

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

**Variabilidade genética em populações de *Heliothis virescens*
(Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil inferida por marcadores microssatélites**

Felipe Antonio Domingues

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2011**

Felipe Antonio Domingues
Licenciado em Ciências Biológicas

**Variabilidade genética em populações de *Heliothis virescens* (Lepidoptera:
Noctuidae) no Brasil inferida por marcadores microssatélites**

Orientadora:
Dra. **KARINA LUCAS DA SILVA BRANDÃO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2011

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

Domingues, Felipe Antonio

Variabilidade genética em populações de *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil inferida por marcadores microssatélites / Felipe Antonio Domingues. - - Piracicaba, 2011.

84 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Algodão 2. Genética de populações 3. Insetos nocivos 4. Lagartas 5. Manejo integrado
6. Marcador molecular 7. Plantas transgênicas 8. Pragas de plantas I. Título

CDD 633.51
D671v

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

A Deus,

À minha querida mãe Roseni, a minha irmã Natália, a minha sobrinha Manuela e a minha
namorada Maura, pelo afeto, dedicação e incentivo
Aos meus avôs, pelo carinho, incentivo e pela oportunidade de estudo.

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

À Dra. Karina Lucas Silva-Brandão pelo incentivo, conhecimentos transmitidos, e orientação para realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Celso Omoto pelas oportunidades concedidas, confiança e ensinamento.

Ao Prof. Dr. Fernando Luis Cônsoli pelas oportunidades, conhecimento transmitido e pela disponibilização do laboratório para condução do trabalho.

À Dra. Aluana Abreu do Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento da ESALQ/USP pelos conhecimentos transmitido e pela ajuda com análise dos dados de genética de populações.

Ao Dr. Perera da USDA-ARS, Southern Insect Management Research Unit 141 pelos auxílios prestados e disponibilização dos iniciadores utilizados na amplificação dos locos microssatélites.

Ao Dr. Carlos Blanco da USDA-APHIS, Biotechnology Regulatory pelos auxílios prestados e disponibilização dos iniciadores utilizados na amplificação dos locos microssatélites.

Ao Prof. Dr. José Baldin Pinheiro do Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento da ESALQ/USP pela disponibilização do laboratório para realização da padronização dos iniciadores utilizados no trabalho.

A Dra. Maria Imaculada Zucchi do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos vegetais, IAC pelos auxílios prestados na área de genética de populações.

A Dra. Marisa Monteiro do laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento da ESALQ/USP pelos auxílios prestados.

Aos amigos do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas, ESALQ/USP Juliano Farias, Karina Cordeiro Albernaz, Oderlei Bernardi, Oscar Arnaldo Batista Neto e Silva e Rodrigo José Sorgatto pelo companheirismo, ajuda e sugestões na realização do trabalho.

Ao Dr. Pablo Coronel, do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas, ESALQ/USP pela ajuda e sugestões na realização do trabalho.

Ao Dr. Marcelo Brandão do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, ESALQ/USP pelos auxílios prestados.

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

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

Aos queridos amigos e colegas que são ou foram do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas, ESALQ/USP, Alex Sandro Poltronieri, Bruna Laís Merlin, Dalton Camapacci Pavan, Daniel Bernardi, Danielle Thomazoni, Dariane Sagasetta de Oliveira Souza, Eloisa Salmeron, Everaldo Batista Alves, Gislaine O. Campos, Isabela Maganeti Dal Pozzo, José Bruno Malaquias, Juliano Farias, Karina Cordeiro Albernaz, Luis Ricardo Sesso, Nádia Fernanda Bertan Casarin, Oderlei Bernardi, Oscar Arnaldo Batista Neto e Silva, Rebeca da Silva Ribeiro, Renato Augusto do Carmo de Lacerda, Ricardo Ferraz Silveira, Rodrigo José Sorgatto, Vitória Grisotto Valerio, Beatriz Maria Ferrari, Cláudio Roberto Franco, Edgar Francisco Gaona Mena, Guilherme Libardi Miraldo, Fernando Joly Campos, Patrick Marques, Vitor Antônio Correa Pavinato Dourado, Samuel Martinelli, Vinícius Durrer, pelo agradável convívio, companheirismo e auxílios prestados.

A equipe do Laboratório de Interação de insetos, ESALQ/USP, em especial aos colegas Aline Guidolin e Guilherme Rossi, pela disposição e paciência para me ensinar.

A todos os funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP, pela dedicação aos serviços prestados, em especial aos funcionários Dino, Wiliam e Carlos pelo café de todas as manhãs.

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

A todos os meus parentes pela compreensão da minha ausência nas reuniões de família nesses últimos dois anos.

Aos queridos Amigos Gustavo, Juliana, Tati, Bob, Paula, Thiago, Pedro pela amizade de todos esses anos, carinho e pelos incentivos.

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

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
LISTA DE QUADROS.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 DESENVOLVIMENTO.....	21
2.1 Revisão bibliográfica.....	21
2.1.1 Aspectos bioecológicos de <i>Heliothis virescens</i>	21
2.2 Material e Métodos.....	31
2.2.1 Coleta dos insetos	32
2.2.2 Caracterização dos locos microssatélites.....	33
2.3 Análises	38
2.3.1 Análise da genotipagem dos nove locos microssatélites	38
2.3.2 Análise da diversidade genética intrapopulacional de <i>H. virescens</i>	39
2.3.4 Análise de agrupamento das populações de <i>H. virescens</i>	40
2.4 Resultados.....	41
2.4.1 Diversidade genética intrapopulacional.....	41
2.4.2 Diversidade genética interpopulacional.....	53
3 DISCUSSÃO	61
4 CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS	72

RESUMO

Variabilidade genética em populações de *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil inferida por marcadores microssatélites

Estudos de genética de populações de pragas agrícolas têm destacado a importância de se conhecer a estruturação genética e os padrões de fluxo gênico entre populações para o refinamento de estratégias de Manejo Integrado de Pragas (MIP). A lagarta-da-maçã do algodoeiro, *Heliothis virescens* (F.), é um inseto praga amplamente distribuído e importante economicamente por causar danos consideráveis à cultura do algodão no Brasil. O controle dessa praga tem sido feito principalmente pelo uso de inseticidas e de plantas geneticamente modificadas (GM) que expressam proteína(s) de *Bacillus thuringiensis* Berliner e o potencial de evolução da resistência é alto. O conhecimento de quanto as populações de *H. virescens* são capazes de trocar informação genética entre si é de fundamental importância para a implantação de estratégias de manejo dessa praga. No entanto, pouco se sabe sobre a estrutura genética e os padrões de fluxo gênico em *H. virescens* em escalas locais e regionais no Brasil. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a variabilidade genética em populações de *H. virescens* utilizando marcadores microssatélites. Foram amostrados indivíduos de *H. virescens* oriundos de populações coletadas nas safras de 2007/08, 2008/09 e 2009/10 nas principais regiões produtoras de algodão e soja no Brasil. Foram estudados nove locos polimórficos em 12 populações, em um total de 205 indivíduos. O número médio de alelos por loco foi de 14,11. Os valores de heterozigosidade média esperada (H_E) e observada (H_O) foram de 0,303 e 0,438, respectivamente. O coeficiente de endocruzamento da espécie f foi de 0,294 (IC 95% de 0,178 a 0,406). As estimativas de estruturação genética foram $\theta = 0,132$ (IC 95% de 0,072 a 0,218) e $R_{ST} = 0,252$. Esses valores indicam uma estruturação genética moderada entre as populações. Estimativas do número de migrantes indicaram um pequeno fluxo gênico, principalmente no sentido Centro-Oeste – Nordeste, embora a maioria dos indivíduos dentro das populações seja residente; adicionalmente, foi verificado que o estabelecimento das populações do algodão ocorre a partir de indivíduos migrantes da soja ou descendentes desses indivíduos. Análises de Componentes Principais e de atribuição usando inferência Bayesiana revelaram a formação de dois grupos, porém não foi possível identificar um padrão de agrupamento (por região, safra ou hospedeiro). Desta forma os resultados do presente trabalho sugerem uma estruturação genética incipiente para as populações de *H. virescens* no Brasil. Desse modo, é importante levar esses resultados em consideração para que o MIP em geral, e especificamente para que as abordagens para retardar a evolução da resistência sejam implementadas de forma efetiva para o manejo de *H. virescens* no Brasil.

Palavras-chave: Algodão-Bt; Estruturação genética; Fluxo gênico; Insetos-praga; Manejo Integrado de Pragas; Plantas geneticamente modificadas

ABSTRACT

***Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populational genetic variation in Brazil inferred by microsatellite markers**

Agricultural pests population genetics studies have emphasized the importance of genetic structure and patterns of gene flow knowledge for Integrated Pest Management (IPM) strategies. The tobacco budworm, *Heliothis virescens* (F.), is a widespread and economically important insect pest renowned for causing considerable damage in cotton fields in Brazil. This pest has been controlled by the use of insecticides and genetic modified plants (GM) expressing proteins from *Bacillus thuringiensis* Berliner, and it has already been shown to present a high potential to develop resistance to these control technologies. To a successful application of these strategies it is needed to know the capacity of the pest populations to exchange genetic information among them. However, for *H. virescens* a scarce amount of information about genetic structure and patterns of gene flow is available at local and regional scales in Brazil. In this way, the main objective of this study was to evaluate the genetic variability of *H. virescens* based on microsatellite markers. Specimens were sampled during 2007/08, 2008/09 and 2009/10 from the main cotton and soybean producers regions in Brazil. From this, nine polymorphic loci from 12 populations were studied in 205 specimens. The average number of alleles was 14.11. Expected (H_E) and observed (H_O) heterozygosity were 0.303 and 0.438, respectively. Inbreeding coefficient f was 0.294 (IC 95% 0.178 - 0.406). Genetic structure indices were: $\theta = 0.132$ (IC 95% 0.072 – 0.218) and $R_{ST} = 0.252$. These values point to a moderate genetic structure among *H. virescens* populations. Migrants estimative indicate a low gene flow, mainly in the Center-Western – Northern direction, although most individuals are residents within populations; additionally it was suggested that immigrants to cotton populations come from soybean fields. Genetic relationships inferred by Principal Component Analysis and Bayesian assignment tests identified two groups, although no group pattern was recognized, even by geographic region, year of sampling or host plant. These results suggest an incipient genetic structuring for *H. virescens* populations within Brazil. Thus, such results should be considered for IPM strategies aiming in an efficient control of *H. virescens* in Brazil.

Keywords: Bt cotton; Genetic structure; Gene flow; Insect pest; Integrated Pest Management; Transgenic plants

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Uso de marcadores moleculares em estudos de genética de populações de lepidópteros considerados pragas agrícolas, indicando os valores de F_{ST}	28
Quadro 2 – Análise comparativa entre alguns dos marcadores moleculares mais utilizados em estudos de genética de populações (adaptado de Ferreira e Grattapaglia, 1998).....	31
Quadro 3 – Localidades de origem e hospedeiro das populações de <i>H. virescens</i> coletadas em diferentes safras.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Localidades de coleta das populações de <i>H. virescens</i>	32
Figura 2 –	Esquema representativo da reação de amplificação utilizando fluoróforos para a marcação das sequências a partir do terceiro ciclo (SCHUELKE, 2000).....	36
Figura 3 –	Exemplo de eletroferograma da genotipagem multiplex em sequenciador automático de um indivíduo de <i>H. virescens</i> da população BALEM10_soj, analisado no programa GeneMarker®. Os picos azuis, pretos e verdes representam os alelos encontrados em diferentes locos e as fluorescências emitidas pelos fluoróforos FAM, NED e HEX, respectivamente. Os números abaixo de cada pico representam o tamanho do alelo. Os picos vermelhos representam o marcador de peso molecular ROX de 35 a 500pb.....	38
Figura 4 –	Frequência alélica nos doze locos para as populações de <i>H. virescens</i> coletadas em 2008.....	48
Figura 5 –	Frequência alélica nos doze locos para as populações de <i>H. virescens</i> coletadas em 2009.....	49
Figura 6 –	Frequência alélica nos doze locos para as populações de <i>H. virescens</i> coletadas em 2010.....	50
Figura 7 –	Frequência alélica dos doze locos para as populações de <i>H. virescens</i> coletadas na Bahia em algodão e soja em diferentes safras.....	51
Figura 8 –	Correlação entre as distâncias genéticas e geográficas inferida pela análise de isolamento por distância (MANTEL, 1967).....	56
Figura 9 –	Análise de Coordenadas Principais (PCA) das populações de <i>H. virescens</i> baseada nos valores de distância θ (WEIR; COCKERHAM, 1984) par a par....	59
Figura 10 –	Análise de Coordenadas Principais (PCA) baseada na presença ou ausência de alelos de nove locos polimórficos. As cores e formas representam os indivíduos de <i>H. virescens</i> coletados nas suas respectivas localidades.....	59
Figura 11 –	Análise de atribuição usando inferência Bayesiana implementada no programa STRUCTURE das populações de <i>H. virescens</i> . $\Delta K = 2$, número que melhor representa o conjunto de dados. Cada um dos 205 indivíduos é representado por uma linha vertical fina que é dividida em segmentos cujo tamanho e cor (vermelho ou verde) corresponde à proporção relativa do genoma de cada indivíduo a um determinado agrupamento. As populações são separadas por linha preta.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência dos iniciadores microssatélites utilizados no estudo e número de acesso no GenBank, nome dos locos, motivo do microssatélite acessado, amplitude dos produtos de PCR em pares de base (pb) e temperatura de anelamento.....	35
Tabela 2 – Estimativas do número total de alelos (A), heterozigosidade observada ($H_O \pm SE$), heterozigosidade esperada ($H_E \pm SE$) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) para os locos microssatélites utilizados para o estudo populacional de <i>H. virescens</i>	42
Tabela 3 – Estimativas do número total de alelos (N), média de alelos por população por loco (n), médias das heterozigosidades observada ($H_O \pm SE$) e esperada ($H_E \pm SE$) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) para as doze populações de <i>H. virescens</i>	42
Tabela 4 – Freqüências alélicas e alelos privados nos doze locos microssatélite para as populações de <i>H. virescens</i>	44
Tabela 5 – Probabilidade para aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) de acordo com o Teste Exato de Fisher. Em negrito: locos que não se ajustam as proporções do Equilíbrio de Hardy – Weinberg, com grau de significância $\alpha = 0,001$. * = loco monomórfico.....	52
Tabela 6 – Estimativa dos índices de estruturação baseados em Weir; Cockerham (1984) (f , F , θ) e Slatkin (1995) (R_{ST}) e número de migrantes por geração ($N_e m$) em doze populações naturais de <i>H. virescens</i> individualizados por ano de coleta e com todas as populações agrupadas. Intervalo de confiança (IC) de 95% de probabilidade.....	54
Tabela 7 – Matriz das distâncias genéticas (θ) (WEIR; COCKERHAM, 1984) par a par linearizada entre as doze populações de <i>H. virescens</i>	55
Tabela 8 – Porcentagem de migrantes das populações de <i>H. virescens</i> coletadas nas safras de 2007/2008, 2008/2009 e 2009/2010. Em negrito, valores significativos para taxas de indivíduos residentes e migrantes (acima de 83,3% e 1,5%, respectivamente).....	57

1 INTRODUÇÃO

Estudos sobre a estrutura populacional e o fluxo gênico entre populações de espécies agronomicamente importantes podem fornecer informações de base para o Manejo Integrado de Pragas (MIP) (MILLER et al., 2003; SCOTT et al., 2005; ENDERBY et al., 2006). Estes estudos podem estimar o grau de isolamento e a troca de material genético entre populações, ao longo do espaço e do tempo, fornecendo uma estimativa da taxa de invasão ou re-invasão de determinada área, e ainda inferir linhagens diferenciadas e isoladas que ocupam diferentes culturas (MARTEL et al., 2003). Estas estimativas são de grande importância para o conhecimento de seus efeitos sobre a evolução de resistência às principais medidas de fitoproteção (CAPRIO; TABASHNIK, 1992; ALSTAD; ANDOW, 1995; SCHNEIDER et al., 1999). No entanto, as informações sobre a variabilidade e estrutura genética da lagarta-da-maçã do algodoeiro, *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) são escassas nas condições brasileiras.

H. virescens é uma praga migratória facultativa, com capacidade de se dispersar em escalas locais e inter-regionais. 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). O principal hospedeiro dessa praga é o algodão (*Gossypium hirsutum* L.), no entanto, ela apresenta comportamento alimentar polífago, podendo alimentar-se de tabaco, tomate, girassol e feijoeiro (FITT, 1989). Recentemente, esta espécie também tem sido registrada atacando plantas de soja no Brasil (TOMQUELSKI, 2009). A ocorrência de *H. virescens* em campos de algodão e soja tem um impacto significativo sobre programas de manejo integrado de praga dessas culturas.

Apesar dos esforços para integrar diferentes táticas de controle para o manejo de *H. virescens*, o uso de inseticidas tem sido a principal ferramenta de controle. Devido ao uso excessivo de inseticidas, *H. virescens* já demonstrou habilidade em evoluir resistência (McCAFFERY, 1998; MARTINELLI; OMOTO, 2006), o que torna seu manejo especialmente

difícil. Uma alternativa para controlar o ataque desse inseto-praga tem sido o uso do algodão geneticamente modificado (GM) contendo gene(s) da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt) que foi aprovada para plantios comerciais pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) desde 2005 no Brasil. Devido à expressão contínua da proteína inseticida nos tecidos da planta durante todo o seu período de desenvolvimento, plantas GM exercem uma elevada pressão de seleção sobre as populações de insetos-praga que são alvo de controle. Além do mais, a soja GM, que expressa a proteína Cry1Ac de Bt, foi liberada para o plantio comercial em 2010 pela CTNBio. Este cenário pode elevar ainda mais a pressão de seleção sobre essa espécie e, juntamente com a existência de variabilidade genética que possibilite *H. virescens* adaptar-se às medidas de controle, implica em um processo inevitável de seleção da resistência (GOLD, 1988ab; 1991). Adicionalmente, o fluxo gênico pode ser capaz de manter a uniformidade da variabilidade genética entre as populações, bem como trazer variações para dentro das populações, permitindo que as adaptações que conferem resistência se espalhem entre as populações de *H. virescens* (CAPRIO; TABASHNIK, 1992).

Neste contexto, o uso de marcadores moleculares tem se revelado uma importante e eficiente ferramenta para quantificar a variabilidade genética e o fluxo gênico existente entre e dentro de populações de insetos, auxiliando nas tomadas de decisões do MIP que visem retardar a evolução da resistência a qualquer tática de controle de insetos. Inúmeros trabalhos utilizando diferentes marcadores moleculares têm sido realizados para os principais lepidópteros-praga como *Alabama argillacea* (Hübner) (PAVINATO, 2010), *Cydia pomonella* (L.) (TIMM et al., 2006; FUENTES-CONTRERAS et al., 2008), *Helicoverpa armigera* (Hübner) e *H. zea* (Boddie) (BEHERE et al., 2007), *Heliothis virescens* (ROEHRDANZ et al., 1994; HAN et al., 2004), *Plutella xylostella* (L.) (PICHON et al., 2006; ENDERSBY et al., 2006), *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (BOURGUET et al., 2000; COATES et al., 2004; 2005) e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (BUSATO et al., 2004; MARTINELLI et al., 2006; 2007). Deste modo, o entendimento da estrutura genética e do fluxo gênico entre populações de *H. virescens* por meios de marcadores moleculares 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 marcadores microssatélites nucleares.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Aspectos bioecológicos de *Heliothis virescens*

Heliothis virescens, conhecida como lagarta-da-maçã do algodoeiro, é uma espécie restrita a regiões tropicais e subtropicais (POOLE; MITTER; HUETTEL, 1993). Sua distribuição geográfica abrange desde a Bolívia e Peru, passando por Brasil, Estados Unidos até o Sul do Canadá. No Brasil, esta espécie ocorre do Nordeste ao Centro-Sul (FITT, 1989). De acordo com Capinera (2001), *H. virescens* é uma espécie nativa dos Estados Unidos, porém Poole; Mitter; Huettel (1993) sugerem que o centro de diversidade da espécie é o Brasil, implicando que o país poderia ser o centro de origem de *H. virescens*.

