dos adultos subsequentes, a polifagia oferece a espécie um grande potencial para a constância de suas populações e do seu aumento no ambiente (FITT, 1989).

A capacidade de dispersão é o segundo fator importante para o sucesso de *H. virescens* como praga. Os movimentos locais dentro das culturas e entre outros hospedeiros alternativos nas proximidades são de suma importância na dinâmica sazonal dessas pragas, especialmente, nos mais diversos sistemas de cultivo onde os locais de alimentação e de oviposição podem estar permanentemente disponíveis (FITT, 1989). Os adultos de *H. virescens* são migrantes facultativos, ou seja, migram em resposta às más condições locais para a reprodução, como a escassez de alimento para lagartas e adultos. De acordo com Schneider (1999), *H. virescens* apresenta movimento de longo alcance, sendo que a distância média percorrida por esta espécie, avaliada por meio da técnica de marcação, liberação e recaptura foi de 10 km em ambientes heterogêneos no Oeste do Mississippi nos EUA.

As características de polifagia e de alta mobilidade de *H. virescens* são fatores que afetam nas estratégias de manejo da resistência, tanto a inseticidas quanto a plantas que expressam proteínas de *Bt*. De acordo com Georgiou e Taylor (1986), a característica de polifagia poderia colaborar para o retardamento da evolução da resistência, devido à imigração de indivíduos suscetíveis provenientes de áreas ocupadas com o cultivo de hospedeiros alternativos da praga e não tratadas com defensivos agrícolas. Entretanto, com a intensificação da agricultura brasileira, uma das características desse novo cenário agrícola é o cultivo de diferentes espécies de plantas o ano todo e em regiões vizinhas. Com o advento das plantas GM resistentes a insetos que expressa a proteína inseticida de maneira contínua e em todos os tecidos das plantas, a polifagia associada à capacidade de dispersão das espécies pode expor a praga a repetidas pressões de seleção por inseticidas e/ou proteína *Bt* em diferentes culturas ao longo do ano agrícola em uma mesma região, aumentando o risco da evolução da resistência.

2.2 Resistência de lepidópteros a plantas geneticamente modificadas

Em condições de campo, a resistência às proteínas de *Bt* pode ser definida como uma diminuição geneticamente mediada na suscetibilidade do organismo-alvo à proteína *Bt*, mediante a exposição da população às culturas *Bt* (TABASHNIK, 1994; TABASHNIK; VAN RENSBURG; CARRIÈRE, 2009). De acordo com Andow (2008), o indivíduo considerado resistente tem que ser capaz de sobreviver sobre a planta *Bt*, desenvolver todo seu ciclo e gerar

descendentes viáveis. A seleção de populações de insetos resistentes em condições de laboratório tem mostrado uma rápida resposta de insetos-praga à pressão de seleção com proteínas de *Bt*, o que evidencia o potencial de evolução da resistência em condições de campo (STONE; SIMS, 1993; LUTTRELL; WAN; KNIGHTEN, 1999; ALI; LUTTRELL; YOUNG, 2006; TABASHNIK et al., 2008).

Trabalhos de seleção em laboratório têm mostrado que *H. virescens* pode apresentar evolução da resistência à proteína Cry1Ac e a outras proteínas de *Bt* (GOULD et al., 1995, 1997). Linhagem de *H. virescens* selecionada em laboratório (YHD2) apresentou alto nível de resistência (> 10.000) após 19 gerações de pressão de seleção com a proteína Cry1Ac (GOULD et al., 1995). Segundo esse autor, a concentração da proteína necessária para matar 50% (CL₅₀) de lagartas da linhagem (YHD2) foi 2.000 vezes maior que a CL₅₀ para linhagem suscetível de *H. virescens*. De acordo com Tabashnik et al. (2008), várias famílias de Lepidoptera têm demonstrado habilidade para a evolução da resistência. Cinco de dez espécies pertencentes às famílias Noctuidae, Plutellidae e Pyralidae analisadas quanto à evolução de resistência a proteínas *Bt* em laboratório apresentaram razões de resistência superiores a 10 vezes.

Inicialmente, os casos de evolução da resistência de insetos a proteínas de *Bt*, restringiam-se a biopesticidas à base de *Bt* aplicados em pulverização ou devido à seleção de linhagens resistentes a proteínas de *Bt* em condições de laboratório. No entanto, Tabashnik et al. (2008), baseando-se em dados de monitoramento da suscetibilidade de *Helicoverpa Zea* (Boddie) realizados de 1992 até 2006 para a proteína Cry1Ac expressa na primeira e segunda geração do algodão *Bt*, constataram um aumento substancial da frequência de alelos de resistência em algumas populações da praga nos EUA. Embora as evidências de resistência de *H. zea* ao algodão *Bt* não incluam informações como a sobrevivência de lagartas, essa é consistente com as premissas para o sucesso da estratégia de alta dose e refúgio que não são atendidas para *H. zea*. Em outras palavras, a concentração de Cry1Ac no algodão *Bt* não é alta o suficiente para matar os descendentes heterozigotos produzidos por acasalamentos entre suscetíveis e resistentes demonstrando que o evento não atende o conceito de alta dose para *H. zea*, pois neste caso os indivíduos heterozigotos comportam-se fenotipicamente como os homozigotos resistentes, ou seja, a resistência é funcionalmente dominante (TABASHNIK et al., 2008).

Recentemente, foram reportados casos de resistência de *S. frugiperda* ao milho *Bt* que expressa a proteína Cry1F em Porto Rico (STORER et al., 2010) e *Busseola fusca* (Fuller) em

milho *Bt* que expressa a proteína Cry1Ab na África do Sul (VAN RENSBURG, 2007). Essa evolução de resistência de *S. frugiperda* a Cry1F ocorreu em apenas quatro anos após a sua liberação comercial, tornando esse o caso mais rápido de evolução de resistência a campo para uma cultura *Bt*. Tal fato levou à retirada desse evento do mercado com o intuito de que haja restabelecimento da suscetibilidade de *S. frugiperda* a Cry1F. A Agência de Proteção Ambiental Americana (EPA) concluiu que os danos ao milho Cry1F observados em campos de produção em Porto Rico no ano de 2006 foram causados por populações de *S. frugiperda* resistentes a Cry1F. Para confirmar a resistência, foram realizados testes com a progênie de adultos coletados a campo mediante bioensaios com incorporação da toxina em dieta artificial. Nesses testes foi demonstrado que na maior concentração testada (10 µg Cry1F/cm² dieta) não houve mortalidade significativa das lagartas neonatas obtidas de posturas de adultos coletados a campo. Em contraste, a estimativa da CL₅₀ (µg Cry1F/cm² dieta e IC 95%) para a população suscetível de *S. frugiperda* foi de 0,06 (0,03 - 0,25), enquanto que, a CL₅₀ para a população resistente foi maior do que 10 µg Cry1F/cm² dieta, o que indica que a razão de resistência de *S. frugiperda* a Cry1F foi superior a 100 vezes (MATTEN; HEAD; QUEMADA, 2008). A possível causa da evolução de resistência em período tão curto foi devido ao fato do evento não expressar a proteína Cry1F em alta dose para *S. frugiperda*, a geografia da ilha (isolamento das populações), a falta de áreas de refúgio e a elevada pressão populacional da praga. Tabashnik e Carrière (2010), baseando-se em dados de monitoramento em laboratório, verificaram aumento da sobrevivência de populações resistentes para as espécies de *H. zea* coletadas na região sudeste dos EUA e *P. gossypiella* em populações da Índia à proteína Cy1Ac e Cry2Ab, respectivamente.

A maioria dos casos de resistência a proteínas de *Bt* tem sido devido à modificação nos sítios receptores das proteínas. Para as proteínas Cry1 foram identificados dois tipos de receptores no intestino médio dos insetos, os quais são pertencentes à família das caderinas e aminopeptidase (APNs). A resistência de *H. virescens* às proteínas de *Bt* parece ser causada por uma mutação no domínio 12 da proteína caderina presente no intestino desses insetos, como relatado também para outras espécies de insetos-praga, tais como *Helicoverpa armigera* (Hübner) (XU; YU; WU, 2005) e *P. gossypiella* (MORIN et al., 2003; FABRICK; TABASHINIK, 2007). Em relação ao papel preciso do domínio 12 da caderina no modo de ação da toxina Cry1A, está claro que mutações no gene que codifica essa proteína podem estar relacionadas à resistência a Cry1A em três espécies de Lepidoptera (HECKEL et al., 2007). Dessa forma, o loco da caderina deve ser o alvo principal

para o desenvolvimento de investigação dos genes de resistência a plantas que expressam proteínas de *Bt* em populações de insetos-praga (MORIN et al., 2003). Diante do potencial de evolução da resistência de insetos a proteínas de *Bt* expressas em plantas GM, há necessidade de monitoramento da suscetibilidade de pragas. É por meio do monitoramento que tem sido possível avaliar os resultados das estratégias de manejo para retardar a evolução da resistência, bem como identificar mudanças na suscetibilidade das pragas-alvo. De modo adicional, existe a necessidade da implementação de estratégias preventivas de manejo da resistência visando preservar a vida útil dessas tecnologias.

2.3 Monitoramento da suscetibilidade das pragas-alvo de controle das plantas *Bt*

O monitoramento para verificação de alterações na suscetibilidade dos insetos-alvo de proteínas de *Bt* é parte integrante dos programas de Manejo da Resistência a Insetos (MRI). Acredita-se que o monitoramento da suscetibilidade fornece resultados capazes de detectar pequenas mudanças na frequência dos genes de resistência antes da ocorrência de falhas no controle devido à evolução de resistência (SIMS et al., 1996). Dessa forma, o passo inicial para os trabalhos de monitoramento têm sido a caracterização de linhas-básica de suscetibilidade e definição de concentrações diagnósticas para posterior avaliação da resposta natural de populações da praga oriundas de regiões geograficamente distintas (ROUSH; MILLER, 1986). Sendo assim, os dados de um programa de monitoramento obtidos por meio de métodos adequados ajudam avaliar a efetividade de estratégias de manejo de resistência e permitem a detecção inicial de fenótipos resistentes.

Dentre os métodos disponíveis, os fenotípicos incluem: (1) bioensaios com lagartas oriundas de massas de ovos coletados no campo; (2) bioensaios com lagartas coletadas no campo; (3) bioensaios mediante a exposição das lagartas diretamente sobre as plantas *Bt*. Os métodos fenotípicos mensuram a suscetibilidade dos insetos pela exposição desses às proteínas inseticidas em bioensaios com dieta artificial ou diretamente sobre o tecido vegetal da planta *Bt* (ANDOW, 2008). Estudos de linhas-básica de suscetibilidade e monitoramento são geralmente realizados por meio de dieta, incorporação da proteína (SIMS et al., 1996; ALI; LUTTRELL; YOUNG, 2006) ou aplicação superficial da proteína (MARÇON et al., 1999; SIEGFRIED; SPENCER; NEARMAN, 2000; SIEGFRIED; VAUGHN; SPENCER, 2005) em condições de laboratório. Os bioensaios com incorporação da proteína na dieta artificial ou aplicadas na superfície de dieta permitem a

determinação da resposta a concentrações específicas da proteína, demonstrando diretamente o decréscimo na suscetibilidade ao longo do tempo para uma ou mais população de campo. Os bioensaios com plantas também podem ser utilizado, e geralmente são realizados em casa-de-vegetação utilizando-se a planta inteira (ANDOW; ALSTAD, 1998) ou tecidos da planta (HUANG et al., 2007) e permitem inferências mais diretas sobre a sobrevivência da praga na planta *Bt*. Os ensaios com plantas são mais eficientes para o monitoramento de resistência de alelos que são aditivos ou dominantes e são recomendados para eventos de baixa dose (ANDOW, 2008). Para ambas as abordagens as populações são geralmente testadas ao longo de várias gerações. Entretanto, métodos genotípicos, tais como a avaliação da progênie F_1 (GOULD et al., 1997) ou F_2 (ANDOW; ALSTAD, 1998) são abordagens alternativas que fornecem estimativas de frequência de genes da resistência podendo também ser usado em programas de monitoramento da resistência.

No entanto, independentemente do método utilizado, a medida de suscetibilidade pode ser realizada mediante a mortalidade de neonatas sete dias após a exposição à proteína inseticida (DULMAGE; MARTINEZ, 1973). Além da mortalidade, as proteínas de *Bt* podem causar enfezamento e inibir a troca de ínstar das lagartas, impedindo que a mesma atinja à fase adulta e complete seu ciclo (DULMAGE; MARTINEZ, 1973). Dessa forma, a avaliação de inibição do crescimento por meio da estimativa da concentração efetiva (CE) (SIMS et al., 1996), concentração que inibe a mudança de ínstar (JALALI et al., 2004; ALI; LUTTRELL; YOUNG, 2006) ou larvas que não alcançaram o terceiro ínstar (ALI; LUTTRELL, 2009) devem ser potencialmente incluído em estimativas de suscetibilidade de pragas-alvo a plantas *Bt*.

2.4 Estrutura genética de populações e manejo da resistência

A estrutura genética descreve a maneira como as populações se organizam e se dividem em unidades de acasalamento menores e finitas. Em outros termos, a estrutura genética também pode ser descrita como a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações. Essa distribuição é, por sua vez, resultado de eventos como mutação, migração, seleção, deriva genética, padrões de seleção de parceiros para o acasalamento e o fluxo gênico (RODERICK, 1996; McKENZIE, 1996).

Dentre os eventos citados, o fluxo gênico decorrente do movimento de indivíduos entre as diferentes populações de uma espécie de inseto desempenha um papel fundamental neste

processo. O fluxo gênico inclui todos os mecanismos que resultam na transferência de alelos de uma população para outra (SLATKIN, 1985; SCRIBNER et al., 2005), podendo ocorrer de modo intra e, embora mais raro, interespecífico. Em outras palavras, é a proporção de novos genes migrantes que se movem para uma determinada população, como resultado do movimento de indivíduos ou de seus gametas (ENDLER, 1977; GERBER et al., 2000). O fluxo gênico é uma força microevolutiva fundamental que pode determinar o potencial para a diferenciação genética entre populações e para adaptação local, além de influenciar a dispersão geográfica de novas adaptações (KEYGHOBADI; ROLAND; STROBECK, 2005). Assim, independentemente do mecanismo, o fluxo gênico interpopulacional determina o quanto as populações locais podem ser geneticamente diferenciadas (SLATKIN, 1985, 1987), podendo tanto limitar a evolução, ao reduzir a adaptação a condições locais, como promover evolução, ao disseminar novos genes e combinações de genes por todo o limite geográfico de uma espécie (SLATKIN, 1987). Quando reduzido ou ausente, as populações podem divergir e se diferenciar ao longo do tempo, podendo levar à especiação (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2004).

