

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

Variabilidade e estrutura genética de populações de *Alabama argillacea* (Hüb.) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil: subsídios para o manejo da resistência à toxina Cry1Ac em algodão geneticamente modificado

Vitor Antonio Corrêa Pavinato

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

**Piracicaba
2010**

Vitor Antonio Corrêa Pavinato
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

**Variabilidade e estrutura genética de populações de *Alabama argillacea* (Hüb.)
(Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil: subsídios para o manejo da resistência à
toxina Cry1Ac em algodão geneticamente modificado**

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

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

Piracicaba
2010

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

Pavinato, Vitor Antonio Corrêa

Variabilidade e estrutura genética de populações de *Alabama argillacea* (Hüb.) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil: subsídios para o manejo da resistência à toxina Cry1Ac em algodão geneticamente modificado / Vitor Antonio Corrêa Pavinato. - - Piracicaba, 2010.
121 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Algodão 2. Curuquerê - Genética - Resistência 3. Genética ecológica 4. Marcador molecular : Organismos geneticamente modificados 6. Variação genética I. Título

CDD 633.51
P338v

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

Aos meus pais José Alberto Pavinato
e Eliete Fátima Corrêa Pavinato
DEDICO

À minha avó Zoraide Sinicato Corrêa
OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso Omoto pela orientação, pelos importantes ensinamentos, pela motivação e pela oportunidade concedida.

À Dra. Maria Imaculada Zucchi pelo importante ajuda e orientação e ensinamentos na área de genética de populações.

Ao Prof. Dr. José Baldin Pinheiro pela oportunidade, apoio e incentivo para a realização de uma etapa desse trabalho no Laboratório de Diversidade Genética e Melhoramento da ESALQ/USP.

Ao Dr. Samuel Martinelli pela construção da biblioteca enriquecida em SSR

Ao Biólogo e colega Miklos Maximiliano Bajay pela importante ajuda no desenho dos *primers* e durante meu aprendizado das técnicas moleculares utilizadas no trabalho.

Ao Engenheiro Agrônomo Marcelo Mattos Cavallari e à Bióloga Aluana Abreu pela ajuda com análise dos dados de genética de populações.

Ao Biólogo Felipe Antonio Domingues pela ajuda com o trabalho de linha – básica de suscetibilidade, durante seu estágio no Lab. de Resistência de Artrópodes a Pesticidas.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos.

À Monsanto do Brasil pelo suporte técnico na coleta de populações

Aos amigos Nádia F. Bertan Casarin, Eloisa Salmeron, Felipe Antonio Domingues, Gislaine O. Campos, Danielle Thomazoni, Edgar Francisco Gaona Mena, Oderlei Bernardi, Karina Cordeiro Albernaz, Oscar A. Batista Neto e Silva, Miklos Maximiliano Bajay, Thiago Luiz da Mata, Carlos Eduardo de Araujo Batista, Giuliana Eto do Valle, Fatima Bosetti, Glauber Campacci Pavan, Milene Möller pelo agradável convívio durante os últimos anos.

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

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 DESENVOLVIMENTO.....	23
2.1 Revisão bibliográfica.....	23
2.1.1 Características bioecológicas de <i>Alabama argillacea</i> (Hübner).....	23
2.1.2 Resistência de insetos a plantas geneticamente modificadas.....	25
2.1.3 Marcadores moleculares.....	29
2.1.4 Marcadores moleculares microssatélites e genética de populações	32
2.2 Material e métodos	37
2.2.1 Coleta das populações	37
2.2.2 Criação em laboratório.....	39
2.2.3 Caracterização da suscetibilidade de <i>Alabama argillacea</i> à toxina Cry1Ac.....	40
2.2.3.1 Linha-básica de suscetibilidade.....	40
2.2.3.2 Determinação e validação da concentração diagnóstica para o monitoramento da suscetibilidade.....	43
2.2.4 Desenvolvimento e caracterização dos microssatélites.....	43
2.2.4.1 Extração e quantificação de DNA.....	43
2.2.4.2 Construção de biblioteca genômica enriquecidas em microssatélites.....	45
2.2.4.3 Seleção, seqüenciamento dos clones positivos e desenho de <i>primers</i>	48
2.2.4.4 Amplificações iniciais e otimização dos <i>primers</i>	49
2.2.4.5 Caracterização dos locos microssatélites.....	50
2.2.5 Estudo da variabilidade genética e estrutura populacional.....	50
2.2.5.1 Genotipagem dos locos microssatélites	50
2.2.5.2 Variabilidade genética intrapopulacional	51
2.2.5.3 Variabilidade interpopulacional e estrutura genética	51
2.3 Resultados e discussão	53
2.3.1 Caracterização da suscetibilidade de <i>Alabama argillacea</i> à toxina Cry1Ac.....	53