Treze espécies diferentes foram propostas para o gênero *Heliothis*, que aparece como monofilético de acordo com caracteres morfológicos (POOLE; MITTER; HUETTEL, 1993). *H. virescens* aparece mais proximamente relacionada à *H. subflexa* (Guenée), e forma junto com esta um grupo composto pelas principais linhagens de insetos pragas, incluindo *Helicoverpa zea* (CHO et al., 2008).

H. virescens é uma espécie polífaga, sendo o algodão (*Gossypium hirsutum*) a principal planta hospedeira da espécie no Brasil, na qual se alimenta dos botões florais, das maçãs e também das folhas (DEGRANDE, 1998). Recentemente, esta espécie vem sendo considerada praga severa da soja, principalmente nas fases posteriores ao início do florescimento, quando destroem folhas, flores, vagens e grãos (TOMQUELSKI, 2009). Além da soja e do algodão, essa espécie também é capaz de se alimentar de tabaco, tomate, girassol e feijoeiro (FITT, 1989). A polifagia confere a *H. virescens* um grande potencial para o aumento e persistência de suas populações em determinadas áreas, possibilitando que a fêmea encontre com maior facilidade um hospedeiro capaz de sustentar o desenvolvimento larval. Além disso, permite que diferentes

populações se desenvolvam simultaneamente em hospedeiros distintos dentro de uma região (FITT, 1989). Devido a esse hábito generalista, lagartas de *H. virescens* podem inclusive ter desenvolvido sistemas de desintoxicação para lidar com compostos secundários presentes nas diferentes plantas usadas como alimento (COLLINS et al., 1984).

De acordo com Georghiou; Taylor (1986), a polifagia pode retardar a evolução da resistência a agroquímicos devido à possibilidade de dispersão de indivíduos suscetíveis de áreas não tratadas para a cultura tratada com agroquímicos, ou mesmo para culturas geneticamente modificadas. Com a intensificação da agricultura, uma das características desse novo cenário agrícola é o cultivo de diferentes espécies de culturas o ano todo e em regiões vizinhas. Nestas condições, a polifagia, associada com a capacidade de dispersão das espécies, pode expor a praga a repetidas pressões de seleção por inseticidas em diferentes culturas ao longo do ano agrícola em uma mesma região.

A capacidade de movimentos locais e inter-regionais de dispersão é um fator adicional importante que conduz ao sucesso de *H. virescens* como praga. As mudanças no sistema agrícola, devido à sucessão de culturas, exigem mobilidades em ambas às escalas, locais e regionais (FITT, 1989). Esta espécie é considerada uma praga sedentária, embora apresente alta mobilidade local (SCHNEIDER, 1999). Os adultos são migrantes facultativos, podendo migrar em resposta às más condições locais para a reprodução (por exemplo, escassez de fontes de néctar ou hospedeiro para alimentação das lagartas) (FITT, 1989).

Há uma variação considerável entre as espécies de pragas na importância relativa dos movimentos migratórios. Farrow; Daly (1987) classificaram as espécies de Heliothinae em ordem decrescente de atividade migratória, colocando *H. virescens* como uma espécie de atividade intermediária. Baseados nesses resultados, Farrow; Daly (1987) definiram três categorias de movimento de espécies do gênero *Heliothis*: movimentos de curto e de longo alcance e movimentos migratórios, sendo que cada categoria envolve diferentes padrões de comportamento. Os movimentos de curto alcance, ou movimentos triviais, ocorrem dentro ou pouco acima da copa das árvores e envolvem comportamentos como alimentação, oviposição e acasalamento. Estes movimentos continuam por uma a duas horas após o anoitecer e geralmente são limitados dentro dos habitats, em distâncias de 100 a 1000 metros. Os movimentos de longo alcance ocorrem em alturas de até dez metros, o inseto pode controlar sua velocidade de voo e orientação em relação ao vento predominante (FARROW; DALY, 1987; DRAKE; FARROW,

1988), e incluem movimentos entre culturas, entre os locais de alimentação e oviposição, e entre sítios de oviposição e emergência local. São movimentos de um a 10 quilômetros e poderiam, portanto, ser classificados como migratórias (FITT, 1989). Movimento migratório ocorre acima da camada limite de voo, onde as mariposas aproveitam os sistemas de escala sinótica do vento em altitudes de até um a dois quilômetros. Estes voos podem continuar por várias horas, possibilitando deslocamentos de centenas de quilômetros a favor do vento (DRAKE; HELM, 1981; DRAKE; FARROW, 1985).

Movimentos migratórios são comuns em lepidópteros. A ocorrência de *Helicoverpa zea*, uma espécie proximamente relacionada à *H. virescens* (CHO et al., 2008), em estados do Centro-Norte dos Estados Unidos, é atribuída à migração oriunda dos estados do Sul do país, já que muitas vezes pouco ou nenhum inseto sobrevive ao inverno nestas regiões (FITT, 1989). Em relação a *H. virescens*, Poole; Mitter; Huettel (1993) mencionam que mariposas recém emergidas migram a cada ano dos Estados Unidos para o Sul do Canadá. No Brasil não há informações disponíveis sobre os movimentos migratórios dessa espécie.

Uma característica complementar que contribui para o sucesso de *H. virescens* como praga é sua alta fecundidade. Estes insetos apresentam alta capacidade reprodutiva, sendo que a fêmea oviposita de 500 a 800 ovos durante sua vida reprodutiva (estimada em oito a dez dias) (MORETI, 1980). A longevidade das mariposas é relatada em aproximadamente 25 dias quando mantida a 20° C e 15 dias a 30° C, em condições de laboratório (CAPINERA, 2001). O tempo total de uma geração é relativamente curto, em torno de 45 dias (MORETI, 1980), o qual, combinado com uma alta fecundidade, permite que *H. virescens* tenha uma alta capacidade de aumento populacional e sobreposição de gerações. Nos Estados Unidos, têm sido relatadas quatro gerações em um único ciclo da cultura (CAPINERA, 2001). No Brasil, esse inseto pode completar até três gerações em um único ciclo da cultura do algodão (DEGRANDE, 1998).

O conjunto de características descritas anteriormente permite que *H. virescens* explore diversos hospedeiros cultivados e não cultivados, levando a rápidas taxas de crescimento e grande potencial de danos a culturas como algodão e soja no Brasil. A alta mobilidade permite a colonização de habitats adequados (FITT, 1989).

2.1.2 Genética de populações de lepidópteros praga no manejo da resistência

As plantas geneticamente modificadas (GM) provaram ter sucesso em termos de controle de pragas, permitindo a redução do uso de inseticidas químicos (BETZ et al., 2000; FERRÉ; VAN RIE, 2002). No Brasil, plantas GM para o controle de pragas por meio da incorporação de genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* (Bt), que codificam proteínas inseticidas, foram liberadas para o plantio comercial pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) em 2005, com a aprovação do algodão Bt evento 531, que expressa a proteína inseticida Cry1Ac. Hoje estão liberados para o plantio quatro cultivares que codificam proteínas com atividade de controle de *H. virescens*: algodão Bollgard® (Cry1Ac), algodão Bollgard® II (Cry1Ac e Cry2Ab2), algodão Widestrike® (Cry1Ac e Cry1F) e soja BtRR2Y (Cry1Ac). A principal estratégia para a implementação dessa tecnologia com sucesso é a de alta dose associada a áreas de refúgio. Considera-se um evento como de alta dose se a expressão de toxinas inseticidas de Bt for pelo menos 25x superior à necessária para matar 99% de uma população da praga suscetível de referência (GOULD; TABASHNIK, 1998). A área de refúgio consiste no plantio de variedades que não expressam a(s) toxina(s), juntamente com as plantas GM (GOULD, 1998; BATES et al., 2005; TABASHNIK, 2008). No entanto, a expressão contínua das toxinas inseticidas nos tecidos da planta e durante todo o período de desenvolvimento faz com que as plantas Bt exerçam uma elevada pressão de seleção sobre as populações de insetos-praga que são alvo de controle, o que poderia conduzir à evolução da resistência, fato que configura em uma diminuição da suscetibilidade de uma população a uma determinada toxina (TABASHNIK, 1994).

De acordo com Gould (1998), o potencial de evolução de resistência de populações de insetos a toxinas de Bt é uma das principais ameaças e limitações ao emprego sustentável desta tecnologia para o controle de pragas agrícolas. Sendo assim, a evolução da resistência de pragas-alvo é considerada o principal componente de fracasso das plantas GM (TABASHNIK et al., 2008). Neste contexto, há vários casos caracterizados de evolução da resistência de *H. virescens* a toxinas de Bt expressas em plantas GM em condições de laboratório (STONE; SIMS, 1991; GOULD et al., 1992; 1995).

Programas de manejo que visem retardar a evolução da resistência são mais efetivos quando implementados de modo preventivo e contínuo. Para subsidiar estratégias proativas de manejo da resistência, há necessidade de um melhor entendimento da atual variabilidade genética que existe nas populações desses organismos e como ela varia ao longo do tempo (CAPRIO et al., 2000).

Estudos de genética de populações de pragas agrícolas têm destacado a importância da migração e do fluxo gênico no Manejo Integrado de Pragas (MIP), devido em grande parte ao seu efeito potencial na taxa de evolução de resistência. Como as populações de espécies-praga estão frequentemente sujeitas à aplicação de medidas de fitoproteção, tais como inseticidas e culturas transgênicas, a evolução da resistência é fortemente influenciada pela estrutura populacional das espécies (FUENTES-CONTRERAS et al., 2008). Uma população, do ponto de vista genético, é definida como um conjunto de indivíduos de uma mesma espécie que compartilham o mesmo conjunto gênico, isto é, indivíduos que compartilham seus genes através da reprodução (FALCONER; MACKAY, 1989). Estudos sobre a estrutura genética de populações têm demonstrado, ao longo do tempo, que as espécies raramente são constituídas por populações únicas e panmíticas (com acasalamento totalmente ao acaso); pelo contrário, diferenças genéticas são encontradas entre as populações (MACHADO; FIUZA, 2010).

De acordo com Hamrick (1983), o estudo da diversidade genética em populações naturais compreende a descrição dos níveis em que a variação genética é mantida dentro das populações, bem como a forma em que ela é dividida entre as populações. A estrutura genética é a distribuição não aleatória dos alelos e genótipos dentro das espécies (HAMRICK, 1983). Sua manutenção ocorre devido à interação entre fatores evolutivos, como seleção natural, deriva genética, migração e mutação, com fatores ecológicos, tais como o sistema reprodutivo, a distribuição espacial, o tamanho efetivo e a dispersão (HAMRICK, 1989). A migração ou fluxo gênico atuam promovendo a homogeneidade genética, enquanto que a deriva favorece a diferenciação; mutações e seleção natural favorecem adaptações às condições ambientais locais que podem levar à diferenciação genética das populações (FUTUYMA, 1992). Essa diferenciação genética depende em grande parte do equilíbrio entre fluxo gênico, deriva genética e seleção natural (FUTUYMA; 1998). Portanto, a diversidade genética é considerada uma condição básica para a população manter sua aptidão reprodutiva, reagir a mudanças ambientais e garantir a sobrevivência a longo prazo (SACCHERI et al., 1998; BROOK et al., 2002), ou seja, adaptações às mudanças do agroecossistema só são possíveis devido à diversidade genética.

A alteração genética de uma população pode ser avaliada pela mudança nas suas frequências gênicas, o que torna a estimativa da frequência de heterozigotos fundamental nos estudos evolutivos (NEI, 1978). O sistema pelo qual a espécie se reproduz influencia diretamente em suas frequências alélicas e genotípicas. Uma população de tamanho infinito, que pratica

cruzamentos ao acaso, está em equilíbrio de Hardy-Weinberg quando suas frequências alélicas e genotípicas não se alteram nas gerações sucessivas, e há total ausência de migração, mutação, seleção e deriva genética. Por este princípio, o cálculo da frequência dos genótipos é possível a partir das frequências dos alelos (FUTUYAMA, 1992). Os estudos de estrutura genética são fundamentados no teorema de Hardy-Weinberg, que é a base da teoria genética da evolução. Este assume que a frequência dos alelos não muda de uma geração para outra e considera que a única mudança na composição genética da população é a redistribuição dos genótipos em frequências que serão mantidas em todas as gerações subsequentes. Tal fundamentação ainda propõe que as diferenças encontradas entre a população “ideal” (em equilíbrio) e a população real (em estudo) seriam os ingredientes da evolução (FUTUYAMA, 1992).

A distribuição da variabilidade genética está associada à forma como os genótipos e alelos estão distribuídos no tempo e no espaço, seja entre populações distintas geograficamente, ou dentro de um grupo local, ou mesmo em grupos de progênies (LOVELESS; HAMRICK, 1984). Dessa forma, o comportamento da distribuição da variabilidade genética caracteriza a sua estrutura genética, a qual corresponde à forma como a variabilidade genética é distribuída (BROWN, 1978). A variabilidade genética é normalmente utilizada para descrever variações herdáveis encontradas dentro de entidades biológicas e pode ser mensurada em indivíduos, populações e espécies. Em um loco particular, a diversidade pode estar presente dentro de indivíduos, ou seja, encontram-se indivíduos com locos homozigotos e heterozigotos. Ela pode estar presente dentro da população, sendo observada quando os alelos presentes em um loco variável são encontrados em indivíduos diferentes. Se existir mais de dois alelos e os organismos forem diplóides, nenhum dos indivíduos poderá exibir a variação total presente dentro do loco. Adicionalmente, a diversidade pode estar presente dentro das espécies, o que se verifica observando a variação nas frequências alélicas entre populações (LOWE; HARRIS; ASHTON, 2005).

Portanto, o estudo da estrutura genética das populações é um componente importante de programas de manejo e controle de pragas, pois pode 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. A natureza e extensão do fluxo gênico dependem amplamente de características biológicas intrínsecas ao organismo, tais como modo de reprodução e mobilidade dos indivíduos. Espécies

com alta dispersão podem encontrar-se distribuídas ao longo de grandes distâncias e, desse modo, ter populações mais homogêneas (HAAG et al., 1993; VANDEWOESTIJNE et al., 1999; KRAUSS et al., 2004), enquanto espécies com baixa capacidade de dispersão têm populações mais estruturadas geneticamente numa escala espacial fina (PETERSON 1996; WILLIAMS et al., 2003; SCHMITT; HEWITT, 2004). Além disso, a força relativa do fluxo gênico pode ser afetada por uma variedade de fatores ecológicos que variam intra e interespecificamente, tais como assincronia fenológica entre populações, persistência do hábitat, persistência populacional, fatores ambientais como ambiente físico, estrutura espacial do hábitat, distância geográfica e especialização da dieta (RICKLEFS, 2003; SCRIBNER et al., 2005). A existência de raças associadas ao hospedeiro muitas vezes afeta o fluxo gênico e a diferenciação genética de insetos (MILLER et al., 2003) levando a um isolamento reprodutivo (HENDRY et al., 2007).

Para o refinamento das estratégias de manejo da resistência, é de grande relevância o entendimento da variabilidade e estrutura genética das populações das pragas-alvo e do fluxo gênico entre populações e subpopulações, assim como os efeitos do fluxo gênico em pequena e grande escala (TABASHNIK, 1991; CAPRIO; TABASHNIK, 1992; CAPRIO et al., 2000; MACHADO; FIUZA, 2010). Desta forma inúmeros trabalhos utilizando marcadores moleculares vêm sendo realizados em grupos de lepidópteros (Quadro 1).

Espécie	Origem	Marcador	F_{ST}	Referência
<i>Alabama argillacea</i>	Brasil	Microssatélite	0,036	Pavinato (2010)
<i>Cydia pomonella</i>	Suíça	Microssatélite	0,064	Chen et al. (2009)
	Europa Central	AFLP	0,709	Thaler et al. (2008)
	Chile	Microssatélite	0,002	Fuentes-Contreras et al. (2008)
	África do Sul	AFLP	0,378	Timm et al. (2006)
<i>Helicoverpa armigera</i>	Diversas localidades	mtDNA	0,02	Behere et al. (2007)
	Austrália	Microssatélite	0,002	Endersby et al. (2006)
	Israel e Turquia	RAPD	0,013	Zhou et al. (2000)
<i>Helicoverpa zea</i>	Brasil e EUA	mtDNA	0,008	Behere et al. (2007)
<i>Heliothis virescens</i>	EUA	Aloenzimas	0,002	Korman et al. (1993)
	Austrália	Isoenzimas, RAPD	0,001-0,018	Han et al. (2004)
	Brasil	mtDNA	0,019	Albernaz (2011)
<i>Ostrinia nubilalis</i>	França	Aloenzimas	0,003	Bourguet et al. (2000)
	França	Izoenzima, mtDNA	0,07	Martel et al. (2003)
	America do Norte	PCR-RFLP	0,023	Coates et al. (2004)
	EUA	AFLP	0,165	Krumm et al. (2008)
<i>Plutella xylostella</i>	Diversas localidades do mundo	Aloenzimas	0,01	Pichon et al. (2006)
	Austrália	Microssatélite	0,007	Endersby et al. (2008)
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Brasil	RAPD	0,183	Martinelli et al. (2006)
	Argentina, Brasil, EUA e México	AFLP	0,321	Martinelli et al. (2007)

	Brasil	AFLP	0,54	Busato et al. (2004)
--	--------	------	------	----------------------

Quadro 1 - Uso de marcadores moleculares em estudos de genética de populações de lepidópteros considerados pragas agrícolas, indicando os valores de F_{ST}

2.1.3 Marcadores Microssatélites

Microssatélites são repetições em cadeia de pequenas sequências de um a seis nucleotídeos adjacentes. Todos os organismos analisados até o momento têm apresentado regiões de microssatélites dentro do genoma (HANCOCK, 1999). Estes são encontrados principalmente em regiões não codificantes do genoma, porém, também são encontrados em menor taxa em sequências de regiões promotoras.

Em genomas de eucariotos, estas sequências são muito mais frequentes e melhor distribuídas ao acaso. Elas apresentam tamanhos mais variáveis (SCHLÖTTER, 2004), possuem expressão codominante, são multialélicos e apresentam alto grau de polimorfismo genético (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O polimorfismo desses marcadores foi historicamente detectado após a amplificação do DNA via PCR (amplificação em cadeia da polimerase) e a separação dos produtos por eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose (WU; TANKSLEY, 1993). Atualmente, uma metodologia que faz uso de sequenciadores automáticos está disponível (SCHUELKE, 2000; MISSIAGLIA; GRATTAPAGLIA 2006), e tem se demonstrado mais prática e mais precisa na genotipagem dos indivíduos. O polimorfismo é resultado do número de repetições do motivo que caracteriza o loco microssatélite e cada segmento de DNA representa um alelo daquele loco específico (SOUZA, 2001; BORÉM; CAIXETA, 2006). Deste modo, os diferentes alelos de um loco microssatélite distinguem-se uns dos outros pelo número de repetições de pares de bases que apresentam.