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 Manejo da Resistência de Insetos (MRI), pois 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 insetos (ROUSH; DALY, 1990; CAPRIO; TABASHNIK, 1991; CAPRIO; TABASHNIK, 1992). Esta relação foi observada por Daly (1993) na resistência a inseticidas em populações de *H. armigera* em campos de algodão da Austrália. Neste trabalho, a frequência de resistência a inseticidas do grupo dos piretróides declinou anualmente, devido à imigração de indivíduos suscetíveis para as populações do inseto que haviam recebido aplicações de inseticidas e/ou custo adaptativo associado à resistência.

No processo de evolução da resistência, o efeito do fluxo gênico pode ter reflexo em pequena e grande escala. Em pequena escala (populações locais) espera-se que o fluxo gênico contribua para a diluição da resistência levando ao cruzamento entre insetos resistentes e suscetíveis. Sua intensidade tem efeitos na taxa de aumento da frequência de genes para resistência. Assim, a capacidade de dispersão de um inseto-praga é relevante para a definição do tamanho e distribuição das áreas de refúgio, uma vez que, estas são os locais para a manutenção de indivíduos suscetíveis para a diluição da resistência nas áreas de plantas *Bt* (VACHER et al.,

2006). Em grande escala, o fluxo gênico pode determinar a possibilidade dos genes para a resistência se espalharem ao longo da área de distribuição geográfica da espécie. Esse fenômeno influencia a velocidade em que uma adaptação que surge em uma população local pode se espalhar.

A importância da variabilidade genética para programas de manejo de pragas tem sido discutida por décadas, mas seu estudo tornou-se possível apenas com o desenvolvimento de marcadores baseados na análise de DNA. A aplicação desses marcadores tornou-se uma ferramenta importante para o estudo da dinâmica e dos fatores que influenciam populações naturais (EDWARDS, 1993; SMITH; WAYNE, 1996).

Estimativas indiretas de fluxo gênico baseadas em marcadores genéticos podem fornecer pistas valiosas sobre o grau de conectividade das unidades populacionais (SLATKIN, 1985, 1987; RODERICK, 1996; BERRY; TOCHER; SARRE, 2004). Os diversos marcadores moleculares podem ser divididos em três classes de acordo com o método utilizado para a sua detecção: marcadores baseados na hibridização do DNA, como os polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição do DNA o RFLP –“*Restriction Fragment Length Polymorphism*”, os baseados na reação em cadeia da polimerase PCR (*Polymerase Chain Reaction*), tais como RAPD –“*Random Amplified Polymorphic*”, AFLP-*Amplified Fragment Length Polymorphisms* e o microssatélite-SSR; e os baseados na variação entre seqüências e na utilização de *chips* de DNA, como exemplo, os marcadores indel e SNP- *Single Nucleotide* (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996; AVISE, 2004). Dentre as diferentes classes e tipos de marcadores existentes, as seqüências de DNA mitocondrial (DNAmit) têm sido usadas com bons resultados para estudos populacionais de vários grupos de Lepidoptera (ROE; SPERLING, 2007), incluindo análises da estrutura de populações e fluxo gênico, biogeografia e relações filogenéticas (AVISE et al., 1987; LANG; GRAY; BURGER, 1999). O tamanho relativamente pequeno, a alta taxa de mudança evolutiva e a herança maternal do DNA mitocondrial, o tornam adequado para a análise de populações e sobre a história e a evolução entre táxons estreitamente relacionados (SIMON; FRANKE; MARTIN, 1991; CATERINO; CHO; SPERLING, 2000).

Em insetos, essas ferramentas moleculares podem ser incorporadas a modelos demográficos de multi ou metapopulações, os quais vêm sendo utilizados no entendimento da distribuição das populações em habitats naturais ou artificialmente fragmentados, enfocando as consequências da migração entre populações locais e a persistência regional de espécies com

populações locais instáveis (RODERICK, 1996; SCHMITT; HEWITT, 2004). Portanto, o estudo da estrutura genética de populações é um componente importante de programas de manejo e controle de pragas, pois podem fornecer informações sobre níveis de variabilidade genética, graus de diferenciação entre as populações e padrões de fluxo gênico. Além disso, pode possibilitar o monitoramento das mudanças na frequência de genes específicos. O entendimento da estrutura genética e do fluxo gênico intra-específico entre populações e subpopulações de uma determinada espécie de inseto-praga é essencial para se delinear melhores práticas de manejo com o objetivo de retardar a evolução da resistência a qualquer tática de controle de insetos, uma vez que, é por meio dos eventos de migração que os alelos que conferem resistência são rapidamente distribuídos entre as populações de um inseto-praga (CAPRIO; TABASHNIK, 1992; TABASHNIK, 1991).

Referências

- ALI, M.I.; LUTTRELL, R.G. Response estimates for assessing heliothine susceptibility to *Bt* toxins. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, p. 1935-1947, 2009.
- ALI, M.I.; LUTTRELL, R.G.; YOUNG, S.I. III Susceptibilities of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, p. 164-175, 2006.
- ANDOW, D. The risk of resistance evolution in insects of transgenic insecticidal crops. **Collection of Biosafety Reviews**, Trieste, v. 4, p. 142-199, 2008.
- ANDOW, D.A.; ALSTAD, D.N. The F₂ Screen for rare resistance alleles. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 91, p. 572-578, 1998.
- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history, and evolution**. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2004. 684 p.
- AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 18, p. 489-522, 1987.
- BERRY, O.; TOCHER, M.D.; SARRE, S.D. Can assignment tests measure dispersal? **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 551-561, 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.

CATERINO, M.S.; CHO, S.; SPERLING, F.A.H. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 45, p. 1-54, 2000.

DALY, J.C. Ecology and genetics of insecticides 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 de pragas do algodoeiro**. Dourados: UFM, 1998. 60 p.

DULMAGE, H.T.; MARTINEZ, E. The effects of continuous exposure to low concentrations of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* on the development of the tobacco budworm *Heliothis virescens*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 22, p. 14-22, 1973.

EDWARDS, S.V. Mitochondrial gene genealogy and gene flow among island and mainland populations of a sedentary songbird, the grey-crowned babbler (*Pomatodromus temporalis*). **Evolution**, Lancaster, v. 47, p. 1118-1137, 1993.

ENDLER, J.A. **Geographic variation, speciation, and clines**. Princeton: Princeton University Press, 1977. 262 p.

FABRICK, J.A.; TABASHNIK, B.E. Binding of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac to multiple sites of cadherin in pink bollworm. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, London, v. 37, p. 97-106, 2007.

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

FITT, G.P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 34, p. 17-52, 1989.

FITT, G.P.; OMOTO, C.; MAIA, A.H.; WAQUIL, J.M.; CAPRIO, M.; OKECH, M.A.; IA, E.; HUAN, N.H.E; ANDOW, D.A. Resistance risks of Bt cotton and their management in Brazil. In: HILBECK, A.; ANDOW, D.A; FONTES, E.M.G. (Ed.). **Environmental risk assessment of genetically modified organisms: methodologies for assessing Bt cotton in Brazil**. Cambridge: CABI Publ., 2006. p. 300-345.

GEORGHIO, G.P.; TAYLOR, C.E. Factors influencing the evolution of resistance. In: NATIONAL ACADEMIC OF SCIENCES. **Pesticides resistance: strategies and tactics for management**. Washington: National Academic Press, 1986. p. 157-169.

GERBER, S.; MARIETTE S.; STREIFF, R.; BODÉNÈS, C.; KREMER, A. Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, p. 1037-1048, 2000.

GOULD, F.; ANDERSON, A.; REYNOLDS, A.L.; BUNGARNER, L.; MOAR, W. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 88, p. 1545-1559, 1995.

GOULD, F.; ANDERSON, A.; JONES, A.; SUMERFORD, D.; HECKEL, D.G.; LOPEZ, J.; MICINSKI, S.; LEONARDI, R.; LASTER, M. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 3519-3523, 1997.

HECKEL, D.G.; GAHAN, L.J.; BAXTER, S.W.; ZHAO, J.Z.; SHELTON, A.M.; GOULD, F.; TABASHNIK, B.E. The diversity of *Bt* resistance genes in species of Lepidoptera. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 95, p. 192-197, 2007.

HUANG, F.N.; LEONARD, B.R.; ANDOW, D.A. Sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae) resistance to transgenic *Bacillus thuringiensis* maize. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, p. 164-171, 2007.

JALALI, S.K.; MOHAN, K.S.; SINGH, S.P.; MANUNATH, T.M.; LALITHA, Y. Baseline-susceptibility of the old-world bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) populations from India to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac insecticidal protein. **Crop Protection**, Memphis, v. 23, p. 53-59, 2004.

KEYGHOBADI, N.; ROLAND, J.; STROBECK, C. Genetic differentiation and gene flow among populations of the alpine butterfly, *Parnassius smintheus*, vary with landscape connectivity. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, p. 1897-1909, 2005.

LANG, B.F.; GRAY, M.W.; BURGER, G. Mitochondrial genome evolution and the origin of the Eukaryotes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 33, p. 351-397, 1999.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics: design, analysis and application**. Oxford: Blackwell, 2004. 326 p.

LUTTRELL, R.G.; WAN, L.; KNIGHTEN, K. Variation in susceptibility of Noctuidae (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, p. 21-32, 1999.

MARÇON, P.C.R.G.; YOUNG, L.G.; STEFFEY, K.L.; SIEGFRIED, B.D. Baseline susceptibility of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 92, p. 279-285, 1999.

MATTEN, S.R.; HEAD, G.P.; QUEMADA, H.D. How governmental regulation can help or hinder the integration of Bt crops within IPM programs. In: ROMEIS, J.; SHELTON, A.M.; KENNEDY, G.G. (Ed.). **Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs**. Dordrecht: Springer, 2008. p. 27-39.

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

MORIN, S.; BIGGS, R.W.; SISTERSON, M.S.; SHRIVER, L.; ELLERS-KIRK, C.; HIGGINSON, D.; HOLLEY, D.; GAHAN, L.J.; HECKEL, D.G.; CARRIERE, Y.; DENNEHY, T.J.; BROWN, J.K.; TABASHNIK, B.E. Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 5004-5009, 2003.

POOLE, R.W.; MITTER, C.; HUETTEL, M. **A revision and cladistic analysis of the *Heliothis virescens* species group (Lepidoptera: Noctuidae) with a preliminary morphometric analysis of *Heliothis virescens***. Minnesota: Mississippi Agricultural & Forestry Experiment Station, 1993. 185 p. (Technical Bulletin, 185).

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.

ROE, A.D.; SPERLING, F.A.H. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome *c* oxidase I and II DNA and implication for DNA barcoding. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 44, p. 325-345, 2007.

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

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

SCHMITT, T.; HEWITT, G.M. The genetic pattern of population threat and loss: a case study of butterflies. **Molecular ecology**, Oxford, v. 13, p. 21-31, 2004.

SCHNEIDER, J.C. Dispersal of a highly vagile insect in a heterogeneous environment. **Ecology**, Tempe, v. 80, n. 8, p. 2740-2749, 1999.

SCRIBNER, K.T.; BLANCHONG, J.A.; BRUGGEMAN, D.G.; EPPERSON, B.K.; LEE, C.; PAN, Y.; SHOREY, R.I.; PRINCE, H.H.; WINTERSTEIN, S.R.; LUUKKONEN, D.R. Geographical genetics: conceptual foundations and empirical applications of spatial genetic data in wildlife management. **Journal of Wildlife Management**, Bethesda, v. 69, n. 4, p. 1434-1453, 2005.

SIEGFRIED, B.D.; SPENCER, T.; NEARMAN, J. Baseline susceptibility of the corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) to the Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, p. 1265–1268, 2000.

SIEGFRIED, B.D.; VAUGHN, T.T.; SPENCER, T. Baseline susceptibility of Western Corn Rootworm (Coleoptera: Crysomelidae) to the Cry3Bb1 *Bacillus thuringiensis* toxin, **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 98, p. 1320–1324, 2005.

SIMON, C.; FRANKE, A.; MARTIN, A. The polymerase chain reaction: DNA extraction and amplification. In: HEWITT, G.M.; JOHNSTON, W.; YOUNG, J.P.W. (Ed.). **Molecular techniques in taxonomy**. Berlin: Springer-Verlag, 1991. p. 329-355.

SIMS, S.R.; GREENPLATE, J.P.; STONE, T.B.; CAPRIO, M.A.; GOULD, F.L. Monitoring strategies for early detection of Lepidoptera resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. In: BROWN, T.M. (Ed.). **Molecular genetics and evolution pesticides resistance**. Washington: American Chemical Society, 1996. p. 229-242. (Symposium Series, 645).

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

SLATKIN, M. Gene flow and geographic structure of nature populations. **Science**, Washington, v. 236, p. 787-792, 1987.

SMITH, T.B.; WAYNE, R.K. **Molecular genetic approaches in conservation**. Oxford: Oxford University Press, 1996. 478 p.

STONE, T.B.; SIMS, S.R. Geographic susceptibility of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 86, p. 989-994, 1993.

STORER, N.P.; BABCOCK, J.M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G.D.; BING, J.W.; HUCKABA, R.M. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 103, p. 1031-1038, 2010.

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

_____. Evolution to resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 39, p. 47-79, 1994.

TABASHNIK, B.E.; CARRIÈRE, Y. Field-evolved resistance to Bt cotton: bollworm in the U.S. and pink bollworm in India. **Southwestern Entomologist**, Weslaco, v. 35, p. 419-426, 2010.

TABASHNIK, B.E.; GASSMANN, A.J.; CROWDER, D.A.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, London, v. 26, n. 2, p. 199-202, 2008.

TABASHINIK, B.E.; VAN RENSBURG, J.B.J.; CARRIÈRE, Y. Field envolved insect resistance to *Bt* crops: definitions, theory and data. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 102, n. 2, p. 2011-2025, 2009.

TOMQUELSKI, G.V.; MARUYAMA, L.C.T. Lagarta-da-maçã em soja. **Revista Cultivar**, Pelotas, v. 117, p. 20-22, 2009.

VACHER, C.; BOURGET, D.; DESQUILBET, M.; LEMARIE, S.; AMBEC, S.; HOCHBERG, M.E. Fees or refuges: which is better for the sustainable management of insect resistance to transgenic *Bt* corn? **Biology Letters**, London, v. 2, p. 198-202, 2006.

VAN RENSBURG, J.B.J. First report of field resistance by stem borer, *Busseola fusca* (Fuller) to Bt-transgenic maize. **South. African Journal of Plant Soil**, South Africa, v.24, p.147-151, 2007.

XU, X.; YU, L.; WU, Y. Disruption of a cadherin gene associated with resistance to Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 21, p. 948-954, 2005.