Os microssatélites são classificados conforme a composição das sequências repetidas: (a) repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção, por exemplo: GTGTGTGTGTGTGTGT; (b) repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases que não correspondem ao motivo, por exemplo: GTGTGTGTaGTGTGTT; (c) repetições compostas, quando duas ou mais repetições (classes) de microssatélites estão dispostas em sequência, por exemplo: GTGTGTGTGTGTCACACACACACA (BORÉM; CAIXETA, 2006).

Segundo Hancock (1999), o mecanismo de deslizamento da polimerase durante a replicação e a permutação (*crossing-over*) desigual estão relacionados com o polimorfismo dos microssatélites. Durante o processo de recombinação, a permutação desigual pode ser responsável pela alta taxa de polimorfismo destes marcadores, que por problemas no pareamento dessas sequências durante o quiasma, aumenta a taxa de mutação das regiões microssatélites. Estas mutações ocorrem em uma frequência de 10^{-3} e 10^{-4} por loco por gameta em cada geração, e é isto que torna estes marcadores tão informativos (STRAND et al., 1993).

Os marcadores microssatélites são mais simples de usar do que os marcadores RFLP – “*Restriction Fragment Length Polymorphism*” (polimorfismo no tamanho de fragmentos de restrição) e, diferente destes, requerem pouca quantidade (nanogramas) e qualidade de DNA. Possuem ainda a vantagem de serem trocados entre pesquisadores ou centros de pesquisa, pois cada loco é definido por um par de sequências de iniciadores, mantendo o mesmo resultado independente de onde o pesquisador esteja trabalhando. Ensaio com microssatélites são mais robustos do que os obtidos com RAPD – “*Random Amplified Polymorphic*” DNA (DNA polimórfico amplificado arbitrariamente), e mais transferíveis do que AFLP – “*Amplified Fragment Length Polymorphisms*” (polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados). Quando comparados com os outros marcadores, AFLP, RAPD e aloenzimáticos, os microssatélites apresentam o mais alto conteúdo informativo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). As vantagens dessa tecnologia quando comparada aos outros marcadores está relacionada no Quadro 2.

A escolha da técnica e do marcador a serem utilizados depende do problema a ser analisado e dos recursos disponíveis para a realização do trabalho (SNNUCKS, 2000; SOLFERINI; SELIVON, 2001). Os marcadores dominantes requerem mais indivíduos e mais locos quando comparados com marcadores codominantes (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores codominantes fornecem mais informação genética por loco e possibilitam inferir sobre a heterozigosidade de uma população (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; SCHLÖTTERER, 2004).

A grande limitação do uso em larga escala de marcadores microssatélites é a obtenção dos iniciadores específicos, pois até recentemente essa técnica requeria trabalho intenso no desenvolvimento e o custo inicial era muito elevado (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Entretanto, sítios microssatélites são conservados entre espécies relacionadas, possibilitando o

aproveitamento dos iniciadores, denominados heterólogos, que foram desenvolvidos para uma espécie e seu emprego nas demais espécies do gênero (RAFALSKI; TINGEY, 1993; BROWN et al., 1996; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; CANALES-AGUIRRE et al., 2010; LOPES et al., 2010). Os marcadores microssatélites, devido à habilidade de revelar alta diversidade de alelos por loco, são usados em estudos de genética de populações de diversas espécies (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998, SCHLÖTTERER, 2004).

Atributos	Isoenzimas	RAPDs	AFLPs	Microssatélites
Nível de polimorfismo	Baixo	Baixo-alto	Muito alto	Muito alto
Número de locos	Moderado<50	Alto	Alto	Alto
Expressão genética	Codominante	Dominante	Dominante	Codominante
Número de alelos por loco	2-5	2	2	Multialélico
Distribuição no genoma	Região de cópia única	Ao acaso	Ao acaso	Ao acaso
Acessibilidade tecnológica	Muito alta	Muito alta	Média	Muito baixa
Identificação de genótipo	Baixa	Muito alta	Muito alta	Muito alta
Mapeamento genético	Baixa	Alta	Alta	Muito alta

Quadro 2 - Análise comparativa entre alguns dos marcadores moleculares mais utilizados em estudos de genética de populações (adaptado de FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998)

Os parâmetros mais utilizados para descrever a variabilidade e a estruturação genética de uma população com dados de marcadores microssatélites são: as frequências alélicas, a heterozigiosidade observada (H_O) e esperada (H_E) ou diversidade genética, o conteúdo de informação polimórfico (PIC), o desvio ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), as estatísticas F (F_{IS} , F_{ST} e F_{IT}) e as distâncias genéticas. A precisão dessas estimativas depende do número de locos avaliados, da heterozigiosidade e do número de amostras de cada população (BARKER, 1994).

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Coleta dos insetos

As lagartas de *H. virescens* foram coletadas em plantas de algodão e soja nos seguintes estados produtores: Bahia, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, durante as safras 2007/2008, 2008/2009 e 2009/2010 (Figura 1 e Quadro 3). As lagartas coletadas foram acondicionadas em recipientes plásticos contendo dieta artificial, sendo posteriormente, encaminhadas ao Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas da ESALQ/USP, Piracicaba-SP. Em laboratório, as lagartas foram criadas em dieta artificial à base de gérmen de trigo e feijão branco, mantidas em sala de criação à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 14 horas. Os adultos foram imediatamente congelados após a emergência e armazenados em freezer à -20°C . Aproximadamente 20 indivíduos de cada localidade foram amostrados para o estudo de genética de populações usando marcadores microssatélites (Quadro 3).

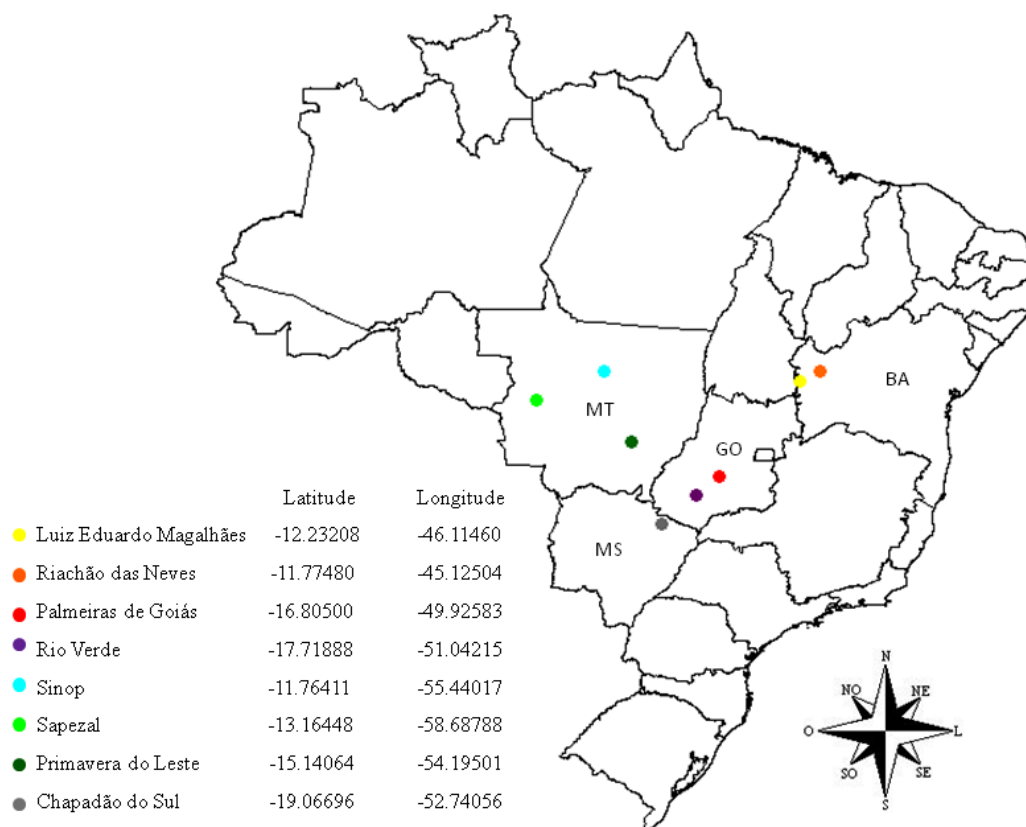


Figura 1– Localidades de coleta das populações de *H. virescens*

Cidade, Estado	Nº de indivíduos	Mês/Ano	Hospedeiro	Código
Luiz Eduardo Magalhães, Bahia	15	01/2008	Algodão	BALEM08_Alq
Palmeiras de Goiás, Goiás	14	05/2008	Algodão	GOPG08_Alq
Sinop, Mato Grosso	08	05/2008	Algodão	MTSIN08_Alq
Chapadão do Sul, Mato Grosso do Sul	18	04/2008	Algodão	MSCS08_Alq
Luiz Eduardo Magalhães, Bahia	18	02/2009	Algodão	BALEM09_Alq
Rachão das Neves, Bahia	26	03/2009	Algodão	BARN09_Alq
Rio Verde, Goiás	21	04/2009	Algodão	GORV09_Alq
Primavera do Leste, Mato Grosso	12	03/2009	Algodão	MTPL09_Alq
Sapezal, Mato Grosso	18	02/2009	Algodão	MTSAP09_Alq
Luiz Eduardo Magalhães, Bahia	21	01/2010	Algodão	BALEM10_Alq
Luiz Eduardo Magalhães, Bahia	15	01/2010	Soja	BALEM10_Soj
Chapadão do Sul, Mato Grosso do Sul	19	01/2010	Soja	MSCS10_Soj

Quadro 3 - Localidades de origem e planta hospedeira onde as populações de *H. virescens* foram coletadas em diferentes safras

2.2.2 Caracterização dos locos microssatélites

2.2.2.1 Extração de DNA

O DNA genômico total foi extraído de amostras de *H. virescens* a partir de tecido torácico fresco de adultos, utilizando o protocolo do kit Invisorb Spin Tissue Mini (Uniscience) conforme as instruções do fabricante. Foram extraídos DNA de 312 indivíduos provenientes das regiões apresentadas na Figura 1.

O gene mitocondrial *citocromo c oxidase* subunidade I (COI) foi escolhido para as análises da qualidade da extração do DNA, pois esta região é de fácil amplificação. Os iniciadores utilizados foram o LCO (F) (5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G 3') e

HCO (R) (5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3') (FOLMER et al., 1994), usando o seguinte programa de amplificação: um ciclo a 95°C por 5 min, 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 47°C por 30 seg e 72°C por 1 min e 30 seg, seguido de um ciclo a 72°C por 10 min. As reações de PCR foram feitas para um volume final de 25 µL, usando 1 µL de DNA total, 2,0 mM de MgCl₂, 40 µM de dNTPs, 0,2 mM de cada iniciador, 1U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega), e 10% de tampão Taq 10X. O resultado da amplificação foi visualizado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, e posteriormente fotografado em transluminador UV (Bio-Imaging Systems) para visualização das bandas dos fragmentos amplificados. As amostras que não amplificaram a região COI foram descartadas e as amostras que amplificaram foram identificadas e armazenadas em freezer (-20°C), totalizando 205 amostras que foram utilizadas nas amplificações dos locos microssatélites (Quadro 3). Com esse “controle de qualidade” foi possível detectar a baixa qualidade de algumas das amostras, mantendo somente aquelas com DNA de boa qualidade.

A concentração de DNA de cada amostra foi estimada pela intensidade de fluorescência emitida pelo corante brometo de etídio sob UV em géis de agarose a 0,8%. Essa intensidade foi comparada a de padrões com pesos moleculares e concentrações específicas do marcador Low DNA Mass Ladder (Invitrogen). A partir dessas concentrações estimadas, foi feita a diluição das amostras em água deionizada e desmineralizada, padronizando-se as concentrações das amostras em 3ng de DNA total/µL.

2.2.2.2 Obtenção e seleção dos iniciadores

Quinze iniciadores microssatélites foram desenvolvidos e testados para *H. virescens* por Perera et al.¹ (submetido). Dos iniciadores desenvolvidos para a espécie nove foram utilizados para amplificação e genotipagem dos locos microssatélites neste estudo (Tabela 1). Segundo Perera et al. (submetido) alguns dos iniciadores utilizados no presente trabalho delimitam locos de regiões codificantes (EST – Expressed Sequence Tag) com destaque para os iniciadores HvMS117 que acessa regiões do canal de sódio de *H. virescens* e HvMS326 que acessa uma proteína anticongelante.

¹ PERERA, O.P.; BLANCO, C.A.; BALLARD, L.; SIVA-BRANDÃO, K.L.; DOMINGUES, F.A.; ABEL, C.A. Evaluation of Anonymous and Expressed Sequence Tag Derived Polymorphic Microsatellite markers in the Tobacco Budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). Submetido ao jornal Southwestern Entomology.

Iniciadores (n° de acesso #)	Loco	Sequências dos iniciadores 5' - 3'	Motivo	Amplitude Alélica (pb)	T (°C) de anelamento
HvMS117* (JF310676)‡	Loco 01	D: TGCTTGTGCGCTATAATATGTCCA R: ATAGGTTTGTATGTTGGTGCCAAGT	TGA	100 - 200	59
HvMS138 (JF310679)	Loco 02	D: AGCTCAAGAGCGAAAGAGATTTCAG R: CGTCGCTTTTCTTACTAAACTCCG	ATG	100 - 200	59
HvMS222 (JF310679)‡	Loco 03	D: TGCATTTGAATGGCAATAATGTTC R: TGCAGTTACATAAAGGATGGCAGA	GAT	100 - 200	54
HvMS227 (JF310680) ‡	Loco 04	D: TCCGACAGATGAAGGCATAGAAAT R: AGACAGTTCGTCCGATTGAGACTT	TC	100 - 250	54
HvMS326 (JF310681)‡	Loco 05	D: ACCAGGTTGTCCAACATGATTCTT R: ATAACACCTACCTGCATGCCAAAT	TGAC	100 - 200	50
HvMS566* (JF310683)	Loco 06	D: GGTGTGGCAACAAATGAACAAAC R: GCGAGGATAACAACACAACCAAGT	GTT	100 - 200	59

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores microssatélites utilizados no estudo e número de acesso no GenBank, nome dos locos, motivo do microssatélite acessado, amplitude dos produtos de PCR em pares de base (pb) e temperatura de anelamento

HvMS566* (JF310683)	Loco 06	D: GGTGTGGCAACAAATGAACAAAC R: GCGAGGATAACAACACAACCAAGT	GTT	100 - 200	59
HvMS1942* (JF310686)	Loco 07	D: ATGCTAATCGTACGGTGTAGTTTCA R: TTTTCGGTAATTTGGAATCGTTGA	CAT	100 - 200	59
HvMS1974* (JF310687)‡	Loco 08	D: ATGACAAGATTACAGCAGCGTGAA R: TCATAACTAACTGATTGGTCCGCA	CAA	100 - 200	50
HvMS596944* (JF310690)	Loco 09	D: AGCATGTGTATAGAACGGTGGTCA R: CCATGTCAAACAGGCGTGAA	GAA	100 - 200	54

Foram realizados testes para determinar as melhores condições de amplificação para cada iniciador. As reações de PCR foram feitas para um volume final de 20 µL, contendo 3,0 ng do DNA; 0,5 mM de fluoróforo (FAM, HEX ou NED); 40,0 µM de dNTP; 1,0 mg de BSA, tampão para *Taq* polimerase 1X; 2,0 mM de MgCl₂; água Milli-Q; 1,0 u de *Taq* polimerase; 2,0 mM de cada iniciador (direto e reverso). As reações foram incubadas em um termociclador Veriti 96 well modelo 9902 (Applied Biosystems) programado para realizar uma desnaturação inicial a 95° por

5 min., 30 ciclos compostos por 30 seg. de desnaturação a 94°C, 45 seg. com temperatura de anelamento variando para cada iniciador, 45 seg. a 72° C para ação da *Taq* polimerase seguido de 8 ciclos compostos por 30 seg. de desnaturação a 94°C, 45 seg. com temperatura de anelamento para os fluoróforos e 45 seg. a 72° C para sua ação, finalizando com 10 min. para extensão das fitas de DNA a 72° C (SCHUELKE, 2000). Para a padronização das reações de PCR foram testadas cinco amostras provenientes das populações coletadas em 2008 e 2009, variando as temperaturas de anelamento dos iniciadores (50, 52, 54, 56, 58, 60°C) e as concentrações de DNA, BSA, MgCl₂ e fluoróforos. As reações de PCR foram avaliadas em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, posteriormente fotografado em UV para visualização das bandas dos fragmentos amplificados.

2.2.2.3 Amplificação dos locos microsatélite

Uma reação de amplificação foi feita para cada par de iniciador, com volume final de 20 µL, contendo 1,0 µL do DNA genômico das amostras; 0,05 µL de fluoróforo (0,5 mM); 0,4 µL de dNTP (40,0 µM); 4,0 µL de dimetilsulfoxi (DMSO 5%); 4,0 µL tampão para *Taq* polimerase (1X); 2,0 µL de MgCl₂ (2,0 mM); 7,55 µL água Milli-Q; 0,2 µL de *Taq* polimerase (1,0 u); 0,4 µL de cada iniciador direto e reverso (2,0 mM).

Os iniciadores foram marcados com fluoróforos, como descrito por Schuelke (2000). Por esse método, sequências de nucleotídeos não específicos ao genoma estudado são acopladas à extremidade 5' do iniciador direto de cada loco. Na reação de amplificação, as sequências complementares são sintetizadas juntamente com o iniciador que pareou com a fita de DNA. Deste modo, a partir do terceiro ciclo, a sequência marcada com fluoróforos complementar à cadeia sintetizada pode também ser sintetizada (Figura 2), marcando com fluoróforos toda a cadeia reversa do loco microsatélite (SCHUELKE, 2000). Deste modo, os locos microsatélites ficam marcados com fluorescência específicas do FAM, HEX e NED, permitindo que a genotipagem seja feita de forma multiplex (MISSIAGGIA; GRATAPAGLIA, 2006) em sequenciador automático, ou seja, três locos diferentes podem ser genotipados em uma mesma corrida de sequenciamento.

(Figura 3). Assim, foi possível gerar uma planilha no programa Microsoft Excel® com os alelos e genótipos encontrados para os indivíduos de *H. virescens* das doze populações estudadas.

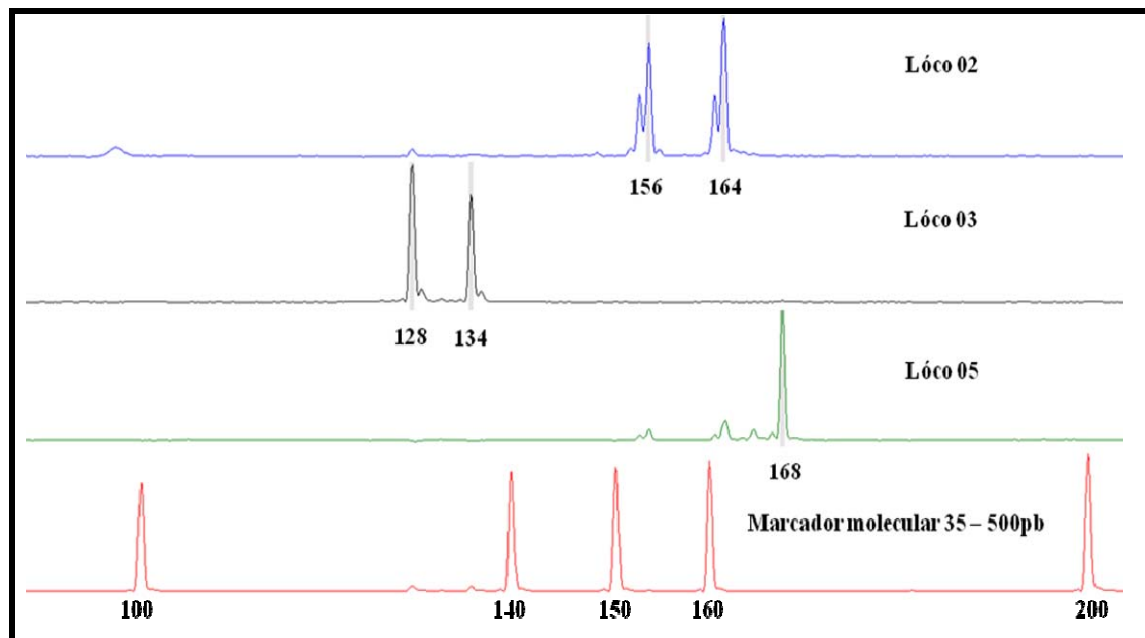


Figura 3 – Exemplo de eletroferograma da genotipagem multiplex em sequenciador automático de um indivíduo de *H. virescens* da população BALEM10_soj, analisado no programa GeneMarker®. Os picos azuis, pretos e verdes representam os alelos encontrados em diferentes locos e as fluorescências emitidas pelos fluoróforos FAM, NED e HEX, respectivamente. Os números abaixo de cada pico representam o tamanho do alelo. Os picos vermelhos representam o marcador de peso molecular ROX de 35 a 500 pb

2.3 Análises

2.3.1 Análise da genotipagem dos nove locos microssatélites

O programa MICRO-CHEKER (VAN OOSTERHOUT et al., 2004) foi utilizado para verificar a presença de alelos que não são amplificados (alelos nulos), a dominância de alelos curtos e a presença de “stutters” (bandas duplicadas). A presença de alelos nulos nos locos induz ao erro de genotipagem, podendo resultar no déficit de heterozigotos observados, causando desvios nas proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). As frequências alélicas e genóticas dos locos foram submetidas a um teste de aderência (teste exato de Fisher) para o cálculo das proporções de EHW, conforme definido por WEIR (1996), utilizando o programa Genepop (RAYMON; ROUSSET, 1995). Este programa segue o procedimento em cadeia de

Markov para estimar o valor exato de p , definido por 5000 desmemorizações, 2000 *batches*, e 2000 iterações, considerando-se um valor de alpha de 0,05, o qual, após ser corrigido por Bonferroni (RICE 1989), foi transformado em um valor nominal de 0,001. Para verificar se as frequências alélicas estão de acordo com as esperadas sob acasalamento ao acaso, foi realizado um teste de equilíbrio de ligação por meio do programa FSTAT (GOUDET, 2001). O valor de significância foi ajustado pela correção de Bonferroni sequencial. A ocorrência de algum desses fatores pode levar a uma compreensão errada da estrutura populacional da espécie.

2.3.2 Análise da diversidade genética intrapopulacional de *H. virescens*

As estatísticas descritivas de cada loco em cada população foram estimadas utilizando o programa MStools (PARK, 2001), que é um suplemento desenvolvido para o Microsoft Excel®. Foram calculadas as frequências alélicas, heterozigosidade observada (H_O), que informa sobre o número total de heterozigotos contados nas populações, heterozigosidade esperada (H_E), que informa a quantidade de heterozigotos esperados na população pelo EHW considerando a frequência observada dos alelos, número de alelos por loco (A) e o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC). Para verificar se as populações de *H. virescens* em estudo haviam passado por um evento de gargalo genético recente, foram realizadas simulações seguindo o modelo de mutação em duas fases (Two-phase model) com valor de p de 0,05 de significância, com o auxílio do programa Bottleneck v. 1.2.02 (CORNUET; LUIKART; PIRY, 1999) com 1000 interações para os testes estatísticos de Wilcoxon. Por este método, populações que tenham passado por uma redução recente no seu tamanho efetivo exibem redução correlacionada do número de alelos e da diversidade gênica esperada sob EHW nos locos polimórficos. Deste modo, o número de alelos é reduzido mais rapidamente, tornando a $H_E > H_{EQ}$ (heterozigosidade esperada sob equilíbrio de mutação e deriva) (CORNUET; LUIKART, 1996). Segundo Luikart; Cornuet (1998) este modelo é o mais recomendado para dados de microssatélites.

2.3.3 Análise da diversidade genética interpopulacional de *H. virescens*

A avaliação das estimativas F de Wright (1951), a partir de uma base não enviesada, foi obtida por meio do estimador de Weir; Cockerham (1984) no programa FSTAT (GOUDET, 2001). Estas estimativas são análogas ao modelo de Nei (1978) ($f = F_{IS}$; $F = F_{IT}$ e $\theta = F_{ST}$). O f é o coeficiente de endogamia, calculado como a média de todos os indivíduos de todos os fragmentos

populacionais; o F é a endogamia total da população e o θ é o efeito da subdivisão populacional sobre a endogamia. Caso uma população apresente altas taxas de fluxo gênico entre os fragmentos, o θ é baixo; no entanto, se as taxas de fluxo gênico são baixas, as populações divergem e tornam-se endogâmicas, e o valor de θ aumenta (FRANKHAM et al., 2008).

Foi calculada também a estimativa de R_{ST} desenvolvidas por Slatkin (1995), com o auxílio do programa GENALEX versão 6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006). A estatística desenvolvida por Slatkin (1995) é análoga ao F_{ST} de Nei (1978).

Também foram obtidas as estimativas θ e R_{ST} agrupando-se as populações por safra, com o objetivo de verificar as variações da divergência genética ao longo dos anos. A partir das estimativas θ foi gerada uma matriz par-a-par composta por todas as populações com o objetivo de observar o grau de diferenciação entre pares de populações.

Foi realizada uma análise para estimar as taxas de migração recente entre as populações coletadas na mesma safra, por meio do programa BayesAss 1.3 (Bayesian Inference of Recent Migration Using Multilocus Genotypes) (WILSON; RANNALA, 2003). Este programa utiliza o algoritmo de Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) para testar a convergência das populações. Para as amostras coletadas em 2008/09/10 foram executadas 20 milhões de interações, descartando os quatro primeiros milhões como *burn in*; os dados foram retirados da cadeia a cada 2000 interações. Com isso, foi possível verificar a porcentagem de migrantes com a qual cada população contribuiu nos diferentes anos de coleta, e assim inferir uma possível rota de migração para as populações de *H. virescens* no Brasil.

Com o auxílio do programa GENALEX v. 6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006), foi desenvolvida uma análise de isolamento por distância pelo teste de Mantel (MANTEL, 1967) a partir de uma matriz composta pela distância geográfica e pela distância genética (θ) linearizada entre as populações, verificando assim a ocorrência de estruturação genética devido à distância geográfica entre as populações em estudo.

2.3.4 Análise de agrupamento das populações de *H. virescens*

Para visualizar o padrão de estruturação populacional de *H. virescens*, foram utilizados dois critérios de agrupamento distintos. Por meio do programa GENALEX 6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006), foi realizada uma análise multivariada de coordenadas principais (PCA, “Principal Coordinate Analysis”) a partir dos valores de θ par-a-par. Também foi aplicada uma

análise de atribuição usando inferência Bayesiana para verificar a estruturação da variabilidade genética entre as populações, utilizado o programa STRUCTURE 2.3.3 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000). Para a estimativa do número de populações (K) foi utilizado o modelo de ancestralidade “*admixture ancestry model*”, com alelos correlacionados (“correlated”) e K variando de um a 20. Para cada valor de K foram realizadas 20 interações independentes com 500.000 repetições de cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) e *burn in* de 50.000 interações. Para estimar o valor de K que melhor se ajusta aos dados, foi usado o ΔK de Evanno; Regnaut; Goudet (2005), usando o aplicativo Structure Harvester v. 0.6.1 (EARL, 2011). O gráfico da estruturação genética foi produzido usando-se os programas CLUMPP 1.1.2 (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007) e DISTRUCT 1.1 (ROSENBERG, 2004).

2.4 Resultados

2.4.1 Diversidade genética intrapopulacional

Foram determinados os genótipos de 205 indivíduos pertencentes a 12 populações de *H. virescens* oriundas das principais regiões produtoras de algodão e soja, em relação a nove locos microssatélites, o que perfaz um total de 1.845 genótipos individuais.

No total, foram encontrados 127 alelos distribuídos entre os nove locos nas doze populações. Os locos foram altamente polimórficos, variando de 9 a 18 alelos, com média de 14,11 (Tabela 2). Os locos 10 e 11 foram os que apresentaram menor variabilidade, enquanto os locos 04 e 07 apresentaram as maiores variabilidades (Tabela 2). O menor número de alelos (28) foi encontrado na população MTSIN08_Alg, em contraposição à população GORV09_Alg, que possui o maior (52) (Tabela 3).

Tabela 2 – Estimativas do número total de alelos (A), heterozigosidade observada ($H_O \pm SE$), heterozigosidade esperada ($H_E \pm SE$) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) para os locos microssatélites utilizados para o estudo populacional de *H. virescens*

Loco	A	H_O	H_E	PIC
loco 01	14	0,352 \pm 0,005	0,569 \pm 0,052	0,513
loco 02	15	0,538 \pm 0,037	0,721 \pm 0,026	0,665
loco 03	15	0,148 \pm 0,042	0,371 \pm 0,075	0,326
loco 04	18	0,210 \pm 0,067	0,359 \pm 0,086	0,306
loco 05	14	0,125 \pm 0,033	0,300 \pm 0,067	0,268
loco 07	16	0,404 \pm 0,071	0,442 \pm 0,063	0,384
loco 10	9	0,187 \pm 0,033	0,225 \pm 0,035	0,199
loco 11	12	0,422 \pm 0,050	0,635 \pm 0,023	0,551
loco 12	14	0,346 \pm 0,066	0,319 \pm 0,056	0,282
Média	14,11	0,303	0,438	0,388

Tabela 3 – Estimativas do número total de alelos (N), média de alelos por população por loco (n), médias das heterozigosidades observada ($H_O \pm SE$) e esperada ($H_E \pm SE$) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) para as doze populações de *H. virescens*

População	N	n	H_O	H_E	PIC
BALEM08_Alg	30	3,33	0,206 \pm 0,035	0,352 \pm 0,093	0,312
GOPG08_Alg	41	4,56	0,294 \pm 0,041	0,439 \pm 0,095	0,398
MTSIN08_Alg	28	3,11	0,317 \pm 0,056	0,414 \pm 0,094	0,353
MSCS08_Alg	33	3,67	0,270 \pm 0,039	0,373 \pm 0,091	0,327
BALEM09_Alg	33	4,13	0,370 \pm 0,041	0,410 \pm 0,087	0,37
BARN09_Alg	36	4	0,292 \pm 0,030	0,302 \pm 0,081	0,267
GORV09_Alg	52	5,78	0,366 \pm 0,035	0,486 \pm 0,074	0,447
MTPL09_Alg	35	3,89	0,316 \pm 0,047	0,496 \pm 0,066	0,433
MTSAP09_Alg	37	4,11	0,331 \pm 0,040	0,489 \pm 0,085	0,426
BALEM10_Alg	47	5,22	0,233 \pm 0,033	0,49 \pm 0,110	0,454
BALEM10_Soj	42	4,67	0,345 \pm 0,043	0,553 \pm 0,070	0,485
MSCS10_Soj	32	3,56	0,313 \pm 0,039	0,452 \pm 0,087	0,389
Média		4,17	0,304	0,438	0,389

A distribuição das frequências alélicas para cada loco microssatélite estão apresentadas na Tabela 4 e Figuras 4, 5 e 6. Foi verificada uma alta variabilidade intrapopulacional, demonstrada pela diversificação de alelos encontrados nos locos polimórficos, e baixa variabilidade interpopulacional, visto que as populações apresentam os mesmos alelos na maioria dos locos

(Tabela 4). Todas as populações possuem um alelo em comum em todos os locos, que se mantém presente em frequências altas e semelhantes independente do ano de coleta. Os outros alelos encontrados nos nove locos apresentaram um padrão de frequência muito diferente entre as populações. Os locos 04, 05, 10 e 12 apresentaram populações com 100% de homozigotos (Tabela 4 e Figuras 4, 5 e 6), ou seja, os alelos encontrados em cada um desses locos está fixado na população. A população MSCS08_Alg apresentou o alelo 128 fixado no loco 04, e este alelo não ocorreu nas outras populações coletadas no mesmo ano.

As populações coletadas na Bahia, (BALEM08_Alg, BALEM09_Alg, BARN09_Alg, BALEM10_Alg e BALEM10_Soj) apresentaram mudanças no padrão alélico nos três anos de coleta, seja pelo ganho, perda ou por mudanças nas frequências dos alelos (Figura 7, Tabela 4). Estas variações tornam-se mais evidentes quando apenas as populações coletadas em algodão na cidade de Luiz Eduardo Magalhães são observadas (Figura 7, Tabela 4). Para essas populações, ocorre um aumento na quantidade de alelos encontrados ao longo dos três anos de coleta: BALEM08_Alg (30); BALEM09_Alg (33) e BALEM10_Alg (47). Como consequência, os alelos que se encontravam em maior frequência em cada loco tiveram suas frequências reduzidas. Em 2010, a população da BALEM10_Soj apresentou alelos mais frequentes no loco 04 que não estão presentes nas outras populações. Além disso, a população de soja coletada em 2010 possui os alelos 160 (loco 02), 172 (loco 04) e 100 (loco 07) que não aparecem nas outras populações de nenhum outro ano, com exceção da única outra população coletada em soja no Mato Grosso do Sul (MSCS10_Soj).

Dos 127 alelos encontrados nas doze populações, 49 são alelos privados, o que representa 38% do número total de alelos encontrados (Tabela 4). Pode-se notar que apesar da grande quantidade de alelos privados, estes estão na maioria das vezes em uma baixa frequência, com exceção do alelo 122 do loco 04 (Tabela 4). Os locos 02 e 11 foram os que apresentaram os menores números de alelos privados (um e dois, respectivamente); em contraposição, os locos 04 e 12 possuem as maiores quantidades de alelos (10 e 8, respectivamente). Estes dois locos são responsáveis por 36% do total de alelos privados encontrados. Os alelos privados estão distribuídos de maneira desigual nas populações. BALEM08_Alg, MTSIN08_Alg e MSCS08_Alg, que apresentaram apenas um alelo privado, enquanto GORV08_Alg foi à população que mais apresentou alelos privados (8). Dos sete alelos privados pertencentes à BALEM10_Alg cinco encontram-se no loco 04 (Tabela 4).

A média de H_O para os nove locos foi 0,303, variando de 0,125 (loco 05) a 0,538 (loco 02). A média da H_E foi de 0,438, variando de 0,225 (loco 10) a 0,721 (loco 02) e o PIC por loco apresentou média de 0,388 (Tabela 2). A média do conteúdo de informação polimórfica nas populações de *H. virescens* foi de 0,389 (Tabela 3). Valores de PIC mais próximos de 1 indicam uma alta variabilidade genética nas populações; valores próximos de zero indicam baixa variabilidade genética dentro das populações. Assim, a média encontrada para o PIC indica que as populações de *H. virescens* estudadas apresentaram variabilidade genética intrapopulacional relativamente alta.

Tabela 4 - Frequências alélicas e alelos privados nos doze locos microssatélite para as populações de *H. virescens* (continua)

Loco 01	Populações											
	BALEM 08_Alg	GOPG 08_Alg	MTSIN 08_Alg	MSCS 08_Alg	BALEM 09_Alg	BARN 09_Alg	GORV 09_Alg	MTPL 09_Alg	MTSA P09_Alg	BALEM 10_Alg	BALEM 10_Soj	MSCS 10_Soj
104	-	-	-	-	0,028	-	-	-	-	0,053	0,067	0,231
114	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,077
123	-	-	0,071	-	0,028	-	-	-	-	-	-	-
129	-	0,042	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
132	-	-	0,071	-	-	-	-	-	-	-	-	-
134	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,077
148	-	-	-	-	0,083	-	-	-	0,028	0,026	-	-
155	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,026	-	0,038
159	-	0,042	-	-	-	0,050	-	-	-	0,026	-	-
162	0,038	0,083	0,143	0,077	-	0,100	0,238	0,083	0,139	0,342	0,267	0,077
165	-	-	0,071	0,077	-	-	-	0,083	0,083	0,105	-	0,077
168	0,808	0,708	0,429	0,692	0,833	0,825	0,643	0,583	0,611	0,237	0,567	0,346
171	0,154	0,125	0,143	0,154	-	0,025	0,048	0,083	0,139	0,105	0,067	0,077
174	-	-	0,071	-	0,028	-	0,071	0,167	-	0,079	0,033	-
Loco 02	BALEM 08_Alg	GOPG 08_Alg	MTSIN 08_Alg	MSCS 08_Alg	BALEM 09_Alg	BARN 09_Alg	GORV 09_Alg	MTPL 09_Alg	MTSAP 09_Alg	BALEM 10_Alg	BALEM 10_Soj	MSCS 10_Soj
129	0,036	0,107	0,063	0,029	0,083	0,038	0,071	0,091	-	-	-	-
132	-	0,036	-	-	-	-	-	-	-	0,038	-	0,059
135	-	-	-	-	-	-	0,024	0,045	-	-	-	-
136	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,033	-
144	0,036	0,036	0,125	0,088	-	0,019	0,071	-	0,167	-	0,033	-
148	0,107	-	-	0,029	-	0,038	0,024	0,045	0,028	0,154	0,067	-
150	-	-	0,125	-	-	0,019	0,024	-	-	-	-	-
152	0,536	0,286	0,563	0,559	0,167	0,538	0,571	0,500	0,333	0,308	0,200	0,176
154	-	-	-	-	0,042	-	-	-	0,028	-	-	-
156	-	0,036	-	-	0,042	-	0,024	0,091	-	0,192	0,333	0,412
158	0,107	0,214	0,125	0,118	-	0,288	0,143	0,136	0,111	0,192	0,100	0,088
160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,033	0,059
162	0,107	-	-	0,118	0,667	0,038	-	0,091	0,194	0,077	0,167	0,206
164	-	-	-	-	-	-	-	-	0,056	0,038	0,033	-
168	0,071	0,286	-	0,059	-	0,019	0,048	-	0,083	-	-	-

Tabela 4 - Frequências alélicas e alelos privados nos doze locos microsatélite para as populações de *H. virescens*

(continuação)