3 SUSCETIBILIDADE À PROTEÍNA Cry1Ac EM POPULAÇÕES DE *Heliothis virescens* (Fabricius) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) COLETADAS NA CULTURA DO ALGODÃO NO BRASIL

Resumo

A lagarta-das-maçãs do algodoeiro, *Heliothis virescens* (Fabricius), é uma das pragas-alvo do algodão geneticamente modificado que expressa a proteína Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* Berliner (algodão Bt). Para estabelecimento de Programas de Manejo da Resistência de Insetos (MRI) no Brasil, objetivou-se avaliar a suscetibilidade à proteína Cry1Ac em populações de *H. virescens* coletadas nas principais regiões produtoras de algodão no Brasil (Bahia, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) nas safras agrícolas 2007/08 e 2008/09. Foram estimadas as linhas-básica de suscetibilidade de lagartas neonatas para proteína Cry1Ac, por meio de bioensaios de incorporação das concentrações da proteína em dieta artificial. As concentrações letais médias (CL₅₀) das populações avaliadas variaram de 0,18 a 0,66 µg de Cry1Ac/mL dieta (variação de ≈3,7 vezes). Da mesma forma, as concentrações efetivas médias para a inibição do desenvolvimento larval (CE₅₀) variaram de 0,0053 a 0,0161 µg de Cry1Ac/mL dieta (variação de ≈3,0 vezes). A partir da análise conjunta dos dados de concentração-mortalidade de resposta de todas as populações avaliadas, foram definidas e validadas as concentrações diagnósticas de 3,1 e 5,6 µg de Cry1Ac/mL dieta, para programas de monitoramento da resistência de *H. virescens* à proteína Cry1Ac no Brasil.

Palavras-chave: Algodão Bt; Monitoramento; Manejo de resistência

SUSCEPTIBILITY TO Cry1Ac PROTEIN IN *Heliothis virescens* (Fabricius) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) POPULATIONS COLLECTED IN COTTON CROP IN BRAZIL

Abstract

The tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Fabricius), is a target pest of genetically modified cotton expressing the *Bacillus thuringiensis*-derived Cry1Ac insecticidal protein (Bt cotton). As part of establishing an Insect Resistance Management (IRM) program for Bt cotton in Brazil, this study was set up to evaluate the susceptibility of field-collected populations of *H. virescens* to Cry1Ac. Insects were sampled from the main Brazilian cotton-growing regions (Bahia, Mato Grosso and Mato Grosso do Sul e Goiás) in the cropping seasons of 2007/08 and 2008/09. Cry1Ac susceptibility was estimated thereby using diet incorporation bioassays. The estimated LC₅₀ values varied from 0.18 to 0.66 µg of Cry1Ac/mL of diet among the 2007/08 populations (≈3.7 fold variation). Similarly, the EC₅₀ values based on growth inhibition ranged from 0.0053 to 0.0161 µg of Cry1Ac/mL of diet for the 2007/08 populations (≈3.0 fold variation). A joint analysis of the mortality data across all tested populations was used to develop candidate diagnostic concentrations for future monitoring programs. The proposed diagnostic concentrations of 3.1 and 5.6 µg of Cry1Ac/mL of diet were validated against field-collected populations from 2008/09 and will form the basis for future resistance monitoring programs with *H. virescens*.

Keywords: Bt cotton; Monitoring; Insect resistance management

3.1 Introdução

Plantas geneticamente modificadas que expressam genes que codificam proteínas inseticidas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) Berliner têm sido desenvolvidas e utilizadas para suprimir populações de pragas agrícolas. No Brasil, a liberação comercial do algodão *Bt* Bollgard® que expressa a proteína inseticida Cry1Ac foi aprovada em 2005 (CTNBio, 2005). Dentre as pragas-alvo do algodão Bollgard® destaca-se a lagarta-das-maçãs do algodoeiro *Heliothis virescens* (Fabricius). Essa praga também tem se destacado como importante problema fitossanitário na cultura da soja, principalmente, nas regiões produtoras do cerrado (TOMQUELSKI; MARUYAMA, 2009). Com a recente aprovação da soja *Bt*/RR2 MON 87701 × MON 89788, que também expressa a proteína Cry1Ac, a evolução da resistência de *H. virescens* à proteína Cry1Ac pode ser acelerada em locais em que o algodão e a soja *Bt* são cultivados.

Algumas características bioecológicas de *H. virescens*, tais como o seu elevado potencial reprodutivo, a capacidade de desenvolver de duas a três gerações em um único ciclo da cultura do algodão (DEGRANDE, 1998), o hábito alimentar polífago (FITT, 1989), a capacidade de dispersão em escalas local e inter-regional (FARROW; DALY, 1987; FITT et al., 2006), associadas ao intenso e complexo sistema de cultivos no Brasil, favorecem a evolução da resistência. Deste modo, medidas pró-ativas de manejo de resistência devem ser implementadas para preservar a vida útil do algodão *Bt* no Brasil.

Uma das etapas fundamentais para a implantação de estratégias de manejo da resistência está relacionada à caracterização de linhas-básicas de suscetibilidade a proteínas inseticidas de *Bt* (TABASHNIK et al., 2008). A existência de variabilidade natural de até 8 vezes na suscetibilidade de populações de *H. virescens* à proteína Cry1Ac foi reportada por Stone e Sims (1993), antes da liberação comercial do algodão *Bt* nos EUA. Experimentos com a seleção de populações resistentes em condições de laboratório mostraram o potencial de seleção artificial de *H. virescens* para resistência à proteína Cry1Ac e a outras proteínas derivadas de *Bt* (GOULD et al., 1995, 1997). Por exemplo, a linhagem YHD2 de *H. virescens* selecionada em laboratório apresentou alto nível de resistência (> 10.000), após 19 gerações de pressão de seleção com a proteína Cry1Ac (GOULD et al., 1995). Estudos de estimativa da frequência inicial de alelos que conferem resistência de *H. virescens* a Cry1Ac, constataram uma frequência inicial relativamente alta de $1,5 \times 10^{-3}$ (GOULD et al., 1997) e de 0,0036 a 0,0263 (BLANCO et al., 2009), o que

evidenciam a possibilidade de rápida evolução da resistência de *H. virescens* a essa proteína em condições de campo, caso estratégias de manejo da resistência não sejam implementadas.

Outra etapa fundamental para os programas de manejo da resistência a *Bt* está na definição de concentrações diagnósticas para mensurar as mudanças na frequência de resistência e detectar o problema no início da evolução da resistência (ROUSH; MILLER, 1986; MARÇON et al., 2000; WU et al., 2002; ALI; LUTTRELL; YOUNG, 2006).

No Brasil, mesmo após cinco anos de liberação da primeira planta *Bt* resistente a inseto (Bollgard®) não há informações detalhadas sobre a avaliação da suscetibilidade de *H. virescens* à proteína Cry1Ac. Dessa forma, o presente trabalho foi desenvolvido para caracterizar as linhas-básica de suscetibilidade à proteína Cry1Ac em populações de *H. virescens* coletadas nas principais regiões produtoras de algodão no Brasil e definir concentrações diagnósticas para futuros programas de monitoramento da resistência.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Populações de *Heliothis virescens*

A população suscetível de referência (S) foi obtida junto ao laboratório de Biologia de Insetos – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba-SP em 2007. As populações de campo de *H. virescens* foram coletadas em diferentes regiões produtoras de algodão durante as safras agrícolas de 2007/08 e 2008/09 (Quadro 3.1). As coletas foram realizadas no início das infestações a campo, sendo que em cada local foram coletadas aproximadamente 200 lagartas e encaminhadas ao Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas, ESALQ/USP, Piracicaba-SP.

Safra	Região	Município	Longitude	Latitude	Data de coleta
2007/2008	Bahia	Luís Eduardo Magalhães	45°48'18''O	12°05'31''S	11/3/2008
	Mato Grosso do Sul	Chapadão do Sul	52°37'22''O	18°47'38''S	22/4/2008
	Mato Grosso	Sinop	55°38'57''O	11°50'53''S	20/5/2008
	Goiás	Palmeiras	49°55'33''O	16°48'33''S	20/5/2008
2008/2009	Bahia	Riachão das Neves	44°54'36''O	11°50'53''S	04/3/2009
	Mato Grosso do Sul	Chapadão do Sul	52°37'22''O	18°47'38''S	31/3/2009
	Mato Grosso	Sapezal	58°48'51''O	13°32'33''S	16/6/2009
	Goiás	Rio Verde	50°55'40''O	17°47'52''S	30/4/2009
	Mato Grosso	Primavera do Leste	54°20'45''O	15°31'40''S	24/3/2009

Quadro 3.1 - Identificação das populações de *Heliothis virescens* amostradas em algodão em diferentes safras agrícolas, regiões, municípios, coordenadas geográficas e datas de coleta

3.2.2 Criação e manutenção das populações de *H. virescens*

As lagartas de *H. virescens* foram criadas em copos plásticos (50 ml), contendo dieta artificial à base de feijão branco (Tabela 3.1), vedados com uma placa acrílica circular. Em cada copo foi inoculada uma lagarta, a qual permaneceu até a fase de pupa. As pupas foram retiradas e acondicionadas em placas de Petri (10 cm de diâmetro $\times$ 1,5 cm de altura) forradas com papel filtro e recobertas por uma fina camada de vermiculita. Após a emergência, os adultos foram colocados em gaiolas cilíndricas de PVC (21,5 cm altura $\times$ 14,5 cm de diâmetro) revestidas internamente com papel jornal e fechadas na parte superior com tecido fino “voal”. Foram colocados 12 casais por gaiola, os quais foram alimentados por meio de um algodão saturado com solução aquosa de mel a 10%. As gaiolas foram mantidas em sala de criação a $25\pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. A cada dois dias os ovos foram coletados e acondicionados em recipientes plásticos (500 mL) contendo papel filtro umedecido com água destilada e incubados em câmara climatizada a $25\pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 14 horas.

Tabela 3.1 - Composição da dieta artificial utilizada para a criação de *Heliothis virescens* (Adaptada de GREENE; LEPPLA; DICKERSON, 1976)

Ingrediente	Quantidade
Feijão branco (g)	75,00
Germe de trigo (g)	60,00
Proteína de soja (g)	30,00
Caseína (g)	30,00
Levedura de cerveja (g)	37,50
Ágar (g)	22,50
Ácido ascórbico (g)	3,96
Ácido sórbico (g)	1,98
Nipagim (g)	3,30
Tetraciclina (mg)	124,00
Formaldeído 10% (mL)	15,90
Complexo vitamínico (mL)	9,90
Água (mL)	1200,00

3.2.3 Procedimentos de bioensaio com incorporação da proteína Cry1Ac na dieta

A fonte de proteína Cry1Ac utilizada foi a formulação em pó de MVP II (Dow Agrosiences, San Diego, EUA), contendo 11,14% de proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis* variedade *kurstaki*. O material foi mantido em freezer à temperatura de -20°C.

As diferentes concentrações da proteína Cry1Ac, previamente diluídas em água destilada, foram colocadas em tubos plásticos graduados de 50 mL com tampa. Em cada tubo foi colocado 4 mL da proteína diluída (ou somente água destilada no tratamento controle) e posteriormente foi adicionado 36 mL de dieta artificial na temperatura de 54±1°C até completar o volume final de 40 mL. A proteína foi incorporada na dieta por meio de um agitador do tipo Vortex e mantida em banho-maria na temperatura de 54±1°C. Aproximadamente 1 mL de dieta contendo as diferentes concentrações da proteína foi colocado em cada célula das bandejas de bioensaio com 128 células (BIO-BA-128, CD International Inc., Pitman, NJ), com auxílio de uma pipeta de repetição, baseado nos procedimentos descritos por Ali; Luttrell; Young (2006). Após a geleificação da dieta, uma lagarta neonata de 0-24 horas de idade foi inoculada em cada célula. As placas foram fechadas com lâminas plásticas auto-adesivas (BIO-CV-16, CD International Inc., Pitman, NJ) que permitem as trocas gasosas com o ambiente externo e mantidas em câmara climatizada a 27±2°C e fotoperíodo 14:10 (L:D) h. Os bioensaios foram avaliados após sete dias, considerando-se como critérios de resposta a mortalidade (sendo também consideradas mortas as lagartas que não ultrapassaram o primeiro ínstar) e o peso das lagartas sobreviventes de cada tratamento.

3.2.4 Linhas-básica de suscetibilidade de *H. virescens* à proteína Cry1Ac

Para caracterização toxicológica de *H. virescens* à proteína Cry1Ac foi utilizada a população suscetível de referência (S) e quatro populações de campo coletadas na safra agrícola 2007/08 (Quadro 3.1). Foram testadas de 5 a 8 concentrações da proteína Cry1Ac espaçadas entre 0,0018 - 3,1 µg de Cry1Ac/mL de dieta [ppm (I.A)], as quais foram incorporadas em dieta artificial. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 a 8 repetições para cada concentração, representadas por um grupo de 16 lagartas, sendo testadas no mínimo 64 lagartas por concentração. A atividade da proteína Cry1Ac foi verificada mediante a avaliação de mortalidade e redução do peso das larvas sobreviventes após sete dias da exposição à proteína inseticida. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit para as estimativas das concentrações letais (CL) e respectivos intervalos de confiança (IC 95%) por meio do programa

POLO-PC (LEORA SOFTWARE, 1987). Os dados referentes ao peso médio das lagartas sobreviventes foram submetidos à análise de regressão não-linear (SIMS et al., 1996) para as estimativas das concentrações efetivas (CE), mediante o uso do programa JMP versão 3.1 (SAS INSTITUTE, 2004).

Para estimativa das concentrações diagnósticas, os dados de mortalidade das cinco populações de *H. virescens* (população suscetível de referência e quatro populações de campo safra 2007/08) foram agrupados e analisados conjuntamente, segundo método proposto por Sims et al. (1996). Os dados de mortalidade foram submetidos ao modelo binomial com função de ligação complemento log-log (modelo CLL) que foi usado para descrever a relação entre a concentração da proteína e a probabilidade de mortalidade acumulada (ROBERTSON; PREISLER, 1992), utilizando-se o procedimento de Probit no programa SAS 9.1 (SAS INSTITUTE, 2004). Por meio deste modelo foi estimado a CL_{99} e seu respectivo intervalo de confiança (IC 95%) e definidas as concentrações diagnósticas para o monitoramento da suscetibilidade de *H. virescens* à proteína Cry1Ac, baseado em valores próximos do limite superior do IC 95% e de ≈ 2 vezes da estimativa da CL_{99} .

3.2.5 Monitoramento da suscetibilidade de *H. virescens* à proteína Cry1Ac

O monitoramento da suscetibilidade de *H. virescens* à proteína Cry1Ac foi realizado com populações de *H. virescens* coletadas em campo na safra agrícola 2008/09 (Quadro 3.1), além da população suscetível de referência (S), mediante bioensaios com concentrações diagnósticas previamente definidas. Foram realizadas 9 repetições (cada repetição, com 112 lagartas/tratamento e 16 lagartas na testemunha) distribuídas em bandejas de bioensaio de 128 células (BIO-BA-128, CD International Inc., Pitman, NJ), totalizando 1008 lagartas para cada concentração testada. Aos sete dias após a inoculação avaliou-se a mortalidade, sendo também consideradas mortas as lagartas vivas que não ultrapassaram o primeiro ínstar. Os dados de porcentagem de sobrevivência (x) obtidos para cada população foram transformados $\arcsin \sqrt{x/100}$ e submetidos à análise de variância. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey ($\alpha = 0,05$) no programa SAS 9.1 (SAS INSTITUTE, 2004).