Loco 03												
Alelos	BALEM 08_Alg	GOPG 08_Alg	MTSIN 08_Alg	MSCS 08_Alg	BALEM 09_Alg	BARN 09_Alg	GORV 09_Alg	MTPL 09_Alg	MTSAP 09_Alg	BALEM 10_Alg	BALEM 10_Soj	MSCS 10_Soj
120	-	-	-	-	-	0,022	-	-	-	-	-	-
126	-	0,036	-	-	0,056	-	-	-	0,028	-	-	-
128	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,071	0,167	0,132
132	-	-	-	-	0,028	-	-	-	0,028	-	-	0,026
134	0,667	0,321	0,429	0,972	0,917	0,935	0,167	0,667	0,944	0,905	0,833	0,842
138	-	-	-	-	-	-	0,024	-	-	0,024	-	-
141	-	-	-	-	-	-	0,024	-	-	-	-	-
159	-	-	-	-	-	-	0,024	-	-	-	-	-
162	0,067	-	-	-	-	-	0,048	-	-	-	-	-
165	-	0,071	-	-	-	-	0,048	-	-	-	-	-
168	-	0,143	-	0,028	-	-	0,333	-	-	-	-	-
171	0,267	0,357	0,429	-	-	0,043	0,214	0,250	-	-	-	-
174	-	0,071	0,143	-	-	-	0,048	-	-	-	-	-
177	-	-	-	-	-	-	0,071	-	-	-	-	-
180	-	-	-	-	-	-	-	0,083	-	-	-	-
Loco 04												
Alelos	BALEM 08_Alg	GOPG 08_Alg	MTSIN 08_Alg	MSCS 08_Alg	BALEM 09_Alg	BARN 09_Alg	GORV 09_Alg	MTPL 09_Alg	MTSAP 09_Alg	BALEM 10_Alg	BALEM 10_Soj	MSCS 10_Soj
104	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,045	-	-
108	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,045	-	-
122	-	-	-	-	-	-	-	-	0,333	-	-	-
128	-	0,038	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
134	1,000	0,808	1,000	-	-	0,923	0,842	0,900	0,333	-	-	-
136	-	0,077	-	-	-	0,038	-	-	-	-	-	-
158	-	-	-	-	-	-	0,026	-	-	0,045	-	-
162	-	-	-	-	-	-	-	0,100	-	-	-	-
166	-	-	-	-	-	-	0,053	-	-	0,091	0,250	-
168	-	-	-	1,000	-	0,019	0,053	-	-	0,409	-	0,700
170	-	0,077	-	-	-	0,019	-	-	0,333	0,091	-	-
172	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,375	0,100
174	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,136	-	-
176	-	-	-	-	-	-	0,026	-	-	-	0,250	0,100
178	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,100
181	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,125	-
195	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,045	-	-
245	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,091	-	-

Tabela 4 – Frequências alélicas e alelos privados nos doze locos microssatélite para as populações de *H. virescens*

(conclusão)

Loco 11												
Alelos	BALEM	GOPG	MTSIN	MSCS	BALEM	BARN	GORV	MTPL	MTSAP	BALEM	BALEM	MSCS
	08_Alg	08_Alg	08_Alg	08_Alg	09_Alg	09_Alg	09_Alg	09_Alg	09_Alg	10_Alg	10_Soj	10_Soj
108	0,067	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,071	-
112	0,267	0,036	0,250	-	0,028	0,019	0,071	0,083	-	0,079	0,036	-
114	0,333	0,679	0,188	0,444	0,361	0,462	0,500	0,583	0,556	0,211	0,250	0,389
116	0,333	0,143	0,563	0,472	0,278	0,481	0,310	0,333	0,306	0,474	0,464	0,556
120	-	0,071	-	-	-	-	-	-	0,056	0,184	0,107	0,056
123	-	-	-	-	-	0,019	-	-	-	-	-	-
125	-	-	-	0,028	-	-	-	-	-	0,053	0,071	-
132	-	0,071	-	-	-	-	0,048	-	-	-	-	-
141	-	-	-	0,028	0,194	0,019	-	-	-	-	-	-
165	-	-	-	0,028	0,056	-	0,071	-	0,028	-	-	-
168	-	-	-	-	0,028	-	-	-	0,056	-	-	-
189	-	-	-	-	0,056	-	-	-	-	-	-	-
Loco 12												
Alelos	BALEM	GOPG	MTSIN	MSCS	BALEM	BARN	GORV	MTPL	MTSAP	BALEM	BALEM	MSCS
	08_Alg	08_Alg	08_Alg	08_Alg	09_Alg	09_Alg	09_Alg	09_Alg	09_Alg	10_Alg	10_Soj	10_Soj
102	-	-	-	-	-	0,019	-	-	-	-	-	-
108	-	0,036	-	0,111	0,167	-	-	-	-	-	-	-
114	-	-	-	0,083	0,278	-	-	0,125	-	0,024	-	-
117	-	-	-	-	-	-	0,024	-	0,029	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	0,024	-	-	-	-	-
135	-	-	-	-	-	-	0,143	-	-	-	-	-
138	0,133	-	0,188	0,111	0,083	0,019	-	0,125	0,118	0,048	0,233	-
141	0,867	0,893	0,813	0,667	0,472	0,942	0,762	0,667	0,853	0,929	0,767	1,000
144	-	-	-	-	-	0,019	-	-	-	-	-	-
148	-	-	-	-	-	-	0,024	-	-	-	-	-
150	-	0,036	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
171	-	-	-	-	-	-	0,024	-	-	-	-	-
176	-	-	-	0,028	-	-	-	-	-	-	-	-
202	-	0,036	-	-	-	-	-	0,083	-	-	-	-

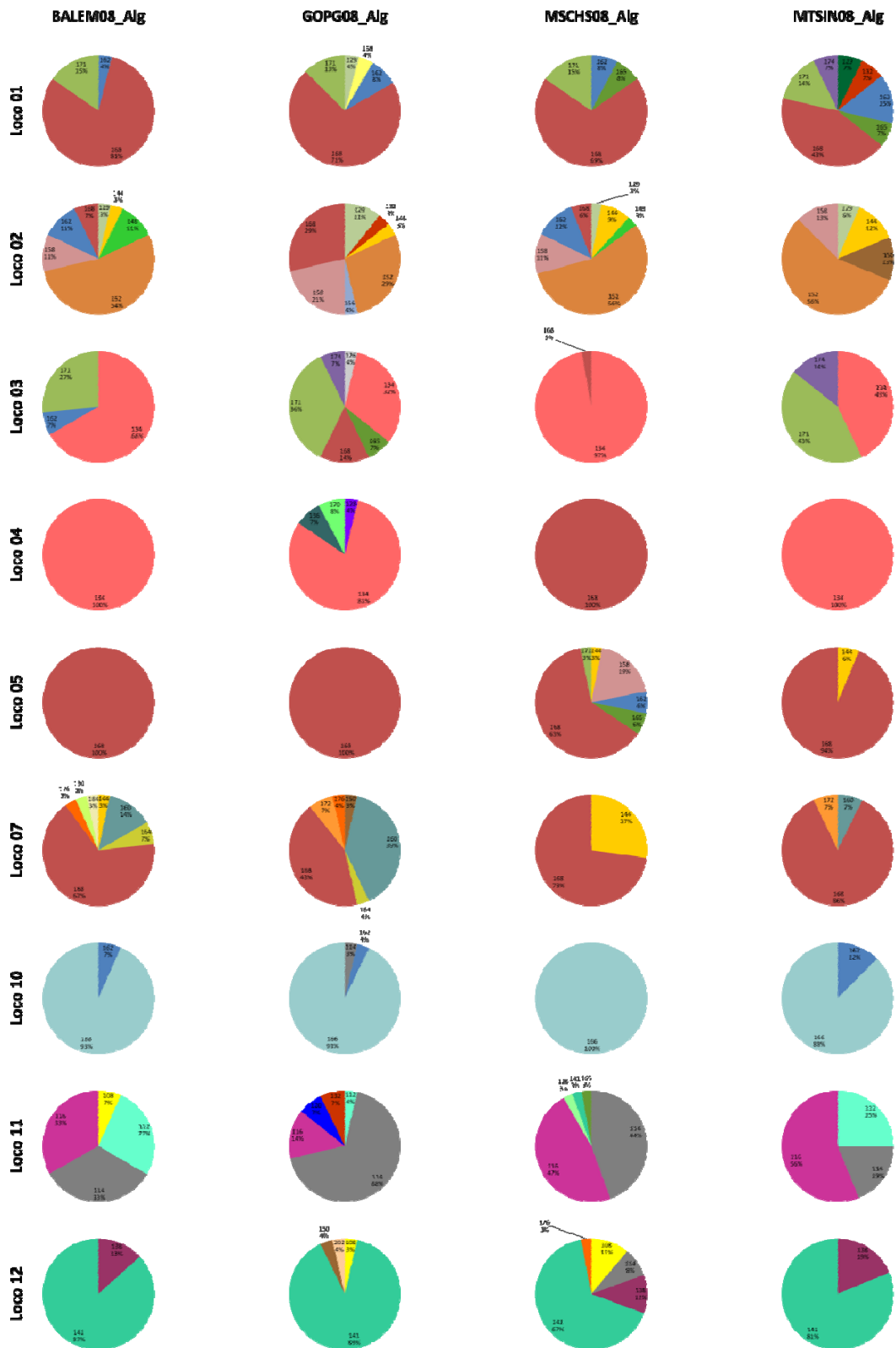


Figura 4 – Frequência alélica nos doze locos para as populações de *H. virescens* coletadas em 2008

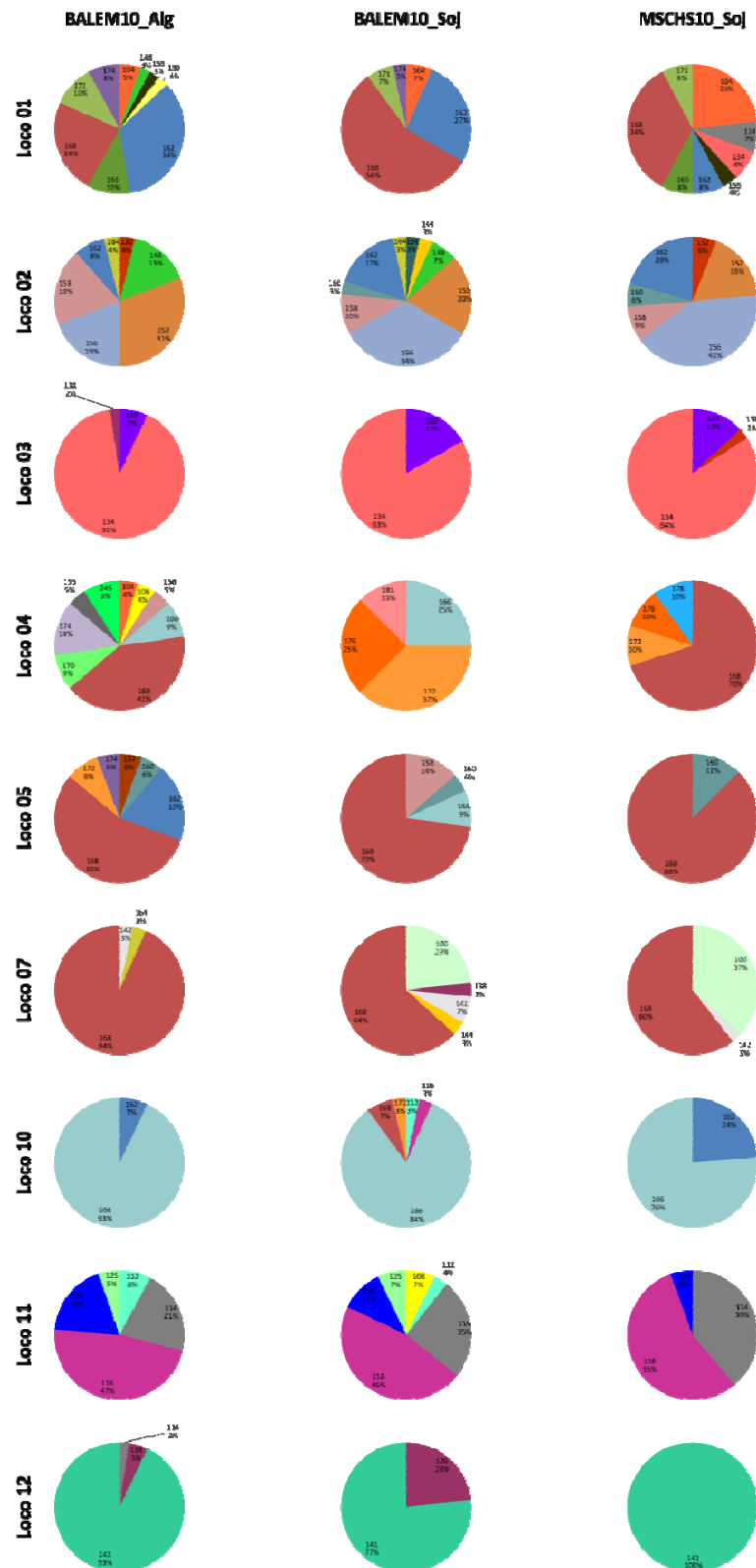


Figura 6 – Frequência alélica nos doze locos para as populações de *H. virescens* coletadas em 2010

O teste Exato de Fisher foi significativo ($p < 0,001$) para todas as populações em pelo menos um dos locos estudado (Tabela 5). A população MTPL09_Alg foi a que apresentou o menor número de locos com desvio do EHW (locos 03 e 10), enquanto que a população BARN09_Alg foi a que apresentou maior quantidade de locos fora do equilíbrio de EHW (locos 01, 03, 04 e 07) (Tabela 5). O loco 01 foi o loco com maior número de populações com desvio do EHW (Tabela 5). Nenhum desequilíbrio de ligação entre os locos foi detectado.

Foram detectados gargalos genéticos em todos os anos de coleta. As populações GO08PG_Alg, MSCS08_Alg, BALEM09_Alg, BARN09_Alg, GO09RV_Alg e BALEM10_Alg exibiram valores significativos de $p \leq 0,05$.

Tabela 5 – Probabilidade para aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) de acordo com o Teste Exato de Fisher. Em negrito: locos que não se ajustam as proporções do Equilíbrio de Hardy – Weinberg, com grau de significância $\alpha = 0,001$. * = loco monomórfico

População	loco 01	loco 02	loco 03	loco 04	loco 05	loco 07	loco 10	loco 11	loco 12
BALEM08_Alg	0,517	0,040	0,000	*	*	0,001	0,782	0,001	0,551
GOPG08_Alg	0,861	0,152	0,000	0,039	*	0,995	0,994	0,074	1,000
MTSIN08_Alg	0,288	0,400	0,003	*	0,850	0,003	0,686	0,442	0,514
MSCS08_Alg	0,000	0,884	0,904	*	0,000	0,214	*	0,942	0,003
BALEM09_Alg	1,000	0,032	0,985	*	0,878	0,904	0,001	0,074	0,043
BARN09_Alg	0,000	0,077	0,000	0,000	0,920	0,000	0,671	0,859	1,000
GORV09_Alg	0,119	0,130	0,023	0,000	0,020	0,000	0,630	0,116	0,000
MTPL09_Alg	0,053	0,145	0,000	0,002	0,007	0,056	0,001	0,944	0,809
MTSAP09_Alg	0,234	0,036	0,996	0,112	0,000	0,000	0,003	0,921	0,918
BALEM10_Alg	0,000	0,006	0,972	0,360	0,000	0,994	0,724	0,000	0,989
BALEM10_Soj	0,000	0,966	0,278	0,207	0,019	0,343	0,124	0,000	0,239
MSCS10_Soj	0,000	0,283	0,881	0,120	0,621	0,536	0,176	0,000	*

2.4.2 Diversidade genética interpopulacional

O coeficiente de endogamia da espécie *f* foi de 0,294. Esse valor de *f* demonstra haver certo grau de endogamia intrapopulacional, ou seja, ocorre acasalamento entre indivíduos aparentados. Os valores de θ e *F* estimados foram respectivamente 0,132 e 0,387. Estes valores são significativamente diferentes de zero (Tabela 6). A estimativa de estrutura genética a partir do parâmetro R_{ST} (SLATKIN, 1995) foi de 0,252. O parâmetro $N_e m$ foi calculado com base nas estimativas de θ e R_{ST} , e resultou nos respectivos valores de 1,643 e 0,743 indivíduos adultos migrantes por geração. O valor de $N_e m$ baseado no estimador R_{ST} não é considerado suficiente para manter a similaridade genética entre as populações (WRIGHT, 1931). Em contrapartida, o $N_e m$ baseado no estimador θ foi considerado suficiente para manter essa similaridade. No entanto, o valor de θ pode ser considerado um valor relativamente alto, demonstrando haver estruturação populacional moderada. Separando as populações por ano de coleta, conforme Tabela 6, foram estimados os índices *f*, θ , *F* e R_{ST} com os nove locos microssatélites. Apesar das populações coletadas nos diferentes anos não serem as mesmas, o índice de divergência genética foi considerado moderado para os três anos (Tabela 6).

Os valores da estimativa θ par-a-par variaram de 0,003 a 0,2639 (Tabela 7), com predominância de valores superiores a 0,1. Populações separadas por mais de 1300 Km de distância, como BALEM09_Alg e MTSAP09_Alg, apresentam uma distância genética de 0,0772 enquanto que populações separadas por apenas 103 km de distância (BALEM09_Alg e BARN09_Alg) apresentaram um índice de divergência genética elevado (0,2046) (Tabela 7).

Tabela 6 – Estimativa dos índices de estruturação baseados em Weir; Cockerham (1984) (f , F , θ) e Slatkin (1995) (R_{ST}) e número de migrantes por geração (N_{em}) em doze populações naturais de *H. virescens* individualizados por ano de coleta e com todas as populações agrupadas. Intervalo de confiança (IC) de 95% de probabilidade

2008						
	f	F	θ	R_{ST}	N_{em}^a	N_{em}^b
Estimativa	0,324	0,388	0,093	0,318	2,438	0,536
Limite superior (IC 95%)	0,517	0,584	0,163			
Limite inferior (IC 95%)	0,163	0,23	0,042			
2009						
	f	F	θ	R_{ST}	N_{em}^a	N_{em}^b
Estimativa	0,206	0,298	0,115	0,393	1,923	0,387
Limite superior (IC 95%)	0,341	0,441	0,181			
Limite inferior (IC 95%)	0,109	0,196	0,057			
2010						
	f	F	θ	R_{ST}	N_{em}^a	N_{em}^b
Estimativa	0,414	0,44	0,045	0,089	5,305	2,571
Limite superior (IC 95%)	0,547	0,561	0,082			
Limite inferior (IC 95%)	0,218	0,26	0,012			
Todos os anos						
	f	F	θ	R_{ST}	N_{em}^a	N_{em}^b
Estimativa	0,294	0,387	0,132	0,252	1,643	0,743
Limite superior (IC 95%)	0,406	0,512	0,218			
Limite inferior (IC 95%)	0,178	0,273	0,072			

^a Número de migrantes calculado com base da estimativa de θ

^b Número de migrantes calculado com base da estimativa de R_{ST} .

Tabela 7 – Matriz das distâncias genéticas (θ) (WEIR; COCKERHAM, 1984) par a par linearizada entre as doze populações de *H. virescens*

	GORV09	GOPG08	BARN09	BALEM08	MTPL09	MTSIN08	BALEM09	MTSAP09	MSCS08	BALEM10	MSCS10
	Alg	Alg	Alg	Alg	Alg	Alg	Alg	Alg	Alg	Soj	Soj
GOPG08_Alg	0,0214										
BARN09_Alg	0,1071	0,0969									
BALEM08_Alg	0,0469	0,0543	0,0429								
MTPL09_Alg	0,0324	0,0160	0,0362	0,0147							
MTSIN08_Alg	0,0288	0,0800	0,1246	0,0030	0,0313						
BALEM09_Alg	0,1942	0,2184	0,2046	0,1372	0,1449	0,1831					
MTSAP09_Alg	0,1475	0,1526	0,1652	0,1414	0,1142	0,1485	0,0772				
MSCS08_Alg	0,1136	0,1462	0,0808	0,0510	0,0564	0,0858	0,0939	0,0194			
BALEM10_Soj	0,1712	0,1851	0,2123	0,1815	0,1374	0,1657	0,0956	0,0516	0,0423		
MSCS10_Soj	0,2274	0,2373	0,2639	0,2540	0,1943	0,2336	0,1675	0,1359	0,1115	0,0570	
BALEM10_Alg	0,1965	0,2237	0,2369	0,2078	0,1733	0,1667	0,1567	0,0668	0,0700	0,0438	0,0518

Não houve correlação significativa entre as distâncias genéticas e geográficas estimada por meio do teste de Mantel ($r^2 = 0,0135$, $p = 0,139$) (Figura 8).