3.3 Resultados

3.3.1 Caracterização da suscetibilidade de *H. virescens* à proteína Cry1Ac

As CL_{50} estimadas para as populações de *H. virescens* variaram de 0,18 a 0,66 μg de Cry1Ac/mL de dieta, representando uma diferença de apenas $\approx 3,7$ vezes entre as populações avaliadas (Tabela 3.2 e Figura 3.1). Entre as populações provenientes de campo avaliadas a variação na resposta entre as CL_{50} foi de apenas $\approx 2,3$ vezes. Para as populações de Sinop-MT, Luís Eduardo Magalhães-BA e Palmeiras-GO houve sobreposição do IC das CL_{50} indicando que essas populações não diferiram estatisticamente quanto à suscetibilidade à proteína Cry1Ac. A população de Chapadão do Sul-MS foi a mais suscetível à proteína Cry1Ac com $CL_{50} = 0,18$ (Tabela 3.2 e Figura 3.1). As CL_{90} variaram de 0,67 a 1,55 μg de Cry1Ac/mL de dieta.

Tabela 3.2 - Respostas de concentração-mortalidade à proteína Cry1Ac para lagartas neonatas da população suscetível de referência (S) e populações de campo de *H. virescens* coletadas na cultura do algodão na safra 2007/08, em bioensaio de incorporação da proteína em dieta artificial

Populações	n ⁽¹⁾	Coefficiente Angular ($\pm$ EP)	CL_{50} (IC 95%)	CL_{90} (IC 95%)	χ^2	g.l. ⁽²⁾
Suscetível de referência (S)	763	3,71 $\pm$ 0,36	0,66 (0,48-0,82)	1,47 (1,14-2,49)	9,96	4
Luís Eduardo Magalhães/BA	754	2,36 $\pm$ 0,20	0,33 (0,28-0,37)	1,14 (0,91-1,54)	1,46	4
Chapadão do Sul/MS	503	2,11 $\pm$ 0,18	0,18 (0,11-0,24)	0,72 (0,49-1,44)	12,04	5
Sinop/MT	317	2,36 $\pm$ 0,28	0,19 (0,10-0,31)	0,67 (0,38-4,64)	7,33	3
Palmeiras/GO	495	2,20 $\pm$ 0,23	0,41 (0,28-0,53)	1,55 (1,08-2,90)	7,38	5

⁽¹⁾ Número total de lagartas neonatas testadas

⁽²⁾ Graus de liberdade

Figura 3.1 - Linhas de concentração-mortalidade à proteína Cry1Ac para lagartas neonatas da população suscetível de referência (S) e populações de campo de *H. virescens* coletadas na cultura do algodão em diferentes regiões brasileiras na safra 2007/08, em bioensaio de incorporação da proteína em dieta artificial

Os valores estimados de CE_{50} variaram de 0,0053 a 0,016 μg de Cry1Ac/mL de dieta e os de CE_{90} de 0,1303 a 0,1999 μg de Cry1Ac/mL de dieta (Tabela 3.3). A variação na suscetibilidade à proteína Cry1Ac entre as populações foi de apenas $\approx 3,0$ vezes, baseado na CE_{50} . Em ambos os critérios de resposta, *H. virescens* foi altamente suscetível a proteína Cry1Ac. Entretanto, as respostas à inibição de crescimento foram consideravelmente mais sensíveis que os bioensaios de concentração-resposta da mortalidade para detecção de incipientes mudanças na suscetibilidade de *H. virescens* à proteína Cry1Ac, uma vez que, mesmo em baixas concentrações de Cry1Ac testadas houve grande redução no desenvolvimento larval (Figura 3.2).

Tabela 3.3 - Respostas da população suscetível de referência (S) e de populações de campo de *H. virescens* coletadas na safra 2007/2008 à proteína Cry1Ac em relação à inibição do crescimento larval em bioensaios de incorporação da proteína em dieta artificial

Populações	N ⁽¹⁾	CE ₅₀ ⁽²⁾ (IC 95%)	CE ₉₀ (IC 95%)
Suscetível de referência (S)	1085	0,0072 (0,0056 - 0,0089)	0,1559 (0,1114 - 0,2172)
Luís Eduardo Magalhães/BA	1444	0,0150 (0,0133 - 0,0167)	0,1303 (0,1069 - 0,1571)
Chapadão do Sul/MS	979	0,0053 (0,0038 - 0,0072)	0,1871 (0,1225 - 0,2935)
Sinop/MT	692	0,0056 (0,0039 - 0,0078)	0,1359 (0,0841 - 0,2295)
Palmeiras/GO	1085	0,0161 (0,0117 - 0,0212)	0,1999 (0,1398 - 0,2963)

⁽¹⁾ Número total de lagartas neonatas testadas

⁽²⁾ Concentração efetiva

Figura 3.2 - Porcentagem de mortalidade e inibição do crescimento de lagartas neonatas de *H. virescens* expostas a diferentes concentrações da proteína Cry1Ac em bioensaios com incorporação da proteína em dieta artificial

Foi estimada a $CL_{99} = 2,58$ (95% IC 2,12-3,29) μg de Cry1Ac/mL de dieta mediante a análise conjunta dos dados de concentração-mortalidade para todas as populações de *H. virescens* e definidas as concentrações diagnósticas de 3,1 μg de Cry1Ac/mL (valor próximo do limite superior do IC (95%) da CL_{99} e de 5,6 μg de Cry1Ac/mL (≈ 2 vezes a CL_{99}) para o monitoramento da suscetibilidade de *H. virescens* à proteína Cry1Ac (Figura 3.3).

Figura 3.3 - Análise conjunta dos dados, mediante o agrupamento dos dados obtidos com a caracterização toxicológica da população suscetível de referência (S) e de quatro populações de campo de *H. virescens* coletadas na safra 2007/08. A área hachurada indica a faixa de concentrações diagnósticas sugeridas para monitoramento da resistência

3.3.2 Monitoramento da suscetibilidade de *H. virescens* à proteína Cry1Ac

Diferenças significativas quanto à suscetibilidade à proteína Cry1Ac foram observadas entre as populações de *H. virescens* avaliadas (Tabela 3.4), tanto para a concentração diagnóstica de 3,1 μg de Cry1Ac/mL de dieta [ppm (I.A)] ($F = 13,26$; g.l. = 5, 373; $P < 0,0001$) quanto para a concentração de 5,6 μg de Cry1Ac/mL de dieta [ppm (I.A)] ($F = 11,62$; g.l. = 5, 373; $P < 0,0001$), com porcentagem de sobrevivência variando de 1,39 a 7,44% e 0,0 a 1,68%, respectivamente (Tabela 3.4). Na concentração diagnóstica de 3,1 μg de Cry1Ac/mL de dieta, as populações de Chapadão do Sul-MS e Rio Verde-GO diferiram significativamente da população suscetível de

referência, sendo que a população de Rio Verde-GO foi à única que diferiu significativamente de todas as populações avaliadas, apresentando sobrevivência de 7,44%. Na concentração diagnóstica de 5,6 µg de Cry1Ac/mL de dieta, as populações de Sapezal-MT, Primavera do Leste-MT e Chapadão do Sul-MS não apresentaram nenhuma sobrevivência de lagartas. Entretanto, as populações Riachão das Neves-BA e Rio Verde-GO por apresentarem maior porcentagem de sobrevivência 1,29% e 1,68%, respectivamente, diferiram estatisticamente das demais populações (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 - Porcentagem de sobrevivência $\pm$ erro padrão de populações de *H. virescens* coletadas em diferentes regiões produtoras de algodão na safra 2008/09, em bioensaios com incorporação da proteína Cry1Ac em dieta artificial

Populações	Concentrações (µg/mL)	
	3,1	5,6
Suscetível de referência (S)	1,39 $\pm$ 0,50 a	0,40 $\pm$ 0,20 a
Sapezal/MT	2,05 $\pm$ 0,24 ab	0,00 $\pm$ 0,00 a
Primavera do Leste/MT	2,08 $\pm$ 0,40 ab	0,00 $\pm$ 0,00 a
Riachão das Neves/BA	2,88 $\pm$ 0,52 ab	1,29 $\pm$ 0,35 b
Chapadão do Sul/MS	4,46 $\pm$ 0,67 b	0,00 $\pm$ 0,00 a
Rio Verde/GO	7,44 $\pm$ 1,02 c	1,68 $\pm$ 0,40 b

Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ($\alpha=0,05$)

3.4 Discussão

Baseada nas estimativas de CL₅₀, diferenças na suscetibilidade à proteína Cry1Ac de $\approx 3,7$ vezes foram detectadas entre as populações de *H. virescens* avaliadas (Tabela 3.3 e Figura 3.1). Os valores de coeficientes angulares das populações avaliadas foram menores que o valor da população suscetível de referência (Tabela 3.3), os quais indicam maior heterogeneidade na resposta à proteína Cry1Ac para as populações de campo. De acordo com French-Constant e Roush (1990), quanto maior o coeficiente angular, maior a homogeneidade na resposta a um determinado agente de controle. Entre as populações provenientes de campo avaliadas, a variação na resposta entre as CL₅₀ foi de apenas $\approx 2,3$ vezes. Para as populações de Sinop-MT, Luís Eduardo Magalhães-BA e Palmeiras-GO houve sobreposição do IC das CL₅₀ indicando que essas populações não diferiram estatisticamente quanto à suscetibilidade à proteína Cry1Ac. Das

populações de campo, a de Chapadão do Sul-MS foi a mais suscetível à proteína Cry1Ac (Tabela 3.3 e Figura 3.1). Portanto, a variabilidade nas respostas de populações de *H. virescens* à proteína Cry1Ac foi baixa. Variações relativamente baixas na suscetibilidade de *H. virescens* à proteína Cry1Ac também foram reportadas nos EUA. Stone e Sims (1993) avaliaram a suscetibilidade de *H. virescens* à proteína Cry1Ac antes da liberação comercial do algodão *Bt* nos EUA, e verificaram uma variabilidade na resposta à Cry1Ac entre as populações de oito vezes. Luttrell; Wan e Knighten (1999) verificaram variação de cinco vezes na resposta à Cry1Ac, em populações de *H. virescens* de diferentes regiões dos EUA. De modo semelhante, Ali; Luttrell; Young (2006) verificaram variação de quatro vezes na suscetibilidade de *H. virescens* à proteína Cry1Ac entre populações de laboratório e campo de diferentes regiões dos EUA. Estudo realizado por Gould et al. (1997) para estimar a frequência inicial de alelos da resistência à proteína Cry1Ac, indicaram uma frequência inicial relativamente alta de $1,5 \times 10^{-3}$ em populações de campo de *H. virescens* coletadas em diferentes regiões dos EUA. Portanto, esses estudos demonstram a existência de um potencial relativamente alto dessa espécie para evolução da resistência, caso estratégias de manejo não sejam implementadas.

As pequenas variações na suscetibilidade à proteína Cry1Ac em populações de *H. virescens* avaliadas no presente estudo podem estar relacionadas às variações naturais entre as populações e não à pressão de seleção devido à exposição à proteína *Bt*, pois essas populações foram coletadas no início do cultivo de algodão *Bt* no Brasil. Por outro lado, há possibilidade de uma seleção pretérita com aplicações de *Bt* em pulverização em algumas regiões do Brasil. Conforme relatado para outras espécies de insetos, tais diferenças na suscetibilidade podem ser devido às diferenças na aptidão (crescimento e desenvolvimento) de cada população (ROSSITER; YENDOL; DUBOIS, 1990; MARÇON et al., 1999), variações incontroláveis na condução dos bioensaios ou outros fatores não-genéticos (SIMS et al., 1996).

O critério de mortalidade de neonatas sete dias após o tratamento tem sido usualmente utilizado para mensurar a suscetibilidade de *H. virescens* a proteínas de *Bt* (LUTTRELL; WAN; KNIGHTEN, 1999; SIEGFRIED; SPENCER; NEARMAN, 2000; ALI; LUTTRELL, 2007). Entretanto, além da mortalidade, as proteínas de *Bt* podem causar o enfezamento larval por meio da inibição da muda dos insetos (troca de tegumento das lagartas) e redução de desenvolvimento (SIMS et al., 1996; ALI; LUTTRELL; YOUNG, 2006). Isso também foi constatado no presente trabalho, em que as respostas à inibição de crescimento foram consideravelmente mais sensíveis

que os bioensaios de concentração-resposta da mortalidade para detecção de mudanças na suscetibilidade de *H. virescens* à proteína Cry1Ac (Tabela 3.3 e Figura 3.2). De acordo com Sims et al. (1996), o efeito das proteínas inseticidas de *Bt* sobre o desenvolvimento do inseto pode impedir que o mesmo atinja à fase adulta e, conseqüentemente, complete seu ciclo biológico (DULMAGE; MARTINEZ, 1973). Dessa forma, a inibição do crescimento é um efeito importante provocado pela ingestão de proteínas inseticidas de *B. thuringiensis*, que pode ser, potencialmente, incluído na avaliação da suscetibilidade as proteínas de *Bt* (ALI; LUTTRELL, 2009). Sims et al. (1996) e Wu, Guo e Lv (1999) propuseram que a inibição da troca do tegumento larval ou do crescimento larval são parâmetros mais adequados para avaliar a resposta de lagartas de Lepidoptera a proteínas inseticidas de *Bt*.

Trabalhos rotineiros de monitoramento da suscetibilidade de insetos-praga têm sido conduzidos por meio do uso de concentrações diagnósticas (ROUSH; MILLER, 1996; MARÇON et al., 2000; SIEGFRIED et al., 2007) ao invés da estimativa das CL₅₀. Esta abordagem requer o conhecimento das relações de concentração-resposta entre as espécies-alvo a proteínas de *Bt*, além da definição de concentrações diagnósticas. O uso da inibição da troca de tegumento nas larvas ou redução no crescimento larval pode aumentar a potência efetiva das proteínas inseticidas de *Bt* (ALI; LUTTRELL, 2009), e desta forma maximizar a possibilidade de detectar a resistência nas populações do inseto-praga (GOULD, 2000). Para o monitoramento, as avaliações de inibição de crescimento (CE) são consideravelmente mais sensíveis do que os bioensaios de concentração-mortalidade para a detecção de mudanças na suscetibilidade de *H. virescens* à proteína Cry1Ac (SIMS et al., 1996). Entretanto, a CE muitas vezes não tem sido utilizado porque requer a pesagem das lagartas, o que pode tornar os bioensaios um procedimento incompatível com a larga escala dos programas de monitoramento.

Para o monitoramento da suscetibilidade de *H. virescens* à proteína Cry1Ac, as potenciais concentrações diagnósticas determinadas mediante a análise conjunta dos dados de concentração-mortalidade para todas as populações de *H. virescens* foram 3,1 e 5,6 µg de Cry1Ac/mL de dieta. Na safra 2008/09, os resultados do monitoramento da suscetibilidade de *H. virescens* nas concentrações letais de 3,1 e 5,6 µg de Cry1Ac/mL de dieta indicaram diferenças significativas na sobrevivência à proteína Cry1Ac entre as regiões estudadas. Entretanto, já foi constatada variabilidade natural na resposta de *H. virescens* quanto à suscetibilidade à proteína Cry1Ac nas diferentes regiões de cultivo de algodão do Brasil mediante as curvas de concentração-resposta

determinadas na safra 2007/2008. Vale ressaltar que as lagartas sobreviventes em ambas as concentrações diagnósticas não atingiram o terceiro ínstar. Por outro lado, todas as lagartas sobreviventes na testemunha haviam atingido o terceiro ínstar no momento da avaliação dos bioensaios. Portanto, para a detecção da resistência em programas de monitoramento da resistência é de fundamental importância que seja adicionado outros critérios de respostas como inibição da troca de tegumento e ou inibição do crescimento dos insetos nos protocolos de monitoramento de rotina (ALI; LUTTRELL, 2009).

Nas condições brasileiras os cultivos de plantas *Bt* poderão ser explorados de modo intensivo, dando origem a um considerável número de diferentes composições de mosaicos de plantas *Bt* em sistemas de produção de cultivos. Dessa forma, há necessidade de considerar os diferentes regimes de seleção aos quais os insetos estarão sendo expostos devido à diversidade de cultivos com plantas *Bt* e o sistema de produção agrícola de cada região. Para a avaliação da efetividade de qualquer estratégia de manejo da resistência, os programas de monitoramento da suscetibilidade das populações das pragas-alvo serão fundamentais para preservar a vida útil das plantas *Bt*.

3.5 Conclusões

- Há baixa variabilidade natural ($\approx 3,7$ vezes) na suscetibilidade à proteína Cry1Ac em populações de *Heliothis virescens* no Brasil;
- As concentrações diagnósticas de 3,1 e 5,6 μg de Cry1Ac/mL dieta podem ser utilizadas em programas de monitoramento da suscetibilidade de *H. virescens*, mediante bioensaios com incorporação da proteína Cry1Ac em dieta artificial.

Referências

ALI, M.I.; LUTTRELL, R.G. Susceptibilities of bollworm and tobacco budworm. (Lepidoptera: Noctuidae) to Cry2Ab2 insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 100, p. 921-931, 2007.

_____. Response estimates for assessing *Heliothine* susceptibility to Bt toxins. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.102, n.5, p.1935-1947, 2009.

ALI, M.I.; LUTTRELL, R.G.; YOUNG, S.I. Suscetibilidade of *Helicoverpa zea* e *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) population to Cry1Ac insecticida Protein. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 99, p. 164-175, 2006.

BLANCO, C.A.; GOULD, F.; VEGA-AQUINO, P.; JURAT-FUENTES, J.L.; PERERA, O.P.; ABEL, C.A. Response of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strains to *Bacillus thuringiensis* cry1Ac incorporated into different insect artificial diets. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 102, n. 4, p. 1599-1606, 2009.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. **Liberação comercial de algodão geneticamente modificado resistente as principais pragas da Ordem Lepidoptera:** Parecer Técnico Prévio Conclusivo Nº 513/2005. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12526.html>>. Acesso em: 20 jan. 2011.

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

DULMAGE, H.T.; MARTINEZ, E. The effects of continuous exposure to low concentrations of the d-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* on the development of the tobacco budworm, *Heliothis virescens*. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 22, p. 14-22, 1973.

FARROW, R.A.; DALY, J.C. Longrange movements as an adaptive strategy in the genus *Heliothis* (Lepidoptera: Noctuidae); a review of its occurrence and detection in four pest species. **Australian Journal of Zoology**, Melbourne, v. 35, p. 1 -24, 1987.

FITT, G.P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 34, p. 17-52, 1989.

FITT, G.P.; OMOTO, C.; MAIA, A.H.; WAQUIL, J.M.; CAPRIO, M.; OKECH, M.A.; IA, E.; HUAN, N.H.E.; ANDOW, D.A. Resistance risks of Bt cotton and their management in Brazil. In: HILBECK, A.; ANDOW, D.A.; FONTES, E.M.G. (Ed.). **Environmental risk assessment of genetically modified organisms: methodologies for assessing Bt cotton in Brazil**. Cambridge: CABI Publ., 2006. p. 300-345.

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.

GOULD, F. Testing *Bt* refuge strategies in the field. **Nature Biotechnology**, London, v. 18, p. 266-267, 2000.

GOULD, F.; ANDERSON, A.; REYNOLDS, A.L.; BUNGARNER, L.; MOAR, W. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 88, p. 1545-1559, 1995.

GOULD, F.; ANDERSON, A.; JONES, A.; SUMERFORD, D.; HECKEL, D.G.; LOPEZ, J. MICINSKI, S.; LEONARDI, R.; LASTER, M. Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 94, p. 3519-3523, 1997.

GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

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

LUTTRELL, R.G.; WAN, L.; KNIGHTEN, K. Variation in susceptibility of Noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, p. 21-32, 1999.

MARÇON, P.C.R.G.; SIEGFRIED, B.D.; SPENCER, T.; HUTCHISON, W.D. Development of diagnostic concentrations for monitoring *Bacillus thuringiensis* resistance in European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 93, n. 3, p. 925-930, 2000.

MARÇON, P.C.R.G.; YOUNG, L.G.; STEFFEY, K.L.; SIEGFRIED, B.D. Baseline susceptibility of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 92, p. 279-285, 1999.

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

ROSSITER, M.; YENDOL, W.G.; DUBOIS, N.R. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae): genetic and environmental causes. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 83, p. 2211-2218, 1990.

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

SAS INSTITUTE. **SAS user's guide statistics**. Cary, 2004.

SIEGFRIED, B.D.; SPENCER, T.; NEARMAN, J. Baseline susceptibility of the corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) to the Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 93, p. 1265-1268, 2000.

SIEGFRIED, B.D.; SPENCER, T.; CRESPO, A.L.; STORER, N.P.; HEAD, G.P.; OWENS, E.D.; GUYER, D. Ten years of *Bt* resistance monitoring in the European corn borer: what we know, what we don't know, and what we can do better. **American Entomological**, Lanham, v. 53, p. 208-214, 2007.

SIMS, S.R.; GREENPLATE, T.B.; STONE, T.B.; CAPRIO, M.A.; CAPRIO, M.A.; GOULD, F.L. Monitoring strategies for early detection of Lepidoptera resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. In: BROWN, T.M. (Ed.). **Molecular genetics and evolution of pesticides resistance**. Washington: American Society, 1996. p. 229-242.

STONE, T.B.; SIMS, S.R. Geographic susceptibility of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 86, p. 989-994, 1993.

TABASHNIK, B.E.; GASSMANN, A.J.; CROWDER, D.A.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 2, p. 199-202, 2008.

TOMQUELSKI, G.V.; MARUYAMA, L.C.T. Lagarta-da-maçã em soja. **Revista Cultivar**, Pelotas, v. 117, p. 20-22, 2009.

WU, K.; GUO, Y.; LV, N. Geographic variation in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein in China. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, p. 273-278, 1999.

WU, K.; GUO, Y.; LV, N.; GREENPLATE, J.T.; DEATON, R. Resistance monitoring of *Helicoverpa armigera* to *Bacillus thuringiensis* insecticidal protein in China. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 95, p. 826-831, 2002.

4 VARIABILIDADE GENÉTICA E FLUXO GÊNICO INFERIDOS POR MARCADORES MITOCONDRIAIS EM POPULAÇÕES DE *Heliothis virescens* (Fabricius) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NO BRASIL

Resumo

A lagarta-da-maçã do algodoeiro, *Heliothis virescens* (Fabricius), é amplamente distribuída, ocorrendo desde a América do Sul até a América do Norte. Essa espécie tem sido de grande importância econômica nas culturas de algodão e soja no Brasil, principalmente com a expansão da agricultura nas regiões do cerrado. Entretanto, pouco se conhece sobre a estrutura genética e padrões de fluxo gênico nas escalas locais e regionais de *H. virescens* visando à implementação de programas efetivos de manejo dessa praga no Brasil. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a variabilidade genética e o fluxo gênico entre populações de *H. virescens* utilizando marcadores de DNAm (subunidades I e II da citocromo oxidase – *COI* e *COII* – e a subunidade 6 da desidrogenase dinucleotídica da adenina nicotinamida – *nad6*). Foram avaliadas 11 populações de *H. virescens*, totalizando 120 indivíduos provenientes de populações coletadas nas culturas de algodão (safras 2007/08, 2008/09 e 2009/10) e soja (safra 2009/10) nas principais regiões de cultivo no Brasil (Bahia, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul). Baseadas em análises de agrupamento (“Neighbor-Joining” e Análise de Componentes Principais) e Bayesiana (Structure) foram verificadas uma baixa estruturação entre as populações de *H. virescens* de diferentes regiões, bem como para aquelas coletadas em plantas hospedeiras diferentes. As análises de AMOVA indicaram baixa estruturação genética entre as populações estudadas independente da cultura ($F_{st} = 0,019$) ou escala geográfica ($F_{st} = 0,012$), sugerindo um nível significativo de fluxo gênico. Em média, a distância genética entre as amostras foi de 0,1%. Uma rede de haplótipos obtida com os dados combinados resultou em 35 haplótipos, com quatro haplótipos únicos presentes somente nas amostras coletadas em soja. A principal característica dessa rede é a forma de estrela na distribuição dos haplótipos, bem como a ocorrência de muitos alelos em baixa frequência. Esse tipo de rede é característico de populações que passaram por uma recente expansão populacional e, de fato, a história demográfica de *H. virescens*, baseada no teste de distribuição da diferença genética par-a-par entre haplótipos (distribuição de *Mismatch*) e nos resultados negativos nos testes de neutralidade seletiva indicam também um episódio de expansão populacional recente.

Palavras-chave: DNA mitocondrial; Fluxo gênico; Lagarta-da-maçã do algodoeiro

GENETIC VARIABILITY INFERRED BY MITOCHONDRIAL MARKERS IN BRAZILIAN POPULATIONS OF *Heliothis virescens* (Fabricius) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

Abstract

The tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Fabricius), is widely distributed, occurring from South America to North America. This species is of great economic importance in cotton and soybean crops in Brazil, mainly with the expansion of the agriculture in the savannah regions. However, little is known about the genetic structure and gene flow patterns of *H. virescens* at local and regional levels to implement effective programs for managing this pest in Brazil.

Therefore, the objective of this study was to evaluate the genetic variability among *H. virescens* populations with mitDNA markers (cytochrome oxidase subunits I and II – *COI* e *COII* – and the subunit 6 of dinucleotide dehydrogenase of adenine nicotinamide – *nad6*). We evaluated a total of 120 specimens from 11 populations of *H. virescens* collected in cotton (2007/08, 2008/09 and 2009/10 cropping seasons) and soybean (2009/10 cropping season) from major agricultural regions in Brazil (Bahia, Goiás, Mato Grosso and Mato Grosso do Sul). Based on cluster analysis (Neighbor-Joining and Principal Coordinate Analysis) and Bayesian analysis (Structure), a low structure was detected among *H. virescens* populations either by regions or host plants. AMOVA analysis also indicated low genetic structure among *H. virescens* populations across crops ($F_{st}=0.019$) or geographic scale ($F_{st}=0.012$), suggesting a significant gene flow. The mean genetic distance among samples was 0.1%. The haplotype network obtained with joint data resulted in 35 haplotypes, with four unique haplotypes present only in samples collected from soybean crop. The major characteristics of the haplotype network were the star-like pattern and the occurrence of many alleles at low frequencies. This type of network is typical for populations that passed through a recent population expansion and, in fact, the demographic history of *H. virescens*, based on distribution test of pair-wise genetic difference among haplotypes (*Mismatch distribution*) and negative results from tests of selective neutrality also indicate an episode of a recent population expansion.

Keywords: Mitochondrial DNA; Gene flow; Tobacco budworm

4.1 Introdução

Estudos de genética de populações de pragas agrícolas têm destacado a importância do conhecimento da variabilidade genética e do fluxo gênico para a implementação de estratégias efetivas no Manejo Integrado de Pragas (MIP) (KRAFSUR, 2005). Como as populações de insetos-praga estão frequentemente sujeitas à aplicação de medidas de fitoproteção, tais como inseticidas e culturas transgênicas, a evolução da resistência é fortemente influenciada pela sua estrutura populacional (FUENTES-CONTRERAS et al., 2008). Além disso, a variação no espaço e no tempo da estrutura genética de uma população de uma determinada praga, juntamente com o fluxo gênico entre as suas subpopulações, tem grande influência sobre a taxa de evolução da resistência (DALY, 1993; HOY, 1998). A estimativa do fluxo gênico pode ser difícil de ser mensurada diretamente, mas tem sido realizada a partir do uso de marcadores moleculares, e funcionado como um índice para avaliar as taxas de dispersão entre diferentes populações de insetos (SLATKIN, 1985; RODERICK, 1996).

Dentre as diferentes classes e tipos de marcadores existentes (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1996), as sequências de DNA mitocondrial (DNAmit) têm sido usadas com bons resultados para estudos populacionais de vários grupos de Lepidoptera (ROE; SPERLING,

2007), incluindo análises da estrutura de populações e fluxo gênico, biogeografia e relações filogenéticas (AVISE et al., 1987; LANG; GRAY; BURGER, 1999). O tamanho relativamente pequeno, a alta taxa de mudança evolutiva e a herança maternal do DNAmít, o tornam adequado para a análise de populações e sobre a história e a evolução entre táxons estreitamente relacionados (SIMON; FRANKE; MARTIN, 1991; CATERINO; CHO; SPERLING, 2000). Além disso, uma das principais vantagens do uso do DNAmít nos estudos de filogeografia está relacionada à relativa falta de recombinação, que na prática significa que, na ausência de mutações, todos os descendentes terão o mesmo genoma mitocondrial materno, o que possibilita que linhagens individuais possam ser traçadas ao longo do tempo e do espaço (FREELAND, 2006). Atualmente, devido à disponibilização de genomas completos de várias espécies de Lepidoptera (CAMERON; WHITING, 2008; YANG et al., 2009) é possível realizar a avaliação e o estabelecimento de novos genes para estudos em todos os níveis taxonômicos neste grupo, dos quais pode se destacar as subunidades da desidrogenase dinucleotídica da adenina nicotinamida (NADH) para estudos de genética populacional (CAMERON; WHITING, 2008; MERANER et al., 2008; MILLER et al., 2009; GOMEZ-P et al., 2009).

Heliothis virescens (Fabricius) é uma praga migratória facultativa, com capacidade de se dispersar em escalas locais e inter-regionais (FARROW; DALY, 1987). O principal hospedeiro dessa praga é o algodão (*Gossypium hirsutum* L.), que tem sido atacado em níveis variáveis nas principais regiões algodoeiras no Brasil (DEGRANDE, 1998). *H. virescens* apresenta comportamento alimentar polífago e, além do algodão, pode alimentar-se de soja, tomate, milho, tabaco e feijoeiro (FIIT, 1989). A capacidade de dispersão dos adultos dessa praga permite que esse inseto se dissemine rapidamente ao longo da faixa de distribuição de suas plantas hospedeiras (FARROW; DALY, 1987).