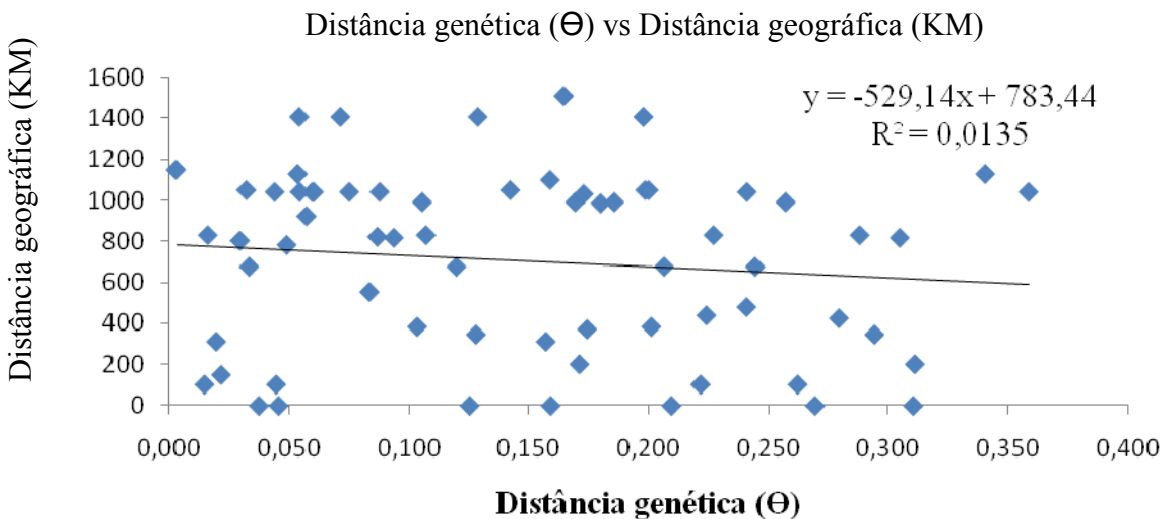


Figura 8 – Correlação entre as distâncias genéticas e geográficas inferida pela análise de isolamento por distância (MANTEL, 1967)

Os resultados da taxa de migrantes entre as populações coletadas no mesmo ano indicam que, de maneira geral, ocorre uma baixa taxa de migração entre regiões do mesmo estado. As taxas de migração para as populações estudadas possuem um padrão de rota no sentido Centro-Oeste - Nordeste e as taxas entre culturas (algodão e soja), ocorre no sentido soja-algodão (Tabela 8). Nas populações coletadas em 2008, verificou-se que BALEM08_Alg e MSCS08_Alg pouco contribuem com a taxa de migração, já que aproximadamente 97% dos indivíduos dessas regiões são considerados residentes. Esse valor pode ser considerado significativo, pois para o cálculo do número de residentes o valor de significância estimado foi 83,3%, enquanto para o cálculo dos indivíduos migrantes esse valor foi 1,5%; assim, valores acima desses podem ser considerados estatisticamente significados. As populações de GOPG08_Alg e MTSIN08_Alg foram as que apresentaram as maiores taxas de migração para a região de BALEM08_Alg (28,13% e 25,63%, respectivamente). As taxas de migração estimadas entre BALEM09_Alg e BARN09_Alg, duas populações separadas por aproximadamente 100 Km de distância, foi menor do que 1%. A população de GORV09_Alg foi a que apresentou menor taxa de indivíduos residentes, 68,16%, e a taxa de migração total dessa população foi de 31,92%, sendo que 20,42% migram para a região de MTPL09_Alg e apenas 0,79% para MTSAP09_Alg (Tabela 8). A

população MTPL09_Alg apresentou uma alta taxa de migração para a população BARN09_Alg e baixa para BALEM09_Alg, enquanto a população de MTSAP09_Alg demonstrou o oposto. No entanto, em ambas as populações de Mato Grosso a maioria dos indivíduos são residentes (Tabela 8). Essa alta taxa de indivíduos residentes foi evidenciada em todas as populações nas três safras, com valores superiores a 65%, com destaque para as populações da Bahia (> 95%). Para a safra de 2010, quando foram analisadas populações coletadas em algodão e soja, fica evidenciado que as populações coletadas em soja contribuem para a colonização de *H. virescens* no algodão. Também foi possível verificar que a rota de migração entre as populações coletadas em soja apresentou maior intensidade no sentido BALEM10_Soj para MSCS10_Soja (Tabela 8).

Tabela 8 – Porcentagem de migrantes das populações de *H. virescens* coletadas nas safras de 2007/2008, 2008/2009 e 2009/2010. Em negrito, valores significativos para taxas de indivíduos residentes e migrantes (acima de 83,3% e 1,5%, respectivamente)

2008					
	BALEM08_Alg	GOPG08_Alg	MTSIN08_Alg	MSCS08_Alg	
BALEM08_Alg	97,99%	0,66%	0,66%	0,69%	
GOPG08_Alg	28,13%	68,79%	1,41%	1,67%	
MTSIN08_Alg	25,63%	2,10%	69,95%	2,32%	
MSCS08_Alg	1,24%	0,64%	0,64%	97,49%	
2009					
	BALEM09_Alg	BARN09_Alg	GORV09_Alg	MTPL09_Alg	MTSAP09_Alg
BALEM09_Alg	98,08%	0,57%	0,44%	0,46%	0,44%
BARN09_Alg	0,41%	98,26%	0,36%	0,64%	0,34%
GORV09_Alg	0,83%	9,88%	68,12 %	20,42%	0,79%
MTPL09_Alg	1,46%	17,43%	1,26%	78,55%	1,30%
MTSAP09_Alg	23,42%	6,15%	1,01%	1,06%	68,35%
2010					
	BALEM10_Alg	BALEM10_Soj	MSCS10_Soj		
BALEM10_Alg	97,28%	0,92%	1,81%		
BALEM10_Soj	16,60%	69,03%	14,37%		
MSCS10_Soj	13,39%	1,28%	85,33%		

Nota: A taxa de migrantes com a qual cada população contribui está no sentido linha-coluna. Os valores nas células da população com ela mesma são de indivíduos residentes.

A Análise de Coordenadas Principais (PCA) para as 12 populações de *H. virescens* revelou dois agrupamentos separados pelos componentes X (que explica 54,03% da variação) e Y (que explica 16,38%) (Figura 9). Contudo, não foi possível identificar um padrão de agrupamento

por região, safra ou hospedeiro dentro e entre os agrupamentos 1 e 2 (Figura 9). O agrupamento 1 mostra que populações coletadas em diferentes culturas (BALEM10_Alg e MSCS10_Soj) foram mais semelhantes entre si do que populações coletadas na mesma planta hospedeira. Neste mesmo agrupamento verificou-se que não ocorre a formação de grupos por região geográfica, uma vez que o grupo é formado por populações de três dos quatro estados de coleta. Para o agrupamento 2 verificou-se que o ano da safra não influencia no agrupamento, visto que populações coletadas com aproximadamente um ano de diferença (GOPG08_Alg e GORV09_Alg) foram mais semelhantes do que populações coletadas no mesmo ano. Em relação ao agrupamento por região geográfica, as populações amostradas no mesmo estado encontram-se mais próximas entre elas. Porém, estas regiões ainda são muito similares às populações que compreendem o mesmo agrupamento, visto que a coordenada Y só explica 16,38% da variação existente.

A mesma análise de PCA baseada na presença ou ausência de alelos para todos os indivíduos das 12 populações de *H. virescens* (Figura 10), mostraram que dentro de cada agrupamento não existe estruturação genética significativa entre as populações. A alta dispersão dos indivíduos dentro dos grupos indica que independente da região, safra ou cultura, estes possuem um padrão alélico semelhante. Quando se observa a relação entre os agrupamentos 1 e 2, a estruturação é baixa, evidenciado pelos baixos valores dos componentes X e Y e pela alta dispersão dos indivíduos entres os agrupamentos (Figura10).

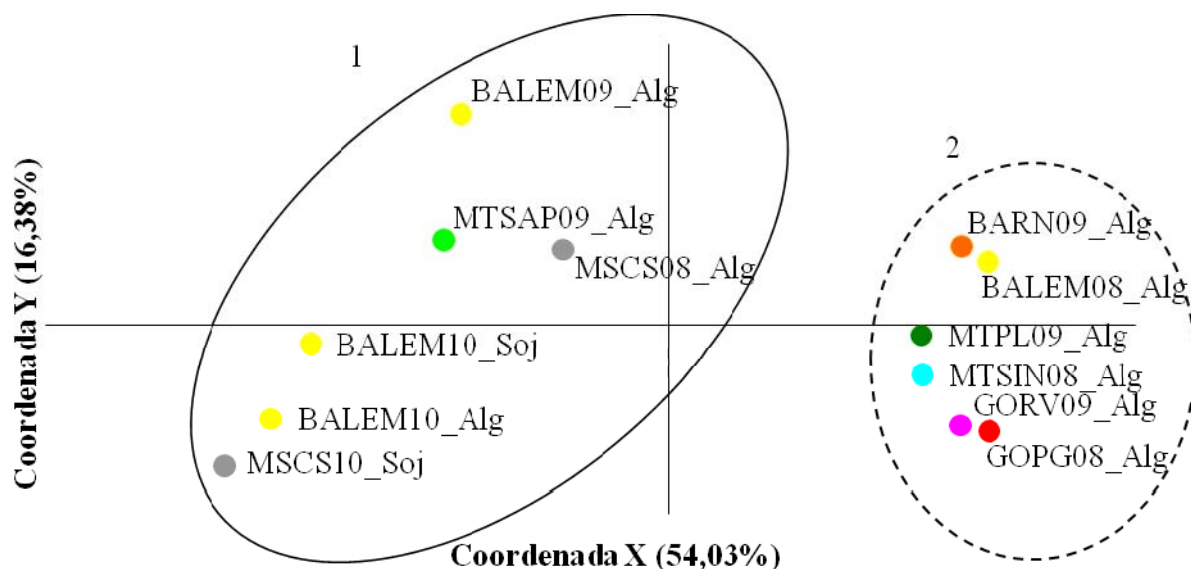


Figura 9 – Análise de Coordenadas Principais (PCA) das populações de *H. virescens* baseada nos valores de distância θ (WEIR; COCKERHAM, 1984) par a par

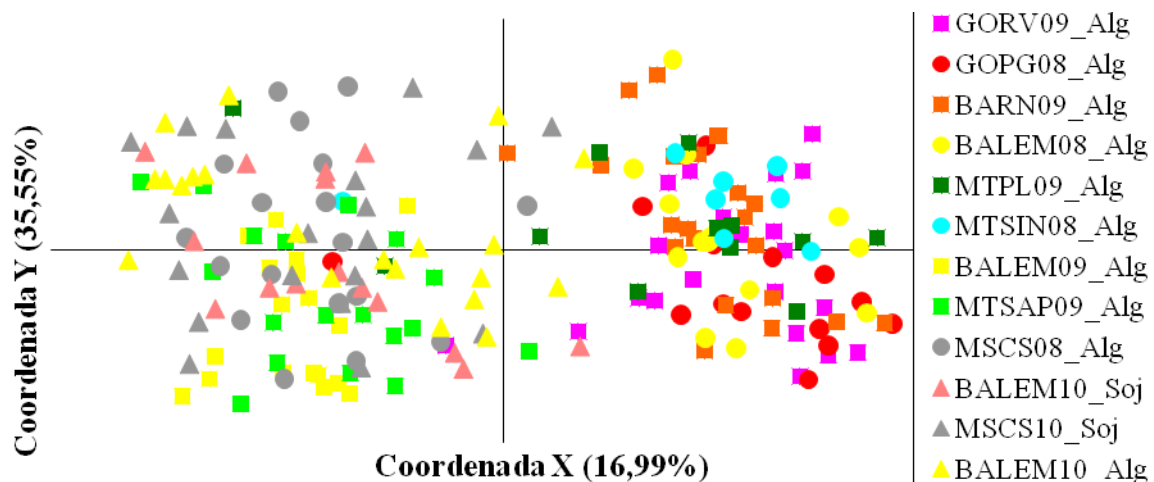


Figura 10 – Análise de Coordenadas Principais (PCA) baseada na presença ou ausência de alelos de nove locos polimórficos. As cores e formas representam os indivíduos de *H. virescens* coletados nas suas respectivas localidades

A análise de atribuição usando inferência Bayesiana identificou um valor de $\Delta K = 2$. Os grupos formados são muito semelhantes aos recuperados pela análise de PCA, demonstrando que apesar da formação de dois grupos, estes não apresentam estruturação por região geográfica, safra

ou hospedeiro de coleta (Figura 11). A estrutura da análise Bayesiana resultou na identificação de dois conjuntos de genes de origem (populações com predominância na coloração vermelha *versus* populações com predominância na cor verde). Entretanto, esta separação apresenta indício de fluxo gênico em ambos os sentidos, ou seja, as populações de *H. virescens* alocadas nos seus respectivos grupos possuem indivíduos com um pool gênico semelhante ao outro grupo. O diagrama mostra claramente esta mistura de alelos nas populações BALEM09_Alg, MTSAP09_Alg e MSCS08_Alg. Também foi observado que as populações coletadas em soja e algodão na mesma safra (BALEM 10_Soj, MSCS10_Soj e BALEM10_Alg) apresentam um “pool” gênico muito semelhante (Figura 11), indicando que *H. virescens* não possui estrutura genética ligada ao hospedeiro.

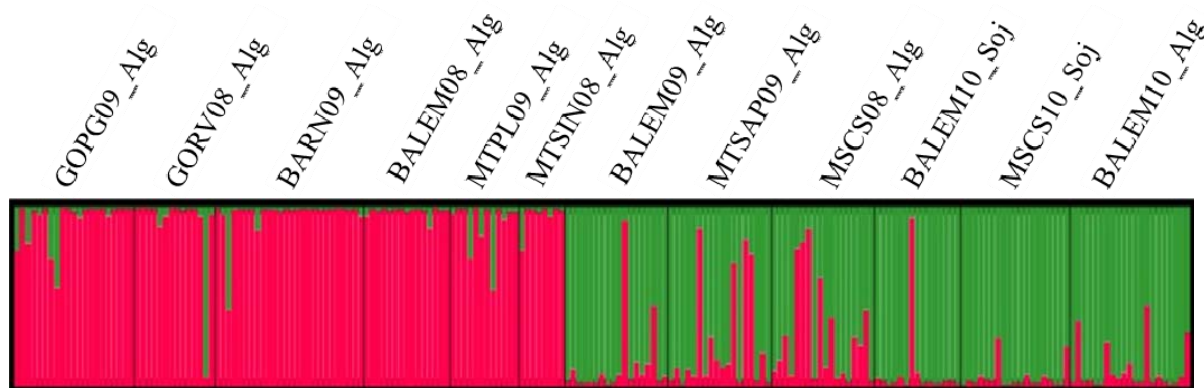


Figura 11 – Análise de atribuição usando inferência Bayesiana implementada no programa STRUCTURE das populações de *H. virescens*. $\Delta K = 2$, número que melhor representa o conjunto de dados. Cada um dos 205 indivíduos é representado por uma linha vertical fina que é dividida em segmentos cujo tamanho e cor (vermelho ou verde) corresponde à proporção relativa do genoma de cada indivíduo a um determinado agrupamento. As populações são separadas por linha pretas e finas

3 DISCUSSÃO

A diversidade genética das populações de *H. virescens* do Brasil foi avaliada por meio do número de alelos por loco, das medidas de heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada (H_E) e do conteúdo de informação polimórfica (PIC). Foram encontrados 127 alelos distribuídos nos nove locos, com média de 4,17 alelos por loco por população (Tabela 3). Adicionalmente, foi verificada a presença de um alto número de alelos privados (49) (Tabela 4), os quais contribuem para a diversidade e estruturação genética. A ocorrência de alelos privados em populações naturais pode ser resultado da retenção de polimorfismo ancestral, da ocorrência de mutação ou meramente uma questão amostral. Seoane, Kageyama e Sebben (2000) discutem que a presença de alelos privados em algumas populações é indicativo de fluxo gênico restrito, o que pode levar a um aumento da divergência genética entre as populações. De fato, a ausência de fluxo gênico recente (discutido em mais detalhes abaixo) pode ser responsável pelo elevado número de alelos privados nas populações de *H. virescens* estudadas.

Os resultados de H_O , H_E e PIC (respectivamente 0,304, 0,438 e 0,389 – Tabelas 2 e 3) indicam uma alta diversidade genética dentro das populações de *H. virescens* estudadas. A alta diversidade genética encontrada dentro das populações indica a possibilidade de ocorrerem novas combinações genotípicas, mantendo o potencial evolutivo e a capacidade de adaptação da espécie a possíveis mudanças ambientais ou agrícolas (FUTUYMA, 1992).

Estudos com outros marcadores para lepidópteros de interesse econômico demonstram que em muitos casos a variabilidade genética dentro das populações é alta e entre as populações é baixa. Baixa variabilidade entre as populações de *H. virescens* também foi encontrada por Albernaz (2011) com o uso de sequências de DNA mitocondrial. Nesse estudo foi identificado que 2% de variação encontra-se entre as populações de *H. virescens* no Brasil, enquanto que 98% está dentro das populações. Martinelli et al. (2006), estudando a variabilidade genética de dez populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas em milho e algodão e baseando-se na técnica de RAPD, encontraram que 15% da variabilidade molecular estava localizada entre os grupos, enquanto que 85% estava dentro das populações. Outro resultado semelhante foi encontrado por Pavinato (2010), que utilizando marcadores microssatélites pode observar que dos 71 alelos encontrados em *Alabama argillacea*, 90% eram compartilhados entre as onze populações estudadas, demonstrando uma baixa diversidade genética entre as populações. Adicionalmente, os resultados de H_O , H_E e PIC obtidos com os locos de marcadores microssatélites aplicados

nesse estudo foram similares aos obtidos por Perera et al. (submetido) (respectivamente 0,301, 0,421 e 0,446), que caracterizaram 15 locos microssatélites para *H. virescens* para uma população coletada na região de Stoneville, USA. Os 15 locos descritos por aqueles autores foram considerados polimórficos, e destes, nove foram utilizados no presente trabalho. Com base nos resultados apresentados nas tabelas 2 e 3, consideramos que todos os locos microssatélites analisados neste estudo foram polimórficos para as 12 populações de *H. virescens* no Brasil.

As medidas de heterozigosidades são muito influenciadas pelo sistema reprodutivo da espécie, e quanto maior as diferenças entre H_O e H_E na população, maior será o valor de f estimado. Havendo então uma grande diferença entre H_O em relação à H_E , essa pode estar relacionada à endogamia. Segundo Hartl (2008) diferenças significativas entre H_O e H_E podem ser influenciadas por eventos que alteram a frequência dos genótipos homozigotos em relação à frequência dos genótipos heterozigotos. Deste modo, o valor de f estimado (0,294 nesse estudo) também aumenta. A diferença encontrada entre H_O e H_E sugere um pequeno efeito de endogamia, possivelmente ocasionado por acasalamento entre parentes dentro das populações amostradas ou ainda porque os indivíduos amostrados descendem de um mesmo ancestral, embora possam em alguns casos ser devido a erros amostrais.