Devido ao uso excessivo de inseticidas para o controle desta praga, *H. virescens* já demonstrou habilidade em evoluir resistência (McCAFFERY, 1998), o que torna seu manejo especialmente difícil. Uma forma alternativa de controlar o ataque desse inseto-praga é o uso do algodão geneticamente modificado (GM) contendo genes da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*). No entanto, o potencial de evolução de resistência de populações de insetos às proteínas de *Bt* é uma das principais ameaças e limitações ao emprego sustentável desta tecnologia para o controle de pragas agrícolas. Embora várias estratégias tenham sido propostas para retardar a resistência às plantas GM (TABASHNIK, 1994; ALSTAD; ANDOW, 1995), o

foco tem sido a estratégia de refúgio, ou seja, áreas de cultivos de plantas hospedeiras que não expressam toxinas de *Bt* mantidas nas proximidades das plantas GM tóxicas (GOULD, 1998). Outra fonte de indivíduos suscetíveis para acasalar com indivíduos resistentes que poderiam ser selecionados nas áreas de algodão *Bt* seriam hospedeiros alternativos presentes na região. No entanto, para que esses indivíduos possam ser efetivamente considerados como fonte de suscetibilidade para o manejo da resistência, estas plantas alternativas devem conter populações da praga alvo que possam acasalar ao acaso com aquelas populações emergindo das culturas GM (MARTEL et al., 2003). Desse modo, o entendimento da estrutura genética e do fluxo gênico entre populações de uma praga é essencial para o delineamento de práticas de manejo que visem retardar a evolução da resistência a qualquer tática de controle de insetos.

O principal objetivo desse trabalho foi avaliar a variabilidade genética e o fluxo gênico entre populações de *H. virescens* coletadas nas principais regiões produtoras de algodão e soja no Brasil, usando sequências de genes mitocondriais (subunidades I e II da citocromo oxidase – *COI* e *COII* – e a subunidades 6 da desidrogenase dinucleotídica da adenina nicotinamida – *nad6*) para acessar sua variação genética. Foram realizados estudos para (a) estimar a variabilidade genética e o fluxo gênico em populações de algodão coletadas em diferentes safras agrícolas e (b) estimar o fluxo gênico entre populações amostradas em algodão e em soja que ocorrem nas mesmas regiões produtoras.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Espécimes

Onze populações de *H. virescens*, foram amostradas na cultura do algodão nas safras de 2007/2008, 2008/2009 e 2009/2010, e na cultura da soja, na safra 2009/2010 (Quadro 4.1). As coletas foram realizadas no início das infestações a campo e encaminhadas ao Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas, ESALQ/USP, Piracicaba-SP. Para a obtenção dos adultos, as lagartas de *H. virescens* oriundas do campo foram criadas em copos plásticos (50 mL), contendo dieta artificial à base de feijão branco vedados com uma placa acrílica circular. Em cada copo foi inoculada uma lagarta, a qual permaneceu até a fase de pupa. As pupas foram retiradas e acondicionadas em placas de Petri (10 cm de diâmetro × 1,5 cm de altura) forradas com papel

filtro e recobertas por uma fina camada de vermiculita até a emergência dos adultos, os quais foram imediatamente congelados à temperatura de -20°C até a extração de DNA.

Locais de coleta	Longitude	Latitude	Mês/ano de coleta	Código	Cultura	Total de espécimes	Genes/total de espécimes sequenciados		
							<i>COI</i>	<i>COII</i>	<i>nad6</i>
Luís Eduardo Magalhães, BA	45°48'18"O	12°05'31"S	03/2008	BA08algodão	Algodão	10	10	8	10
Palmeiras, GO	49°55'33"O	16°48'33"S	05/2008	GO08algodão	Algodão	12	11	11	12
Chapadão do Sul, MS	52°37'22"O	18°47'38"S	04/2008	MS08algodão	Algodão	13	13	11	13
Sinop, MT	55°38'57"O	11°50'53"S	05/2008	MT08algodão	Algodão	8	8	8	8
Riachão das Neves, BA	44°54'36"O	11°50'53"S	03/2009	BA09algodão	Algodão	11	11	4	11
Rio Verde, GO	50°55'40"O	17°47'52"S	04/2009	GO09algodão	Algodão	16	16	14	16
Primavera do Leste, MT	54°20'45"O	15°31'40"S	03/2009	MTPL09algodão	Algodão	6	2	4	6
Sapezal, MT	58°48'51"O	13°32'33"S	06/2009	MT09algodão	Algodão	12	12	11	12
Luís Eduardo Magalhães, BA	45°48'18"O	12°05'31"S	01/2010	BA10algodão	Algodão	10	10	9	10
Luís Eduardo Magalhães, BA	45°48'18"O	12°05'31"S	01/2010	BA10Soja	Soja	12	11	11	12
Chapadão do Sul, MS	52°37'22"O	18°47'38"S	01/2010	MS10Soja	Soja	10	9	10	10

Quadro 4.1 - Identificação das amostras de *H. virescens*, com localidade, data de coleta no campo, código da população e total de espécimes coletados e sequenciados

4.2.2 Extração, amplificação e sequenciamento do DNAMit

O DNA total dos espécimes de *H. virescens* foi extraído a partir de tecido fresco do tórax de indivíduos adultos, totalizando 120 indivíduos das populações avaliadas (Quadro 4.1), conforme protocolo do Invisorb Spin Tissue kit (Uniscience). As subunidades I e II do gene mitocondrial *citocromo oxidase* (*COI* e *COII*, ≈2300 pb) e a subunidade 6 da desidrogenase dinucleotídica da adenina nicotinamida (*nad6*, ≈500 pb) foram escolhidos para as análises populacionais desses indivíduos. A região *nad6* foi usada como marcador complementar para o estudo da variabilidade genética em quatro espécies de lepidópteros-praga incluindo *H. virescens*, onde Silva-Brandão¹ concluiu que essa região pode ser usada como um complemento a outras regiões em estudos sobre a estimativa de variabilidade genética em populações desse grupo (informação verbal).

Os iniciadores (*primers*) utilizados para amplificar cada uma das regiões propostas juntamente com os respectivos programas de amplificação específicos para cada uma das regiões estão apresentados no Quadro 4.2. As reações de PCR foram feitas para um volume final de 50 µL, contendo Tampão (10×), 40 µM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl, 0,2 mM de cada iniciador, 1U of GoTaq[®] DNA Polimerase (Promega), 5,0 mL de BSA na concentração de 0,5 mg/mL, 2,0 µL DNA genômico de amostras de *H. virescens*. Os produtos das amplificações foram purificados usando o kit Invisorb Fragment CleanUp (Invitex). Após a amplificação e purificação de cada região, elas foram sequenciadas utilizando o mesmo conjunto de iniciadores usados nas amplificações. As regiões sequenciadas foram analisadas no programa FinchTV v. 1.4.0 (Geospiza Inc.) e alinhadas manualmente no programa BioEdit v. 7.0.5.3 (HALL, 1999). Posteriormente, estas sequências serão depositadas no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/>).

¹ SILVA- BRANDÃO, K.L. Bolsista Pró-Doc Capes. ESALQ/USP. Departamento de Entomologia e Acarologia.

Gene	Iniciador	F/R	Sequência (5→3)	Programas
<i>COI</i> – 5′	LCO ⁽¹⁾	F	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	1 ciclo: 95°C - 5 min, 35 ciclos: 94°C - 30 seg, 47°C - 30 seg e 72°C - 1 min e 30 seg, 1 ciclo 72°C - 10 min.
	HCO ⁽¹⁾	R	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA	
<i>COI</i> – 3′	Jerry ⁽²⁾	F	CAA CAY TTA TTT TGA TTT TTT GG	1 ciclo: 95°C - 5 min, 35 ciclos: 94°C - 30 seg, 45°C - 30 seg e 72°C - 1 min e 30 seg, 1 ciclo 72°C - 10 min.
	Pat ⁽²⁾	R	ATC CAT TAC ATA TAA TCT GCC ATA	
<i>COII</i>	George ⁽³⁾	F	TAG GAT TAG CTG GAA TAC C	1 ciclo: 95°C - 5 min, 35 ciclos: 94°C - 30 seg, 45°C - 30 seg e 72°C - 1 min e 30 seg, 1 ciclo 72°C - 10 min.
	Imelda ⁽³⁾	R	CAT TAG AAG TAA TTG CTA ATT TAC TA	
<i>nad6</i>	tPro-j1009	F	ATC WAT AAT CTC CAA AAT TAT	1 ciclo: 94°C - 5 min, 35 ciclos: 94°C - 45 seg, 45°C - 45 seg e 72°C - 1 min e 30 seg, 1 ciclo 72°C - 5 min.
	<i>nad6</i> -N-10624	R	GGN CCA TAA AAA ATA TTW GT	

Y=C/T; S=G/C; K=G/T; V=G/A/C; R=A/G; ⁽¹⁾ Simon et al. (1994); ⁽²⁾ Caterino; Sperling (1999); ⁽³⁾ Brower et al. (2006)

Quadro 4.2 - Iniciadores utilizados para o sequenciamento de espécimes de *H. virescens* e seus respectivos programas de amplificação

4.2.3 Medidas de variabilidade genética

As estatísticas gerais das sequências dos genes mitocondriais foram obtidas por meio do programa Mega 4.0 (TAMURA et al., 2007) e a opção “DNA polymorphism” no programa DnaSP v.5 (LIBRADO; ROZAS, 2009). A diversidade nucleotídica (π) e diversidade de haplótipos ($\hat{H}$) foram estimadas usando o programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). A distância genética foi estimada no programa Mega 4.0 (TAMURA et al., 2007) utilizando-se o modelo de substituição nucleotídica distância-*p* (utilizado para distâncias genéticas menores do que 0,2) (NEI; KUMAR, 2000).

Os dados de sequências de DNAmít foram analisados com três metodologias diferentes de agrupamento. Os dendrogramas das relações fenéticas entre os indivíduos amostrados foram obtidos usando o programa Mega 4.0 (TAMURA et al., 2007), empregando-se o critério de Neighbor-Joining (NJ) e distância-*p*, e o teste não-paramétrico de “bootstrap” para estimar a confiabilidade dos ramos, com 1.000 replicações. Foram construídas árvores de NJ para as três regiões em separado (*COI*, *COII* e *nad6*) e para os conjuntos de dados combinados (*COI*+*COII*+*nad6*) para avaliar a contribuição de cada região aos resultados finais.

Outras duas análises foram realizadas usando o conjunto de dados combinados (*COI*+*COII*+*nad6*). A análise multivariada de componentes principais PCA (“Principal Coordinate Analysis”) que fornece uma ferramenta onde é possível visualizar padrões de agrupamentos obtidos por comparações de distâncias genéticas sem alterar os dados. As análises

de PCA foram realizadas por indivíduos e por populações, por meio do programa GENALEX (PEAKALL; SMOUSE, 2006), usando uma matriz de distância genética PhiPT e parâmetros padrões do programa. Essa análise difere dos métodos de construção de árvores, como NJ, em que os algoritmos normalmente assumem uma estruturação genética hierárquica.

O agrupamento populacional também foi investigado usando a abordagem Bayesiana implementada no programa STRUCTURE 2.3.3 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). Cada mutação encontrada no sequenciamento dos três genes mitocondriais analisados em conjunto, foi tratada como um SNP (“Single Nucleotide Polymorphism”). A análise foi feita com o modelo *admixture ancestry model* e com correlação da frequência de alelos, como fornecido pelo programa, com um *burn in* de 50 000 interações e 500 000 repetições de cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) para calcular o número provável de agrupamentos genéticos (K). Foram realizadas 20 corridas independentes para cada K para confirmar a consistência das corridas, testando K de 1 a 15. Foi usado o ΔK de Evanno; Regnaut; Goudet (2005) para escolher o valor de K mais provável, usando o aplicativo Structure Harvester v 0.3 (EARL, 2009). O gráfico mostrando a estruturação genética foi produzido usando os programas CLUMPP 1.1.2 (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007) e *distruct* 1.1 (ROSENBERG, 2004).

As análises genéticas mais robustas foram desenvolvidas somente com os dados combinados (*COI+COII+nad6*). A análise molecular de variância (AMOVA) foi realizada para a avaliação da estrutura genética entre as populações de *H. virescens* de acordo com Excoffier, Smouse e Quattro (1992) por meio do programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Foram conduzidos três tipos de análises para testar a existência de variação molecular atribuída à presença de estrutura genética: (a) entre indivíduos em todas as populações, (b) entre indivíduos dentro dos diferentes anos agrícolas, e (c) entre indivíduos dentro dos grupos algodão $\times$ soja. O grau de estruturação entre os sítios amostrados foi interpretado pelos índices F associados aos diferentes níveis hierárquicos em que se distribui a variação (F_{CT} = diferenciação entre grupos; F_{SC} = diferenciação entre sítios dentro dos grupos e F_{ST} = diferenciação entre sítios entre grupos). Além disso, também foi estimada uma matriz de distâncias linearizadas par-a-par de Slatkin (SLATKIN, 1995) por meio do programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). A hipótese de isolamento genético causado pela distância geográfica foi avaliada por meio do teste de Mantel (MANTEL, 1967), que relaciona o logaritmo das distâncias genética e geográfica, usando o programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

As relações e distribuições dos haplótipos para as sequências dos dados combinados foram estabelecidas usando o programa TCS v. 1.21 (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000). Este programa utiliza dados estatísticos de probabilidade baseados no critério da parcimônia para estimar genealogias por meio de sequências de DNA (TEMPLETON; CRANDALL; SING, 1992).

A história demográfica das populações foi inferida por meio da análise de distribuição das diferenças pareadas entre as sequências (*Mismatch distribution*) (SLATKIN; HUDSON, 1991; ROGERS; HARPENDING, 1992), a qual é baseada no número de diferenças observadas entre todos os pares de haplótipos e é representada pela frequência da distribuição destas diferenças. Esta distribuição apresenta padrões gráficos que caracterizam diferentes tipos de histórias demográficas. Segundo simulações, populações em equilíbrio demográfico longo e estável devem apresentar um padrão multimodal, enquanto que populações que experimentaram uma expansão recente apresentam geralmente uma distribuição unimodal (ROGERS; HARPENDING, 1992). Gargalos populacionais são representados por distribuições próximas a zero ou bimodais (dependendo se o gargalo apenas reduziu ou removeu completamente a diversidade genética) (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2004). Contato secundário entre populações que estiveram isoladas por longos períodos também é representado por um padrão bimodal (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2004). O ajuste a um modelo de expansão populacional foi calculado a partir da soma dos desvios quadrados (SSD) e do índice de *Raggedness* (*rag*), com a significância avaliada por 10.000 permutações. Em seguida foram realizados os testes de neutralidade seletiva de D de Tajima (1989) e o F_s de Fu (1997). Para ambos os testes, se esperam valores próximos a zero se os tamanhos das populações se mantêm estáveis, valores negativos significativos se as populações atravessaram uma expansão populacional recente, e valores positivos significativos se as populações experimentaram gargalo (TAJIMA, 1989; FU, 1997). Os testes de neutralidade, as distribuições das diferenças pareadas e a significância estatística foram analisadas pelo programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). O gráfico com a distribuição das diferenças pareadas, incluindo intervalos de confiança, foram construídos usando o pacote estatístico R, implementado no programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

4.3 Resultados

4.3.1- Medidas de variabilidade genética

No total, foram obtidos 2669 pb de DNAmít, sendo 1486 pb referentes ao gene *COI*, 682 pb ao *COII* e 501 pb ao *nad6*. Das regiões sequenciadas, a que apresentou maior variação foi o gene *nad6* (Tabela 4.1). O menor e o maior número de sítios polimórficos foram encontrados para as regiões *COII* e *COI*, respectivamente (Tabela 4.1). A análise dos dados agrupados revelou 29 haplótipos diferentes em 97 sequências (Tabela 4.1).