No entanto, não podemos descartar a possibilidade de a presença de alelos nulos nos locos microssatélites estarem influenciando os valores de f . Alelos nulos nos locos microssatélites é em geral resultado de mutações que podem ocorrer no local de hibridação do iniciador (CALLEN et al., 1993). Assim, a presença de alelos nulos ocasiona uma diminuição da frequência estimada de heterozigotos na população e como resultado tem-se uma superestimação dos valores de endogamia (PEMBERTON et al., 1995). Os locos 04, 05, 10 e 12 estudados aqui apresentaram populações com 100% de homozigotos, o que pode ter ocorrido devido à presença de alelos nulos nessas populações (ver Tabela 4). A frequência de alelos nulos parece ser maior em lepidópteros do que em outros insetos (JI et al., 2003), e a presença desses alelos parece ser comum em locos microssatélites, provavelmente pela alta taxa de mutação que ocorre nesse marcador. Esse fato foi verificado por Dakin e Avise (2004), os quais fizeram uma extensa revisão em trabalhos publicados (233 artigos) que relatavam a existência de alelos nulos em locos microssatélites. Embora alguns dos locos estudados aqui tenham apresentado alelos nulos para algumas populações, eles ainda contêm grande informação polimórfica e por esse motivo foram mantidos nas análises de divergência genética.

Os resultados da diversidade genética também permitiram avaliar o padrão espacial e temporal da variação genética. A grande maioria dos alelos nos nove locos estava presente em todas as populações, e estes se mantiveram em frequências altas, independentemente do ano de coleta. Adicionalmente, foi possível verificar variações nas frequências alélicas entre as diferentes safras, pelo ganho ou perda de alelos e por mudanças nas frequências dos alelos já existentes (Figuras 4, 5 e 6 e Tabela 4). Teoricamente, pequenas variações nas frequências alélicas podem ocorrer devido a efeitos de endogamia, presença de alelos nulos, dispersão e colonização (efeito de deriva genética), prática de manejos (gargalo genético) e seleção natural (BROWN, 1978; HAMRICK, 1983; LOVELESS; HAMRICK, 1984). Sendo assim, esses fatores podem alterar o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Alguns dos locos utilizados no presente trabalho acessam regiões codificantes (EST - Expressed Sequence Tag) (PERERA et al., submetido) e, deste modo, podem estar sob pressão de seleção, ocasionando desvio do EHW. De fato, aplicando-se o teste exato de Fisher (Tabela 5) constatou-se um desvio do EHW em todos os locos em pelo menos uma das populações. Todavia, quando analisamos as populações e os nove locos em conjunto, não ocorre desvio do EHW. Estudos recentes têm demonstrado que apenas uma pequena fração de genes expressos é submetida à seleção (TIFFIN; HAHN, 2002).

É importante destacar que além dos fatores intrínsecos aos marcadores microssatélites, os fatores bioecológicos da espécie em estudo podem ser responsáveis pelas mudanças das frequências alélicas e na diversidade genética dentro e entre as populações de *H. virescens*. Os cultivos de algodão e soja não são realizados o ano todo no Brasil. Sendo assim, durante o período em que essas culturas não estão no campo, pode ocorrer uma queda acentuada no número de indivíduos de suas populações devido à escassez de hospedeiros. No entanto, como *H. virescens* é uma espécie polífaga com alta capacidade de dispersão, a espécie seria capaz de manter populações reduzidas nas tigueras (restos da cultura que ficam no campo) ou em hospedeiros alternativos. Sendo assim, a variabilidade genética pode ser alterada tanto pelo efeito de deriva genética resultante do tamanho reduzido de algumas populações, bem como pela possibilidade do encontro de diferentes populações reduzidas nos hospedeiros alternativos, permitindo o acasalamento entre indivíduos antes isolados.

Alternativamente, não podemos descartar a possibilidade das práticas de manejo para o controle de pragas com uso de inseticidas, plantas geneticamente modificadas ou outra forma de controle estejam por si só alterando a variabilidade genética ao longo da safra. Essas táticas de

manejo da praga podem reduzir drasticamente a densidade populacional do inseto e determinar a ocorrência de eventos de gargalo genético, alterando as frequências dos alelos ao longo do tempo. Estes eventos de gargalos, possivelmente ocasionados pelas táticas de controle utilizadas em *H. virescens*, foram confirmados por meio do teste de Wilcoxon para algumas de nossas populações. Deste modo, quando uma população passa por um efeito de gargalo genético recente, ou seja, quando uma população sofre uma redução do seu tamanho efetivo, a diversidade alélica diminui mais rapidamente do que a heterozigosidade, e essas populações geralmente desenvolvem um excesso de heterozigosidade em locos seletivamente neutros. O excesso de heterozigosidade persiste apenas por um determinado número de gerações até que um novo equilíbrio seja estabelecido (CORNUET; LUIKART, 1996).

As estimativas de variabilidade genética encontradas entre as populações de *H. virescens* (Tabela 6), indicam haver estruturação moderada quando o valor de θ (0,132) é avaliado, e alta quando se considera o valor de R_{ST} (0,252). Seguindo como referência Hartl (2008), valores das estimativas de variabilidade interpopulacionais entre 0 e 0,05 indicariam baixa estruturação genética; valores entre 0,05 e 0,15 estruturação genética moderada, valores entre 0,15 e 0,25 estruturação alta e valores acima de 0,25 indicariam uma forte estruturação genética. O desempenho destes estimadores depende da aplicabilidade da análise e modelos subjacentes, e de como as mutações evoluem em locos microssatélites (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002). No entanto, ainda não está claro como as mutações evoluem nesses marcadores (MEIRMANS; HEDRICK, 2011). Estimativas de θ e R_{ST} são baseadas em modelos de mutações diferentes. O θ é baseado no modelo de alelos infinitos (IAM), o que pressupõe que cada mutação cria um novo alelo; o R_{ST} é baseado no modelo de mutação *stepwise* (SMM), que assume que cada mutação cria um novo alelo, quer pela inclusão ou pela exclusão de uma única unidade repetida de microssatélites (MEIRMANS; HEDRICK, 2011). Entretanto, pode acontecer que dois alelos sejam idênticos na forma, mas não por descendência, fenômeno designado de homoplasia. Nesse caso, a utilização do modelo IAM poderá provocar uma distorção na estimativa da diferenciação populacional, quando esta for estimada a partir da informação alélica, como no caso de marcadores microssatélites (HARDY et al., 2003). O θ é deflacionado pela alta taxa de mutação desses marcadores, enquanto o R_{ST} não é afetado (ANDO et al., 2010). Por outro lado, o θ reflete a estrutura genética da população de forma mais sensível do que o R_{ST} (RUZZANTE, 1998; BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002). O modelo assumido para o cálculo do R_{ST} é o mais

indicado para estimar diferenciação genética entre populações quando marcadores microsatélites perfeitos são aplicados, no entanto, ainda não está claro qual destes estimadores melhor reflete a estrutura de nossos dados (MEIRMANS; HEDRICK, 2011). Contudo, ambos demonstraram uma estruturação incipiente para as populações de *H. virescens* avaliadas.

O parâmetro N_{em} estimado com base nas estimativas de R_{ST} e θ resultou respectivamente nos valores de 0,743 e 1,643 indivíduos migrantes. Govindajaru (1989) distinguiu três níveis de fluxo gênico: alto ($N_{em} > 1$), intermediário ($0,25 < N_{em} < 0,99$) e baixo ($N_{em} < 0,25$). O valor de migrantes calculado com base no R_{ST} foi intermediário, e pode ser considerado como indício de que as populações se encontram em um processo de diferenciação com fluxo gênico muito reduzido. Entretanto, o valor estimado com base no θ foi alto e segundo a teoria de Wright (1931) um único indivíduo migrante por geração seria suficiente para evitar a fixação de um ou outro alelo. Hartl e Clark (1997) são mais conservativos e consideram que, para ocorrer a homogeneização dos alelos entre populações, é necessário um número de migrantes acima de quatro por geração. Se esse valor for considerado, os valores de N_{em} estimados aqui, independente do índice de estruturação aplicado, indicam baixo fluxo gênico entre as populações e, conseqüentemente, maior diferenciação genética entre elas.

A partir da análise da porcentagem de migrantes recentes entre pares de populações de *H. virescens* coletadas especificamente nas safras 2007/08, 2008/09 e 2009/10 (Tabela 8), foram verificadas que as populações de *H. virescens* no Brasil apresentam mais indivíduos residentes, variando de 68,12% (GORV09_Alg) a 98,26% (BALEM09_Alg), confirmando os níveis reduzidos de fluxo gênico. Essa maior residência pode estar sendo controlada pela abundância de área plantada de soja e algodão, que juntas somam aproximadamente 13 milhões de hectares nas regiões Centro-Oeste e Nordeste (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2010), bem como pela oportunidade de encontrar hospedeiros alternativos quando essas culturas não estão no campo. Se esses hospedeiros alternativos são considerados ou não nos cálculos do número de migrantes não parece afetar os resultados (BEERLI, 2004).

Também foi possível verificar que o fluxo gênico existente sugere um modelo de rota no sentido Centro-Oeste - Nordeste. Esta possível rota de migração pode estar sendo influenciada por correntes de ventos. No entanto, não há estudos formais para verificar os mecanismos de migração utilizados por *H. virescens* no Brasil, embora estudos com outras espécies de interesse econômico tenham demonstrado que mariposas podem utilizar correntes de ventos de altas

altitudes para migrarem (DRAKE; HELM, 1981; DRAKE; FARROW, 1985; CHAPMAN et al., 2002).

A época do plantio da soja e do algodão também pode estar influenciando a infestação de *H. virescens* no sentido soja – algodão. Segundo Gatehouse e Zhang (1995), insetos são geralmente migrantes facultativos que respondem às mudanças na disponibilidade e qualidade do hospedeiro e a altas densidades populacionais, ou seja, os movimentos migratórios somente ocorrem quando os benefícios da migração são superiores aos recursos encontrados no hábitat atual. No entanto, pouco se sabe sobre os reais fatores responsáveis pelos movimentos de migração em insetos. No caso de *H. virescens* no Brasil, o plantio de soja antecede ao do algodão (CONAB, 2010), permitindo que as infestações dessa praga ocorram primeiramente em soja. A partir do momento em que a soja torna-se imprópria como hospedeiro, as populações possivelmente migram para o algodão em busca de um hábitat adequado. Sendo assim, os valores de porcentagem de migração entre as populações de soja e algodão sugerem que o estabelecimento das populações do algodão pode ocorrer a partir de indivíduos migrantes da soja ou descendentes desses indivíduos (Tabela 8). No entanto, a falta de trabalhos para verificar o deslocamento de *H. virescens* no Brasil, bem como os hospedeiros alternativos que a espécie utiliza para se manter durante o período em que algodão e soja não estão disponíveis, impede que maiores inferências sejam feitas acerca desse movimento entre culturas.

Os resultados obtidos para a análise de agrupamento (Coordenadas Principais e atribuição por inferência Bayesiana) apoiam os resultados de estrutura genética. Essas análises, embora utilizem algoritmos diferentes para estimar a similaridade genética, agruparam as populações em uma estrutura muito semelhante, o que demonstra a robustez do resultado. No entanto, a alta dispersão dos indivíduos na análise de PCA (Figura 10) e o “pool” gênico (identificado pelas cores verdes e vermelhas) semelhante entre alguns indivíduos de ambos os agrupamentos (Figura 11), demonstra que esses ainda são geneticamente relacionados, sugerindo um fluxo gênico atual ou histórico. No entanto, em ambas as análises não foi possível identificar qual a variável (região geográfica, safra ou hospedeiros diferentes) está influenciando a formação desses grupos.

Os resultados obtidos nesse estudo se contrapõem àqueles encontrados em outros trabalhos. Já foram realizados inúmeros trabalhos com diferentes marcadores moleculares com populações de *H. virescens* em outros países que não o Brasil, e vários deles mostraram que as populações desse inseto são altamente relacionadas. Korman et al. (1993) encontraram que essa

espécie não apresenta estruturação genética entre as regiões do Texas, Louisiana, Mississippi, Arkansas e Geórgia ($F_{ST} = 0,002$) baseando-se em dados de aloenzimas. Esses resultados foram similares aos obtidos por Roehrdanz et al. (1994), baseados na técnica de PCR-RFLP do DNA mitocondrial. Esses autores encontraram que populações coletadas nos EUA e México não apresentam estruturação populacional. Han; Caprio (2004), em estudo realizado com marcadores aloenzimáticos, também constataram uma baixa estruturação genética em populações de *H. virescens* na região Oeste do Mississippi. No Brasil, Albernaz (2011) avaliou a estrutura genética dessa espécie por meio de sequências de DNA mitocondrial (citocromo oxidase subunidades I e II – COI e COII – e desidrogenase dinucleotídica da adenina nicotinamida – *nad6*). As populações analisadas foram praticamente as mesmas populações utilizadas no presente estudo com marcadores microssatélites. Entretanto, segundo Albernaz (2011), a análise do mtDNA resultou em baixa estruturação entre as populações analisadas ($F_{ST} = 0,012$). Os marcadores utilizados nos trabalhos citados acima são menos sensíveis a variações recentes do que marcadores microssatélites e evidenciam principalmente aspectos que esclarecem a variabilidade genética histórica de *H. virescens*, embora não tenham detectado a presença de estruturação genética ou indício de uma incipiente estruturação.

Ademais, os resultados dos processos históricos evidenciados pelas frequências alélicas semelhantes, além dos valores de fluxo gênico mesmo que reduzido, indicam uma população historicamente bastante homogênea. No entanto, a estruturação e a diferenciação genética observada nas populações podem estar relacionadas com processos recentes de expansão populacional, o que sugere que o fluxo gênico observado refere-se principalmente ao fluxo histórico ou passado. Assim, os resultados relatados no presente trabalho podem ser explicados por duas hipóteses.

A primeira hipótese indica a possibilidade das populações terem sofrido expansões populacionais anuais a partir de um pequeno tamanho populacional. Tal hipótese pode ser reforçada pelos estudos de Albernaz (2011), que encontrou elevados valores de diversidade haplotípica, uma rede de haplótipos com padrão de formato de estrela, elevado número de haplótipos em baixa frequência, gráfico unimodal para a distribuição das diferenças pareadas entre as sequências mitocondriais e valores negativos e significativos para os testes de neutralidade. Essas são características de uma espécie que atravessou um processo de expansão populacional recente (CRANDALL; TEMPLETON, 1993; CASTELLOE; TEMPLETON, 1994;

EXCOFFIER; FOLL; PETIT, 2009; SLATKIN; HUDSON, 1991; ROGES; HARPENDING, 1992). Segundo Albernaz (2011), a expansão populacional de *H. virescens*, pode ter acompanhado a expansão comercial das áreas de algodão no Brasil. A primeira grande região produtora foi a Nordeste, com produções do Rio Grande do Norte, Piauí, Ceará, Pernambuco, Paraíba, Alagoas e Bahia. Posteriormente, o estado de São Paulo adotou o cultivo, com produções que se localizavam na região de Campinas e Santa Bárbara D'Oeste. De São Paulo, as plantações de algodão foram expandidas para o Paraná, Mato Grosso e Goiás, formando a zona meridional, responsável pela grande produção algodoeira do Brasil. Essa hipótese indica que *H. virescens* se comportava no passado como uma metapopulação, o que explicaria os resultados de baixa diversidade alélica entre as populações, um isolamento por distância não significativo e a falta de correlação com fatores espaciais e temporais para formação dos dois agrupamentos. Entretanto, a alta taxa de mutação nos locos microssatélites, a sensibilidade do marcador para detectar variações recentes, a intensificação da agricultura na região Central do Brasil, a disponibilidade de hospedeiros o ano todo, o hábito polífago e o fato de espécie apresentar migração facultativa, ou seja, migram apenas na falta de hospedeiro, podem favorecer um processo inicial de estruturação genética nas populações de *H. virescens* no Brasil.

A segunda hipótese sugere a sazonalidade dos níveis de variabilidade genética entre as populações. Muitos organismos de curto ciclo de vida como *H. virescens* apresentam várias gerações, o que leva a uma acentuada flutuação sazonal no tamanho da população e na estrutura de metapopulação (SHPAK et al., 2010). Segundo Shpak et al. (2010) as primeiras gerações no período favorável são caracterizadas por pequenas populações relativamente isoladas, enquanto as gerações mais tardias experimentam tamanhos maiores com fluxo gênico mais intenso. O aumento no tamanho da população leva a um aumento do fluxo gênico, pois populações com tamanho maior se aproximam da sua capacidade de suporte, levando a maiores densidades populacionais, induzindo uma maior dispersão dos organismos como consequência da competição por recursos (SHPAK et al., 2010). No Brasil há uma carência de trabalhos que relatem o início das primeiras gerações de *H. virescens* em plantas de algodão e soja. No entanto, o controle dessa espécie pelo uso de plantas Bt e inseticidas, não permite que as populações de *H. virescens* atinjam altas densidades populacionais. Desta forma, as baixas densidades populacionais ocasionadas pelas medidas de fitoproteção, juntamente com o hábito polífago da espécie, evita a competição por hospedeiro. Como consequência o fluxo gênico fica reduzido ou

inexistente. Han e Caprio (2004) estudaram populações de *H. virescens* coletadas na região do Delta do Mississippi e encontram um padrão de flutuação do fluxo gênico ligado as estações do ano e a época do algodão no campo. Na primavera as mariposas que passaram o inverno em plantas de hospedeiro silvestre migram para os campos de algodão. Nesse momento, pode ocorrer o encontro de populações antes isoladas e uma diminuição da diferenciação genética entre as populações. No verão, o algodão é o principal hospedeiro disponível para *H. virescens*, servindo de fonte de néctar para os adultos e de hospedeiro para o desenvolvimento de lagartas, influenciando nos movimentos de dispersão das mariposas que declinam, aumentando a diferenciação genética entre as populações. No início do outono as mariposas retornam aos os hospedeiros silvestres para passar o inverno, permitindo novamente o encontro dessas populações e a diminuição da diferenciação genética. Nessa situação, ocorre um aumento da diferenciação genética no inverno e verão, diminuindo na primavera e outono. Segundo Han e Caprio (2004) o padrão sazonal da estrutura genética de *H. virescens* torna inadequado inferir estrutura genética baseado apenas em um único ponto no tempo, devendo-se analisar o fluxo gênico entre as populações ao longo de todo o ano. De um modo geral, parece ser comum a sazonalidade da estrutura genética em lepidópteros pragas (HAN; CAPRIO, 2004; SCOTT et al., 2006).

As duas hipóteses sugeridas neste trabalho não são excludentes e podem ter contribuído para a alta estruturação descrita nesse estudo. Os resultados aqui reportados podem contribuir com subsídios para as principais táticas de manejo de *H. virescens* por culturas geneticamente modificadas que expressam proteínas inseticidas, bem como aos inseticidas convencionais. Desta forma, o conhecimento gerado aqui é particularmente importante se considerarmos os efeitos da estrutura populacional e fluxo gênico sobre o ritmo de evolução de resistência a inseticidas e/ou plantas Bt (CAPRIO; TABASHNIK, 1992).

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. Os efeitos do fluxo gênico podem ter reflexos em pequena e grande escala. Em pequena escala (populações locais) espera-se que ele contribua para diluição da resistência levando ao cruzamento entre insetos resistentes e não resistentes. A capacidade de dispersão de um inseto praga é relevante

para definição do tamanho e distribuição das áreas de refúgio, uma vez que estas são os locais para manutenção de indivíduos susceptíveis possibilitando o fluxo de genes não-resistentes para grupos de indivíduos resistentes nas áreas de plantas Bt (VACHER et al., 2006). Em grande escala, o fluxo gênico pode determinar a possibilidade dos genes para resistência se espalharem ao longo da área de distribuição geográfica da espécie. Esse fenômeno influencia a velocidade em que uma adaptação que surge numa população local pode se espalhar (MACHADO; FIÚZA, 2010).

O cultivo de soja e algodão que possuem a mesma proteína de *Bacillus thuringiensis* em um agroecossistema misto, deve ser implementado de forma cautelosa devido à alta pressão de seleção, aumentando assim o risco para a evolução da resistência. *H. virescens* demonstrou possuir uma grande variabilidade genética, e estudos que visam o desenvolvimento de plantas GM levam em consideração a variabilidade genética da espécie, pois quanto maior a variabilidade apresentada maior a probabilidade da espécie se adaptar a esta estratégia. Entretanto essa variabilidade não está ligada a mudanças na suscetibilidade das populações. Desse modo, é de suma importância levar em consideração os resultados aqui apresentados para que as áreas de refúgio sejam implementadas de forma efetiva para cada cultura e assim retardar a evolução da resistência. Sendo assim, as práticas do manejo da resistência *H. virescens* com inseticidas e/ou plantas Bt devem ser decididas localmente ou regionalmente e não em escala nacional, uma vez que existe um baixo fluxo gênico entre as populações da espécie.

4 CONCLUSÕES

- Os locos microssatélites foram eficientes para caracterizar a estrutura genética dentro e entre as populações de *H. virescens* no Brasil;
- Os alelos e genótipos foram semelhantes entre as populações de *H. virescens*, indicando que as populações trocam ou trocaram material genético em algum momento;
- Existe estruturação genética moderada entre as populações de *H. virescens*, porém não relacionada com fatores espaciais ou temporais (safra, região geográfica e hospedeiro).

REFERÊNCIAS

ALBERNAZ, K.C. **Suscetibilidade à proteína Cry1Ac e estrutura genética em populações de *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil.** 2011. 83 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

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

ANDO, H.; KANEKO, S.; SUZUKI, H.; HORIKOSHI, K.; CHIBA, H.; ISAGI, Y. Lack of genetic differentiation among subpopulations of the Black-footed albatross on the Bonin Islands. **Journal of Zoology**, London, v.283, p. 28-36, 2010.

BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 155–165, 2002.

BARKER, J.S.F. A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. In: WORLD CONGRSS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994, Guelph. **Proceedings...** Guelph: International Committee for World Congresses on Genetics Applied to Livestock Production, 1994. p. 501-508.

BATES, S.R.; ZHAO, J.H.; ROUSH, R.T.; SHELTON, A.M. Insect resistance management in GM crop: past, present and future. **Nature Biotechnology**, London, v. 23, p. 57-62, 2005.

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, p. 1-10, 2007.

BETZ, F.S.; HAMMOND, B.G.; FUCHS, R.L. Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pests. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Columbia, v. 32, p. 156–173, 2000.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares.** Viçosa :UFV, 2006. 374 p.

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.

BROOK, B.W.; TONKYN, D.W.; O’GRADY, J.J.; FRANKHAM, R. Contribution of inbreeding to extinction risk in threatened species. **Ecology and Society**, Santa Ana, v. 6, p. 1-16, 2002.

BROWN, A.H.D. Isozymes plant population genetic structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 52, p. 145-157, 1978.

BROWN, S.M.; SZEWC-MCFADDEN, A.K.; KRESOVICH, S. Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 93, p. 147-159, 1996.

BUSATO, G.R.; GRUTZMACHER, A.D.; de OLIVEIRA, A.C.; VIEIRA, E.A.; ZIMMER, P.D.; KOPP, M.M.; BANDEIRA, J.D.; MAGALHÃES, T.R. Analysis of the molecular structure and diversity of *Spodoptera frugiperda* (JE smith) (Lepidoptera : Noctuidae) populations associated to the corn and rice crops in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, p. 709-716, 2004.

CALLEN, D.F. THOMPSON, A.D.; SHEN, Y.; PHILLIPS, H.A.; RICHARDS, R.I.; MULLEY, J.C.; SUTHERLAND, G.R. Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. **American Journal of Human Genetics**, Boston, v. 52, p. 922-927, 1993.

CANALES-AGUIRRE, C.B.; FERRADA, S.; HERNANDEZ, C.E.; GALLEGUILLOS, R. Usefulness of heterologous microsatellite obtained from *Genypterus blacodes* (Schneider 1801) in species *Genypterus* off the Southeast Pacific. **Gayana**, Concepcion, v. 74, p. 74-77, 2010.

CAPINERA, J.L. **Tobacco nudworm, *Heliothis virescens* (Fabricius) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)**. Gainesville: Univers, 2001. 7 p. (**EENY-219**). Disponível em: <<http://www.edis.ifas.ufl.edu>>. Acesso em: 23 mar. 2010.

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. 96, p. 611-620, 1992.

CAPRIO, M.A.; SUMERFORD, D.V.; SIMS, S.R. Evaluating transgenic plants for suitability in pest and resistance management programs. In: LACEY, L.A.; KAYA, H.K. (Ed.). **Field manual of techniques in invertebrate pathology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 805-825.

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.

CHAPMAN, J.W.; REYNOLDS, D.R.; SMITH, A.D. RILEY, J.R.; PEDGLEY, D.E.; WOIWOD, I. High altitude migration of the Diamondback Moth *Plutella xylostella* to the U.K.: a study using radar, aerial netting, and ground trapping. **Ecological Entomology**, London v.27, p.641-650, 2002.

CHEN, M.H.; DORN, S. Microsatellites reveal genetic differentiation among populations in an insect species with high genetic variability in dispersal, the codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 100, p. 75-85, 2009.

CHO, S.; MITCHELL, A.; MITTER, C.; REGIER, J.; MATTHEWS, M.; ROBERTSON, R. Molecular phylogenetics of heliothine moths (Lepidoptera: Noctuidae: Heliiothinae), with comments on the evolution of host range and pest status. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 33, p. 581-594, 2008.

COATES, B.S.; HELLMICH, R.L.; LEWIS, L.C. Polymorphic CA/GT and GA/CT icrossatelites loci for *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 5, p. 10-12, 2005.

COATES, B.S.; SUMERFOLD, 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.

COLLINS, P.J.; HOOPER, G.H.S. The microsomal mixed function oxidase system of *Heliothis punctiger* Wallengren and *H. armiger* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Comparative biochemistry and physiology, Part B**, Oxford, v. 77, p. 849-855, 1984.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira 2010**. Disponível

em:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_04_07_11_02_42_boletim_abril-2011.pdf> Acessado em: 20 nov. 2010.

CORNUET, J.M; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, Pittsburgh, v. 144, p. 2001-2014, 1996.

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.

DAKIN, E.E.; AVISE, J.C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, London, v. 93, p. 504-509, 2004.

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

DRAKE, V.A.; FARROW, R.A.; A radar and aerial trapping study of an early spring migration of moths (Lepidoptera) in inland New South Wales. **Australian Journal of Ecology**, Carlton, v. 11, p. 223-235, 1985.

DRAKE, V.A.; FARROW, R.A. The influence of atmospheric structure and motions on insect migration. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 33, p. 183-210, 1988.

DRAKE, V.A.; HELM, K.F.; READSHAW, J.L.; REID, D.G. Insect migration across Bass Strait during spring: a radar study. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 71, p. 449-466, 1981.

- EARL, D.A. **Structure havester v. 0.6.1**. 2011. Disponível em <http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/>. Acesso em: 04 mai. 2011.
- ENDERSBY, N.M.; McKECHNIE, S.W.; RIDLAND, P.M.; WEEKS, A.R. Microsatellites reveal a lack of structure in Australian populations of the diamondback moth, *Plutalla xylostella* (L.). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 107-118, 2006.
- 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, 2005.
- 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.
- FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. New York: Longman Scientific & Technicals, 1989. 438 p.
- 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.
- FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 47, p. 501-543, 2002.
- FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 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. **Fundamentos de genética da conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 280 p.
- 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.
- FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 1992. 631 p.
- _____. **Evolutionary biology**. 3rd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1998. 196 p.
- GATEHOUSE, A.G.; ZHANG, X.X. Migration potential in insects: variation in an uncertain environment. In: DRAKE, V.A.; GATEHOUSE, A.G. (Ed.). **Insect migration: tracking resources through space and time**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. p. 193–242.

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

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

GOULD, F.; TABASHNIK, B.E. Bt-cotton resistance management. In: RISSLER, J. (Ed.). **Now or never: serious new plans to save natural pest control**. Cambridge: Union of Concerned Scientists, 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.; MARTINEZ, A.; ANDERSON, R.A.; FERRE, J.; SILVA, F.J.; MOAR, W.J. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, p. 7986-7990, 1992.

GOUDET, J. **FSTAT 2.9,3**: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices 2001. Disponível em: <<http://www.unil.ch/lizea/software/fstat.html>>. Acesso em: 15 mar. 2009.

GOVINDAJARU, D.R. Variation in gene flow levels among predominately self-pollinated plants. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 2, p. 173-182, 1989.

HAAG, K.L.; ARAÚJO, A.M. de; ZAHA, A. Genetic structure of natural populations of *Dryas iulia* (Lepidoptera: Nymphalidae) revealed by enzyme polymorphism and mitochondrial DNA polymorphism (RFLP). **Biochemical Genetics**, New York, v. 31, p 449-460, 1993.

HAMRICK, J.L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRYDE, B.; THOMAS, W.L. (Ed.). **Genetics and wild population management**. New York: Addison-Wesley, 1983. chap. 4, p. 500-508.

_____. Isozymes and analysis of genetic structure in plants populations. In: SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. (Ed.). **Isozymes in plant biology**. Portland: Discorides Press, 1989. p. 73-86.

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.

HANCOCK, J.M. Microsatellites and other simple sequence: genomic context and mutational mechanisms. In: GOLDSTEIN, D.B; SCHLÖTTERER, C. (Ed.). **Microsatellites: evolution and applications**. New York: Oxford University Press, 1999. p. 1-9.

HARDY, O.J.; CHARBONNEL, N.; FRÉVILLE, H.; HEUERTZ, M. Microsatellite allele size: A simple test to assess their significance on genetic differentiation. **Genetics**, Pittsburgh, v. 163, p. 1467-1482, 2003.

HARTL, D.L. **Princípios de genéticas de população**. Tradução I.F. Afonso. 3. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2008. 1 v.

HARTL, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of populations genetics**, 3th ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer, 1997. 542p.

HENDRY, A.P.; NOSIL, P.; RIESEBERG, L.H. The speed of ecological speciation. **Functional Ecology**, Oxford, v. 21, p. 455-464, 2007.

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.

JI, Y-J. Polymorphic microsatellite loci for the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and some remarks on their isolation. **Molecular Ecology Notes**, London, v. 3, p. 102-104, 2003.

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

KRAUSS, J.; SCHMITT, T.; SEITZ, A.; STEFFAN-DEWENTER, I.; TSCHARNTKE, T. Effects of habitat fragmentation on the genetic structure of the monophagous butterfly *Polyommatus coridon* along its northern range margin. **Molecular Ecology**, oxford, v. 13, p. 311-320, 2004.

KRUMM, J.T.; HUNT, T.E.; SKODA, S.R.; HEIN, G.L.; LEE, D.J.; CLARK, P.L.; FOSTER, J.E. Genetic variability of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, suggests gene flow between populations in the Midwestern United States. **Journal of Insect Science**, New York, v. 8, p. 1-12, 2008.

LOPES, D.M.; CAMPOS, L.A.O.; SALOMÃO, T.M.F.; TAVRES, M.G. Comparative study on the use of specific and heterologous microsatellite primers in the stingless bees *Melipona rufiventris* and *M. mondury* (Hymenoptera, Apidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 33, p. 390-393, 2010.

LOVELESS, M.D.; HAMRICK, J.L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 15, p. 65-95, 1984.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics: design, analysis, and application**. Oxford: Blackwell, 2005. 326 p.

- LUIKART, G.; CORNUET, J.M. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from a allele frequency data. **Conservation Biology**, Boston, v. 12, n. 1, p. 228 – 237, Feb. 1998.
- MACHADO, V.; FIUZA, L.M. Evolução e manejo da resistência de insetos. **Biociência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 38, p. 68-74, 2010.
- 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.
- MARTINELLI, S.; OMOTO, C. Resistência de lepidópteros-praga a inseticidas na cultura do algodão no Brasil. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina grande, v. 10, p. 1167-1182, 2006.
- MARTINELLI, S.; BARATA, R.M.; ZUCCHI, M.I.; SILVA-FILHO, M.C.; OMOTO, C. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, p. 519-526, 2006.
- MARTINELLI, S.; CLARK, P.L.; ZUCHI, M.I.; SILVA-FILHO, M.C.; FOSTER, J.E.; OMOTO, C. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 97, p. 225-231, 2007.
- 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.
- MEIRMANS, P.G.; HEDRICK, P.W. Assessing population structure: Fst and related measures. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 11, p. 5-18, 2011.
- MILLER, N.J.; BIRLEY, A.J.; OVERALL, A.D.J.; TATCHELL, G.M. Population genetic structure of the lettuce root aphid, *Pemphigus bursarius* (L.), in relation to geographic distance, gene flow and host plant usage. **Heredity**, London, v. 91, p. 217–223, 2003.
- MISSIAGLIA, A.; GRATTAPAGLIA, D. Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers. **Genetics and Molecular Research**, Warren, v. 5, p. 72-78, 2006.
- MORETI, A.C.C.C. **Biologia comparada e controle de qualidade de *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) (Lepidoptera:Noctuidae) em dieta natural e artificial**. 1980. 80 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1980.

NEI, M.F. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Bethesda, v.89, p.583-590, 1978.

PARK, S.D.E. **MStools v 3**: Excel spreadsheet toolkit for data conversion 2001. Disponível em: <<http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit/>>. Acesso em: 06 dez. 2010.

PAVINATO, V.C. **Variabilidade e estrutura genética de populações de *Alabamaargillacea* (Hüb.) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil**: subsídios para o manejo da resistência à toxina Cry1Ac em algodão geneticamente modificado. 2010. 121 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

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.

PEMBERTON, J.M.; SLATE, J.; BANCROFT, D.R. BARRET, J.A. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. **Molecular ecology**, Oxford, v. 4, p. 249-352, 1995.

PETERSON, M.A. Long-distance gene flow in the sedentary butterfly, *Euphilotes enoptes* (Lepidoptera: Lycaenidae), **Evolution**, Chicago, v. 50, p. 1990-1999, 1996.

PICHON, A.; ARVANITAKIS, L.; ROUX, O.; KIRK, A.A.; ALAUZET, C.; BORDAT, D.; LEGAL, L. Genetic differentiation among various populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* Lepidoptera Yponomeutidae. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 96, p. 137-144, 2006.

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).

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

RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S.V. Genetic diagnostics in plant: RAPDs, microsatellites and machines. **Trends Genetics**, Amsterdam, v. 9, p. 275-280, 1993.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2), population genetics software for exact tests and ecumencism. **Journal of Heredity**, Washington v.86, p. 248-49, 1995.

RICE, W.R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, Chicago, v. 43, p. 223–225. 1989

RICKLEFS R.E. **A economia da natureza**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 503 p.

- 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**, College Park, 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.
- RUZZANTE D.E. A comparison of several measures of genetic distances and population structure with microsatellite data: bias and sampling variance. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 55, p. 1-14. 1998.
- SACCHERI, L.; KUUSSAARI, M.; KANKARE, M. VIKMAN, P.; FORTELIUS, W.; HANSKI, L. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. **Nature**, London, v. 392, p. 491-494, 1998.
- SCHMITT, T.; HEWITT, G.M. The genetic pattern of population threat and loss: a case of 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.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, Berlin, v. 18, p. 233-234, 2000.
- SCOTT, L.J.; LAWRENCE, N.; LANGE, C.L.; GRAHAM, G.C.; HARDWICK, S.; ROSITER, L.; DILLON, M.L.; SCOTT, K.D. Populations dynamics and gene flow of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton and grain crops in the Marrumbidgee Valley, Australia. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, p. 155-163, 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.
- SCRIBNER, K.T.; BLANCHONG, J.A.; BRUGGEMAN, D.J.; EPPERSON, B.K.; LEE, C.; PAN, Y.; SHOREY, R.I.; PRINCE, H.H. WINTERSTEIN, S.R.; LUUKKONEM, D.R. Geographical genetics: conceptual foundations and empirical applications of spatial genetic data in wildlife management. **Journal of Wild Life Management**, Washington, v. 69, p. 1434-1453. 2005.

SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y.; SEBBEN, A.M. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). **Scientia Florestalis**, Piracicaba, v. 57, p. 123-139, 2000.

SHLÖTTERE, C. The evolution of molecular - markers just a matter of fashion? **Nature Reviews**, London, v. 5, p. 63-69, 2004.

SHPAK, M.; WAKELEY, J.; GARRIGAN, D.; LEWONTIN, R.C. A structured coalescent process for seasonally fluctuating populations. **Evolution**, Lancaster, v. 64, p. 1395-1409, 2010.

SLATKIN, M.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.

SNNUCKS P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 15, p. 199-203, 2000.

SOLFERINI V.N.; SELIVON, D. Polimorfismo de isoenzimas. In: MATIOLO, S.R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2001. p. 137-142.

SOUZA, A.P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.; MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C. (Ed.). **Recursos genéticos & melhoramento plantas**. Rondonópolis: Fundação M.T. 2001. p. 939-966.

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

STRAND, M.; PROLLA, T.A.; LISKAY, R.M.; PETES, T.D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**, London, v. 365, p. 274-276, 1993.

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

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

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

THALER, R.; BRANDSTÄTTER, A.; MERANER, A.; CHABICOVSKI, M.; PARSON, W.; ZELGER, R.; DALLA VIA, J.; DALLINGER, R. Molecular phylogeny and population structure of the codling moth (*Cydia pomonella*) in Central Europe: II AFLP analysis reflects human-aided local adaptation of a global pest species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 48, p. 838-849, 2008.

TIFFIN, P.; HAHN, M.W. Coding sequence divergence between two closely related plant species: *Arabidopsis thaliana* and *Brassica rapa ssp. pekinensis*. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 54, p. 746-753, 2002.

TIMM, A.E.; GEERTSEMA, H.; WARNICH, L. Gene flow among *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) geographic and host population in South Africa. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 99, p. 341-348, 2006.

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

VACHER, C.; BOURGUET, 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 OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F. WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping error in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, London, v. 4, p. 535-538, 2004.

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

WEIR, B.S. **Genetics data analysis II**: methods for discrete population genetic data. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 455 p.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, S.S. Estimating F-statistics for the analyses of population structure. **Evolution**, Lawrence, v. 38, p. 1358-1370, 1984.

WILLIAMS, B.L.; BRAUN, J.D.; PAIGE, K.N. Landscape scale effects of habitat fragmentation on a high gene flow species: *Speyeria idalia* (Nymphalidae). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p. 11-20, 2003.

WILSON, G.A.; RANNALA, B. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. **Genetics**, Pittsburgh, v. 163, p. 1177-1191, 2003.

WRIGHT, S. Evolution in mendelian populations. **Genetics**, Pittsburgh, v. 16, p. 97-159, 1931.

_____. The genetical structure of populations. **Annals Eugenetics**, New York, v. 15, p. 223-354, 1951.

_____. The interpretation of population structure by F-statistic with special regard to systems of mating. **Evolution**, Palo Alto, v. 19, p. 395-420, 1965.

WU, K.S.; TANKSLEY, S.D. Genetic and physical mapping of telomeres and macrosatellites of rice. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 22, p. 861-872. 1993.

ZHOU, X.; FAKTOR O.; APPLEBAUM, S.W.; COLL, M. Population structure of the pestiferous moth *Helicoverpa armigera* in the Eastern Mediterranean using RAPD analysis. **Heredity**, London, v. 85, p. 251-256, 2000.