Tabela 4.1- Resumo das estatísticas das sequências nucleotídicas

	<i>COI</i>	<i>COII</i>	<i>nad6</i>	<i>COI+COII+nad6</i>
Total pares de bases (pb)	1486	682	501	2669
Nº de sequências	114	101	120	97
Sítios variáveis (% de variação)	19 (1,28%)	11 (1,61%)	12 (2,4%)	38 (1,4%)
Razão (Si/ Sv) ⁽¹⁾	4,0	0,6	*	3,3
Nº de sítios polimórficos	16	5	11	28
Nº de haplótipos	18	6	14	29
Diversidade de haplótipos (HD)	0,524	0,097	0,375	0,629
π (Jukes-Cantor)	0,0006	0,0002	0,0012	0,0006
Nº médio de diferenças nucleotídicas (k)	0,889	0,099	0,635	1,564
Frequências nucleotídicas (%) T/C	41,2/14,1	39,7/12,2	44,4/7,8	41,4/12,4
A/G	31,2/13,5	37,1/11,0	42,2/5,6	34,8/11,4

* Não há transversões para essa região

⁽¹⁾ Si = Transições; Sv = Transversões

Em média, a distância genética estimada pelo modelo de distância-*p* entre as amostras, usando as três regiões mitocondriais combinadas, foi de 0,001. A maior distância genética foi encontrada entre os indivíduos da população de Mato Grosso do Sul (MS08algodão), que variou de 0 a 0,005 (Tabela 4.2). A diversidade haplotípica foi alta ($\hat{H}=1,0$) para todos os indivíduos amostrados e a diversidade nucleotídica (π) variou de 0,20 - 3,78 (Tabela 4.2).

As análises de agrupamento do DNAmít de *H. virescens* indicaram uma baixa diferenciação entre as populações, mesmo para aquelas coletadas em plantas hospedeiras diferentes (Figuras 4.1 - A, B, C – NJ, 4.2 – PCA e 4.3 – Structure). A análise de NJ com os

dados combinados (Figura 4.1 - D) separou melhor os indivíduos amostrados em grupos (*clusters*) do que as análises das regiões mitocondriais separadas. Entretanto, não foi detectado um ramo separando as populações de *H. virescens* em grupos distintos associados às culturas de soja e algodão.

As análises de PCA não resultaram em agrupamento significativo das populações nem por ano, nem por cultura ou região de coleta, tanto para a análise por indivíduos quanto por populações. As variações cumulativas nas duas coordenadas principais foram de 61,97% e 79,63%, para análises por indivíduos e por populações, respectivamente (Figura 4.2 e 4.3). A população mais diferenciada das demais foi a de soja proveniente de Mato Grosso do Sul (MS10soja) para a análise realizada por populações (Figura 4.2). Quando indivíduos de cada população foram analisados em detalhes, essa diferenciação se diluiu.

Tabela 4.2- Distribuição de haplótipos e índices de variabilidade genética para *H. virescens* com os dados combinados

Locais de coleta	Código	N ⁽¹⁾	Nh ⁽²⁾	Haplótipo (Nº de indivíduo)	$\hat{H}$ (s.d.) ⁽³⁾	Π (s.d.) ⁽⁴⁾	Distância- <i>p</i>
Luís Eduardo Magalhães, BA	BA08algodão	8	3	h1(6), h2(1), h3(1)	1,0 ± 0,06	1,10 ± 0,80	0 - 0,001
Palmeiras, GO	GO08algodão	10	5	h1(5), h4(1), h5(2), h6(1),h7(1)	1,0 ± 0,04	2,35 ± 1,40	0 - 0,003
Chapadão do Sul, MS	MS08algodão	11	10	h1(2), h8(1), h9(1), h10(1), h11(1), h12(1), h13(1), h14(1), h15(1), h16(1)	1,0 ± 0,03	3,78 ± 2,06	0 - 0,005
Sinop, MT	MT08algodão	8	4	h1(5), h17(1), h18(1), h19(1)	1,0 ± 0,06	1,75 ± 1,13	0 - 0,004
Riachão das Neves, BA	BA09algodão	4	3	h1(2), h9(1), h13(1)	1,0 ± 0,17	2,00 ± 1,40	0 - 0,003
Rio Verde, GO	GO09algodão	14	7	h1(6), h5(2), h13(1), h20(1), h21(2), h22(1), h23(1)	1,0 ± 0,02	2,20 ± 1,29	0 - 0,003
Primavera do Leste, MT	MTPL09algodão	2	2	h24(1), h25(1)	1,0 ± 0,50	2,00 ± 1,73	0 - 0,003
Sapezal, MT	MT09algodão	11	5	h1(7), h24(1), h26(1), h27(1), h28(1),	1,0 ± 0,03	1,49 ± 0,97	0 - 0,003
Luís Eduardo Magalhães, BA	BA10algodão	9	5	h1(4), h3(2), h29(1), h30(1), h31(1)	1,0 ± 0,05	2,16 ± 1,32	0 - 0,004
Luís Eduardo Magalhães, BA	BA10Soja	10	6	h1(5), h3(1), h32(1), h33(1), h34(1), h35(1)	1,0 ± 0,04	1,33 ± 0,90	0 - 0,004
Chapadão do Sul, MS	MS10Soja	10	2	h1(9), h24(1)	1,0 ± 0,04	0,20 ± 0,26	0 - 0,003
Total		97	52	-	-	-	-

⁽¹⁾ Número de espécimes analisados⁽²⁾ Número de haplótipos encontrados em cada localidade⁽³⁾ Diversidade haplotípica (± desvio padrão)⁽⁴⁾ Diversidade nucleotídica (± desvio padrão)

A) *COI*

B) *COII*

Figura 4.1- Árvores de Neighbor-Joining obtidas com o modelo distância-*p* para populações de *H. virescens*. Números nos ramos indicam os valores de 1.000 replicações de bootstrap. Os nomes dos indivíduos correspondem ao seu local de origem, ano de coleta e cultura de acordo com os códigos descritos no Quadro 4.1

Figura 4.2 - Análise de agrupamento por populações de *H. virescens* por meio de coordenadas principais baseadas na matriz de distância genética PhiPT

Figura 4.3 - Análise de agrupamento por indivíduo de *H. virescens* por meio de coordenadas principais baseadas na matriz de distância genética PhiPT

A metodologia de Evanno; Regnaut; Goudet (2005) indicou um $K = 2$ como número mais provável de agrupamentos, mas as populações de *H. virescens* não foram agrupadas nem por ano, nem por cultura ou região de coleta (Figura 4.4).

Figura 4.4 – Análise de agrupamento bayesiano dos indivíduos de *H. virescens* realizado no programa Structure. $K = 2$ grupos; as cores (verde e vermelho) representam a probabilidade de que cada indivíduo pertence a um dos grupos. Os códigos representam as populações de *H. virescens*

O índice de fixação (F_{ST}) encontrado para as amostras de *H. virescens* foi 0,012 ($p = 0,25$) entre populações; 0,015 ($p = 0,26$) entre anos agrícolas e 0,019 ($p = 0,25$) entre culturas diferentes. Esses valores indicam uma baixa estruturação genética entre as populações de *H. virescens*. A maior parte da variação para as amostras dessa espécie está dentro das populações (Tabela 4.3). O F_{ST} de Slatkin (1995) par-a-par de todas as populações estudadas variou de 0 a 0,77, sendo o maior valor encontrado referente às populações GO09algodão e MS10Soja (Tabela 4.4). O número de migrantes estimado pela estatística F variou de 0,64/migrantes/geração a um número infinito de migrantes (Tabela 4.4). O teste de Mantel para correlação entre distância genética e distância geográfica linear, não foi significativo ($p = 1.0$).

Tabela 4.3 - Análise molecular de variância (AMOVA) para amostras de *H. virescens* baseada na análise combinada dos genes *COI+COII+nad6*

Fonte de variação	GL ⁽¹⁾	SQ ⁽²⁾	Porcentagem de variação	Índices de fixação
(a) Entre populações	10	10,43	1,24	
Dentro das populações	86	80,88	98,76	F_{st} : 0,012; $p = 0,25$
Total	96	91,32		
(b) Entre anos agrícolas	2	2,67	1,17	
Entre populações	8	7,76	0,37	F_{st} : 0,015 $p = 0,26$
Dentro populações	86	80,88	98,46	F_{sc} : 0,0037; $p = 0,40$
Total	96	91,32		F_{ct} : 0,01; $p = 0,02$
(c) Entre culturas	1	1,35	1,09	
Entre populações	9	9,07	0,83	F_{st} : 0,019; $P = 0,25$
Dentro populações	86	80,88	98,08	F_{sc} : 0,008; $p = 0,44$
Total	96	91,32		F_{ct} : 0,01; $p = 0,029$

⁽¹⁾ Grau de liberdade

⁽²⁾ Qui-quadrado

Tabela 4.4- Diagonal superior: número de migrantes por geração de cada região. Diagonal inferior: F_{ST} de Slatkin par a par para amostras de *H. virescens* de cada região, baseada na análise combinada dos genes *COI* + *COII* + *nad6*

Número de migrantes (Nm)											
	BA08alg.	GO08alg.	MS08alg.	MT08alg.	BA09alg.	GO09alg.	MTPL09alg.	MT09alg.	BA10alg.	BA10soj.	MS10Soj.
BA08alg.		3,265	5,21	80	inf	2,346	5,176	14,932	inf	inf	inf
GO08alg.	0,153		Inf*	11,721	4,198	inf	inf	inf	8,226	4,278	3,506
MS08alg.	0,096	0		13,826	7,25	inf	inf	inf	12,804	5,683	5,701
MT08alg.	0,006	0,043	0,036		inf	inf	inf	12,942	39,938	inf	inf
BA09alg.	0	0,119	0,069	0		170,5	31,625	inf	inf	inf	inf
GO09alg.	0,213	0	0	0	0,003		inf	inf	inf	inf	0,642
MTPL09alg.	0,097	0	0	0	0,016	0		inf	inf	inf	3,377
MT09alg.	0,033	0	0	0,039	0	0	0		inf	9,799	5,061
BA10alg.	0	0,061	0,039	0,125	0	0	0	0		inf	inf
BA10soj.	0	0,117	0,088	0	0	0	0	0,051	0		inf
MS10Soj.	0	0,143	0,088	0	0	0,779	0,148	0,099	0	0	
Matriz de Slatkin (F_{ST})											

* Número infinito de migrantes

Para as 97 sequências analisadas com os dados *COI+COII+nad6* combinados, foram encontrados 35 haplótipos usando o programa TCS v.1.2.1 (Figura 4.5). Entre os 35 haplótipos identificados, 28 são únicos, sendo quatro amostrados somente nas amostras de soja (Figura 4.5). A topologia geral da rede mostra estruturas em forma de estrela, onde os haplótipos mais frequentes (1, 3, 5 e 24) estão posicionados no interior. Este tipo de disposição em estrela é típico de espécies que passaram por uma expansão populacional recente, onde se espera que os haplótipos interiores sejam ancestrais e os periféricos, derivados (CRANDALL; TEMPLETON, 1993; CASTELLOE; TEMPLETON, 1994).

Figura 4.5- Rede de haplótipos mostrando as inter-relações existentes entre os haplótipos de *H. virescens* nas diferentes regiões produtoras de algodão e soja no Brasil. As linhas representam uma mutação entre os haplótipos, e os pontos representam haplótipos intermediários que não foram observados

A distribuição das diferenças pareadas entre as sequências mitocondriais homólogas foi unimodal (Figura 4.6), indicando que as amostras de *H. virescens* passaram por um processo de expansão populacional recente. Essa expansão também é corroborada pelos valores negativos e significativos dos testes de neutralidade: F_S de $F_u = -27,52$ ($p < 0,001$) e D de Tajima = $-2,29$ ($p < 0,001$). Além disso, os valores do tamanho populacional antes ($\theta_0 = 0,002$) e depois da expansão demográfica ($\theta_1 = 2,455$) das populações, além do padrão em estrela da rede de haplótipos, apoiam esse padrão de expansão populacional recente.

Figura 4.6 - Distribuição das frequências do número de diferenças nucleotídicas pareadas (*Mismatch distribution*) de *COI+COII+nad6* das amostras de *H. virescens* coletadas em diferentes regiões brasileiras, nas culturas de soja e algodão

4.4 Discussão

Os resultados sobre a variabilidade genética e fluxo gênico em populações de *Heliothis virescens* do Brasil avaliadas por meio de marcadores mitocondriais indicam baixa estruturação entre as populações estudadas. As análises de agrupamento das sequências de DNAmít indicaram uma baixa diferenciação entre as populações de *H. virescens*. Em nenhum dos dendrogramas obtidos por NJ foi detectado um ramo capaz de separar as populações de *H. virescens* em grupos distintos, associados às culturas de algodão ou soja ou às regiões ou à época de coletas. A ausência dessa diferenciação significativa em grupos distintos indica que as populações coletadas em algodão e soja são proximamente relacionadas. Este resultado também foi confirmado com o teste de AMOVA, que sugere uma baixa estruturação genética entre essas populações, independente da cultura ($F_{st} = 0,019$), ou escala geográfica estudada (diferentes regiões; $F_{st} = 0,012$), sendo que a maior parte da variação genética foi encontrada dentro de cada grupo. Roehrdanz et al. (1994) usando a técnica de PCR-RFLP do DNAmít, também não encontraram qualquer estruturação populacional em amostras de *H. virescens* nos EUA e México. Esses resultados foram similares aos obtidos com marcadores de alozimas conduzidos por Han e Caprio (2004) que encontraram baixa estruturação genética em populações de *H. virescens*, com índice de fixação (F_{st}) variando de 0,001 a 0,018 na região Oeste do Mississippi, EUA, e estudos realizados por Korman et al. (1993) que encontraram $F_{st} = 0,002$ em diferentes regiões dos EUA para essa espécie. De um modo geral, a baixa estruturação genética tem sido encontrada em espécies de lepidópteros-praga em diferentes agroecossistemas (COATES; SUMERFORD; HELLMICH, 2004; SAW; ENDERSBY; McKECHNIE, 2006; BEHERE et al., 2007). Usando a técnica de DNAmít, Behere et al. (2007), por exemplo, encontraram F_{st} variando de 0,0017 a 0,0038 para amostras de *Helicoverpa armigera* (Hübner). Bourguet et al. (2000), utilizando marcadores aloenzimáticos, encontraram um valor de $F_{st} = 0,003$ para *Ostrinia nubilais* (Hübner) em diferentes regiões da França, sugerindo alto fluxo gênico entre as populações.

Essa baixa estruturação populacional encontrada com marcadores mitocondriais pode ser explicada por diferentes processos (ROEHRDANZ et al., 1994), tais como a possibilidade dessas populações terem passado por um gargalo seguido de expansão populacional a partir de uma população pequena em sua história evolutiva recente, ou da possibilidade das populações terem sofrido expansões populacionais anuais a partir de um pequeno tamanho populacional, resultado de controle fitossanitário nas culturas que elas infestam. Outra possibilidade é a livre troca de

migrantes entre as populações de *H. virescens*, principalmente entre populações próximas. Esses três cenários não são excludentes e podem ter contribuído para a baixa estruturação reportada nesse estudo, embora o padrão de variabilidade genética observado nas populações de *H. virescens*, como valores elevados de diversidade haplotípica ($\hat{H}$), assim como o padrão encontrado na rede de haplótipos, em formato de estrela (CRANDALL; TEMPLETON, 1993; CASTELLOE; TEMPLETON, 1994), e elevado número de haplótipos em baixa frequência (EXCOFFIER; FOLL; PETIT, 2009), são características de uma espécie que atravessou um processo de expansão populacional. Essa observação é confirmada na distribuição das diferenças pareadas entre as sequências mitocondriais de *H. virescens*, em que o gráfico obtido foi unimodal (Figura 4.6) (SLATKIN; HUDSON, 1991; ROGES; HARPENDING, 1992) e os valores negativos e significativos dos testes de neutralidade para as estatísticas de D de Tajima e F_s de Fu. Uma hipótese para explicar essa expansão populacional de *H. virescens* é que a praga pode ter acompanhado a expansão das áreas de algodão no Brasil. Até o ano de 1990, as produções de algodão no Brasil concentravam-se principalmente na região Nordeste, Sul e Sudeste. A cultura do algodão teve uma expansão acentuada no início da década de 90, associada à transferência regional da produção da região Sul e Sudeste rumo às áreas de cerrado, como Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, devido à topografia favorável e ao desenvolvimento de plantas adaptadas a essas regiões (EMBRAPA, 2003). É interessante notar que as populações amostradas na Bahia, único estado na região Nordeste que ainda mantém uma cultura algodoeira significativa, apresentam haplótipos com mais conexões (Figura 4.5) que podem, por isso, ser considerados mais antigos, enquanto que populações amostradas em Goiás e Mato Grosso, por exemplo, apresentam haplótipos mais raros (mais recentes).

Caracterizar a estrutura genética de uma espécie, e entender como as diferentes populações estão conectadas, pode ajudar na definição de uma escala de manejo nas quais os programas de manejo da resistência podem operar para uma determinada praga (SCOTT et al., 2005). O conhecimento da estrutura populacional e fluxo gênico também são aspectos críticos de espécies agronomicamente importantes, devido a seus efeitos potenciais sobre o ritmo de evolução de resistência a inseticidas e/ou plantas *Bt* (CAPRIO; TABASHNIK, 1992; ALSTAD; ANDOW, 1995).

Para plantas *Bt*, embora várias estratégias de manejo tenham sido propostas para retardar a evolução da resistência (TABASHNIK, 1994; ALSTAD; ANDOW, 1995), o foco tem sido a

estratégia de refúgio, ou seja, áreas de cultivos de plantas hospedeiras que não expressam proteínas de *Bt* mantidas nas proximidades das plantas GM tóxicas (GOULD, 1998). Entretanto, a eficiência dessa estratégia depende das taxas de dispersão entre refúgios e campos transgênicos. O comportamento de dispersão da população determina o tamanho do refúgio bem como a disposição espacial e temporal deste. Além do refúgio estruturado usado para desacelerar a resistência a plantas GM, outra fonte de indivíduos suscetíveis para acasalar com indivíduos resistentes que poderiam ser selecionados nas áreas de algodão *Bt* seriam hospedeiros alternativos presentes na região. No caso de *H. virescens*, um grande reservatório de indivíduos suscetíveis para acasalar com os resistentes selecionados em campo de algodão *Bt* poderia ser a cultura da soja. Neste sentido, os resultados encontrados aqui, de que não há estruturação genética entre populações de *H. virescens* amostradas em algodão e soja, parecem corroborar a hipótese de que indivíduos coletados nessas diferentes culturas podem acasalar ao acaso. Entretanto, no cenário agrícola de cultivo de soja e algodão, a recente liberação comercial da soja *Bt* resistente a insetos, que também expressa a proteína Cry1Ac encontrada no algodão *Bt*, ao invés de facilitar o manejo da resistência de *H. virescens*, tenderá a aumentar a pressão de seleção e o risco para a evolução da resistência, pois essas populações estarão sujeitas à pressão de seleção em ambas as culturas *Bt*. Desse modo, é de suma importância que as áreas de refúgio sejam implementadas de forma efetiva para cada cultura para retardar a evolução da resistência, e tornar improvável que dois indivíduos resistentes possam se encontrar, acasalar e gerar descendentes.

Os resultados aqui apresentados sugerem que o movimento de *H. virescens* entre campos de algodão e soja deve ser cuidadosamente considerado dentro de uma região agrícola. É importante ressaltar que essa informação será útil não apenas para o delineamento de estratégias de manejo da resistência às plantas *Bt*, mas também para o uso de inseticidas. Dessa forma, práticas de manejo da resistência devem ser decididas levando em consideração tanto a cultura da soja como a do algodão, uma vez que não existe estruturação genética entre as populações de *H. virescens* nessas culturas. Todavia, trabalhos mais refinados e com diferentes escalas geográficas são necessários para o melhor entendimento do fluxo gênico e parentesco entre populações de *H. virescens* que infestam outras plantas cultivadas e também hospedeiros selvagens em regiões geográficas e sistemas de cultivo específicos ao longo do tempo.

4.5 Conclusões

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

- Há fluxo gênico e ausência de estruturação genética entre as populações de *H. virescens* que infestam a cultura de algodão e soja no Brasil;
- A história demográfica de *H. virescens* baseada no teste distribuição da diferença genética par-a-par entre háplotipos e dos testes de neutralidade indicam a existência de uma expansão geográfica recente.

Referências

ALSTAD, D.N.; ANDOW, D.A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. **Science**, Washington, v. 268, p. 1894-1896, 1995.

AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 18, p. 489-522, 1987.

BEHERE, G.T.; TAY, W.T.; RUSSELL, D.A.; HECKEL, D.G.; APPLETON, B.R.; KRANTHI, K.R.; BATTERHAM, P. Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to *H. zea*. **BMC Evolutionary Biology**, New York, v. 7, n. 117, p. 1-20, 2007.

BOURGUET, D.; BETHENOD, M.T.; PASTEUR, N.; VIARD, F. Gene flow in the European corn borer *Ostrinia nubilalis*: implications for the sustainability of transgenic insecticidal maize. **Proceedings of the Royal Society B**, Edinburgh, v. 267, p. 117-122, 2000.

CAMERON, S.L.; WHITING, M.F. The complete mitochondrial genome of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (Insecta: Lepidoptera: Sphingidae) and an examination of mitochondrial gene variability within butterflies and moths. **Gene**, Amsterdam, v. 408, p. 112-123, 2008.

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. 16, p. 129-148, 1992.

- CASTELLOE, J.; TEMPLETON, A.R. Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 3, p. 102-113, 1994.
- CATERINO, M.S.; CHO, S.; SPERLING, F.A.H. The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 45, p. 1-54, 2000.
- CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, p. 1657-1660, 2000.
- COATES, B.S.; SUMERFORD, D.V.; HELLMICH, R.L. Geographic and voltinism differentiation among North American *Ostrinia nubilalis* (European corn borer) mitochondrial cytochrome *c* oxidase haplotypes. **Journal of Insect Science**, Madison, v. 4, p. 1-9, 2004.
- CRANDALL, K.A.; TEMPLETON, A.R. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. **Genetics**, Pittsburgh, v. 134, p. 959-969, 1993.
- DALY, J.C. Ecology and genetics of insecticides 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. 60 p.
- EARL, D.A. **Structure havester v. 03**. Disponível em <http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/software/struct_havers/>. Acesso em: 12 dez. 2010.
- EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Algodão: cultura do algodão no cerrado**. Dourados, 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>>. Acesso em 02 dez. 2010.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 14, p. 2611-2620.
- 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**, Pittsburgh, v. 131, p. 479-491, 1992.
- EXCOFFIER, L.; FOLL, M.; PETIT, R.J. Genetic consequences of range expansions. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, Palo Alto, v. 40, p. 481-501, 2009.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 10, p. 564-567, 2010.

FARROW, R.A.; DALY, J.C. Long-range movements as an adaptive strategy in the genus *Heliothis* (Lepidoptera: Noctuidae): a review of its occurrence and detection in four pest species. **Australian Journal of Zoology**, Victoria, v. 35, p. 1-24, 1987.

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

FITT, G.P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 34, p. 17-52, 1989.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **A primer of conservation genetics**. Cambridge: University Press, 2004. 220 p.

FREELAND, J.R. **Molecular ecology**. West Sussex: John Wiley, 2006. 388 p.

FU, Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, Pittsburgh, v. 147, p. 915-925, 1997.

FUENTES-CONTRERAS, E.; ESPINOZA, J.L.; LAVANDERO, B.; RAMIREZ, C.C. Population genetic structure of codling moth (Lepidoptera : Tortricidae) from apple orchards in central Chile. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.101, p.190-198, 2008.

GOMEZ-P, L.M.; GIRALDO, C.; LOPEZ, A.; URIBE, S. Molecular and morphological differentiation of *Oleria makrena* (Hewitson) and *Oleria fumata* (Haensch) (Lepidoptera: Ithomiinae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, p. 616-623, 2009.

GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 43, p. 701-726, 1998.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAN, Q.; CAPRIO, M.A. Evidence from genetic markers suggests seasonal variation in dispersal in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 33, p. 1223-1231, 2004.

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

JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N.A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure **Bioinformatics**, Michigan, v. 23, p. 1801-1806, 2007.

KORMAN, A.; MALLET, J.; GOODENOUGH, J.; GRAVES, J.B.; HAYES, J.L.; HENDRICKS, D.E.; LUTTRELL, R.G.; PAIR, S.D.; WALL, M. Population structure of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae): an estimate of gene flow. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 86, p. 182-188, 1993.

KRAFSUR, E.S. Role of population genetics in the sterile insect technique. In: DYCK, V.A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A.S. (Ed.). **Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management**. Amsterdam: Springer, 2005. p. 389-406.

LANG, B.F.; GRAY, M.W.; BURGER, G. Mitochondrial genome evolution and the origin of the Eukaryotes. **Annual Review of Genetics**, Palo Alto, v. 33, p. 351-397, 1999.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v.5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

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

MARTEL, C.; RÉJASSE, A.; ROUSSET, F.; BETHENOD, M.T.; BOURGUET, D. Host-plant-associated genetic differentiation in Northern French populations of the European corn borer. **Heredity**, London, v. 90, p. 141-149, 2003.

McCAFFERY, A.R. Resistance to insecticides in heliothine Lepidoptera: a global view. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, London, v. 353, p. 1735-1750, 1998.

MERANER, A.; BRANDSTATTER, A.; THALER, R.; ARAY, B.; UNTERLECHNER, M.; NIEDERSTATTER, J.; PARSON, W.; ZELGER, R.; DALLA VIA, J.; DALLINGER, R. Molecular phylogeny and population structure of the codling moth (*Cydia pomonella*) in Central Europe: I. Ancient clade splitting revealed by mitochondrial haplotype markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 48, n. 3, p. 825-837, 2008.

MILLER, N.J.; DORHOUT, D.L.; RICE, M.E.; SAPPINGTON, T.W. Mitochondrial DNA variation and range expansion in Western bean cutworm (Lepidoptera: Noctuidae): no evidence for a recent population bottleneck. **Environmental Entomology**, College Park, v. 38, p. 274-280, 2009.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. New York: Oxford University Press, 2000. 333 p.

PEAKALL, R.; SMOUSE P. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v.6, p. 288-295, 2006.

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population using multilocus genotype data. **Genetics**, Pittsburgh, v. 155, p. 945-959, 2000.

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.

- ROE, A.D.; SPERLING, F.A.H. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome *c* oxidase I and II DNA and implication for DNA barcoding. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 44, p. 325-345, 2007.
- ROEHRDANZ, R.L.; LOPEZ, J.D.; LOERA, J.; HENDRICKS, D.E. Limited mitochondrial-DNA polymorphism in North-American populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 87, p. 856-866, 1994.
- ROGERS, A.R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 9, p. 552-569, 1992.
- ROSENBERG, N.A. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 4, p. 137-138, 2004.
- SAW, J.; ENDERSBY, N.M.; McKECHNIE, S.W. Low mtDNA diversity among widespread Australian diamondback moth *Plutella xylostella* (L.) suggests isolation and a founder effect. **Insect Science**, Malden, v. 13, p. 365-373, 2006.
- SCOTT, K.D.; LAWRENCE, N.; LANGE, C.L.; SCOTT, L.J.; WILKINSON, K.S.; MERRITT, M.A.; MILES, M.; MURRAY, D.; GRAHAM, G.C. Assessing moth migration and population structuring in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) at the regional scale: example from the darling downs, Australia. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 98, n. 6, p. 2210-2219, 2005.
- SIMON, C.; FRANKE, A.; MARTIN, A. The polymerase chain reaction: DNA extraction and amplification. In: HEWITT, G.M.; JOHNSTON, W.; YOUNG, J.P.W. (Ed.). **Molecular techniques in taxonomy**. Berlin: Springer-Verlag, 1991. p. 329-355.
- SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 16, p. 393-430, 1985.
- _____. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Pittsburgh, v. 130, p. 457-462, 1995.
- SLATKIN, M.; HUDSON, R.R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing population. **Genetics**, Pittsburgh, v. 129, p. 555-562, 1991.
- TABASHNIK, B.E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Standford, v. 39, p. 47-79, 1994.
- TAJIMA, F. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. **Genetics**, Pittsburgh, v. 123, p. 585-595, 1989.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TEMPLETON A.R.; CRANDALL K.A.; SING, C.A. Cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, Pittsburgh, v. 132, p. 619-633, 1992.

YANG, L.; WEI, Z.J.; HONG, G.Y.; JIANG, S.T.; WEN, L.P. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of *Phthonandria atritineata* (Lepidoptera: Geometridae). **Molecular Biology Reports**, Basel, v. 36, p. 1441-1449, 2009.