2.3.1.1	Linha-básica de suscetibilidade	53
2.3.1.2	Caracterização da curva de concentração–resposta de inibição de crescimento... ..	59
2.3.1.3	Determinação e validação da concentração diagnóstica para o monitoramento da suscetibilidade	65
2.3.2	Desenvolvimento e caracterização dos microssatélites	70
2.3.2.1	Construção de biblioteca genômica enriquecidas em Microssatélites	70
2.3.2.2	Seleção, seqüenciamento dos clones positivos e desenho de <i>primers</i>	70
2.3.2.3	Amplificações iniciais e otimização dos <i>primers</i>	76
2.3.2.4	Caracterização dos locos microssatélites	80
2.3.3	Estudo da variabilidade genética e estrutura populacional.....	84
2.3.3.1	Variabilidade genética intrapopulacional.....	84
2.3.3.2	Variabilidade interpopulacional e estrutura genética populacional.....	89
3	CONCLUSÕES	109
	REFERÊNCIAS.....	111

RESUMO

Variabilidade e estrutura genética de populações de *Alabama argillacea* (Hüb.) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil: Subsídios para o manejo da resistência à toxina Cry1Ac em algodão geneticamente modificado

Algodão geneticamente modificado que expressa a toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* Berliner tem sido plantado no Brasil desde 2006. Entre as pragas-alvo da tecnologia, *Alabama argillacea* (Hüb.) é uma espécie monófaga e apresenta alto potencial de risco de evolução da resistência. Para a implantação de um programa de manejo da resistência de *A. argillacea* à toxina Cry1Ac no Brasil, os principais objetivos do trabalho foram: a) estabelecer as linhas-básicas de suscetibilidade à toxina Cry1Ac em populações de *A. argillacea* e definir concentrações diagnósticas para o monitoramento da resistência e b) isolar e caracterizar locos microssatélites para avaliar a variabilidade e estruturação genética de populações de *A. argillacea* no Brasil. As linhas-básicas de suscetibilidade foram estimadas por meio de bioensaio de imersão de discos de folhas em soluções contendo a toxina Cry1Ac para populações de *A. argillacea* coletadas nos estados da Bahia, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, durante as safras agrícolas de 2008 e 2009. Foram isolados e caracterizados dez locos microssatélites. Para avaliar a variabilidade genética foram estimadas as heterozigosidades observadas e esperadas. Para o estudo da estruturação genética foram estimadas as estatísticas F e feita a análise de agrupamento (distância de Nei) e análise Bayesiana. Baseado na estimativa da CL_{50} foram encontradas variações naturais de até seis vezes na suscetibilidade à toxina Cry1Ac entre as populações testadas. A partir da análise conjunta dos dados de concentração-mortalidade das populações testadas, foram definidas as concentrações diagnósticas de 10 e 32 μg de Cry1Ac/ml de água para futuros programas de monitoramento da resistência. O número médio de alelos por loco foi de 7,1 (variando de dois a 23 alelos). As heterozigosidades observada e esperada médias foram de 0,532 e 0,329. O índice de fixação intrapopulacional médio ($f \approx F_{IS}$) foi de 0,268, com variação entre os locos de -0,008 a 0,736. O índice de fixação da espécie (F_{IS}) estimado através da análise de variância foi de 0,244 (IC 95% de 0,093 a 0,418). O valor de F_{ST} estimado foi de 0,036 (IC 95% de 0,007 a 0,080). Esse valor de F_{ST} não diferiu significativamente de zero, indicando a ausência de estruturação genética. Contudo foi detectado certo grau de endogamia intrapopulacional. A estruturação espacial da variabilidade genética não foi detectada, pois as populações avaliadas apresentaram uma coesão que é mantida pela alta taxa de migração ($\approx 6,7$ migrantes por geração). Entretanto, foi identificada indícios de estruturação genética determinada pelo tempo, uma vez que tanto o agrupamento baseado em distâncias genéticas quanto à análise Bayesiana identificaram grupos que são formados por populações coletadas em safras agrícolas diferentes. As causas ligadas a essa mudança na variabilidade genética não puderam ser identificadas, entretanto pode se inferir que possivelmente causas naturais ou práticas de manejo estejam determinando eventos de gargalo genético. Devido ao intenso fluxo gênico entre populações de *A. argillacea* no Brasil, estratégias de manejo da resistência devem ser implantadas no âmbito nacional.

Palavras-chave: *Alabama argillacea*; Algodão geneticamente modificado; Marcadores microssatélites; Variabilidade genética; Estrutura genética

ABSTRACT

Variability and genetic structure of *Alabama argillacea* (Hüb.) (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Brazil: Basis for managing resistance to Cry1Ac toxin in genetically modified cotton

Genetically modified cotton expressing Cry1Ac toxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner has been planted in Brazil since 2006. Among target pests of this technology, *Alabama argillacea* (Hüb.) is a monophagous species and offers a high potential risk of resistance evolution. In order to implement a resistance management program of *A. argillacea* to Cry1Ac toxin in Brazil, the objectives of this research were: a) to establish baseline susceptibility to Cry1Ac toxin in *A. argillacea* populations and define diagnostic concentrations for resistance monitoring and b) to isolate and characterize microsatellite loci to evaluate the variability and genetic structure of *A. argillacea* populations in Brazil. The baseline susceptibility data were estimated with leaf-disc bioassays by dipping into different concentration of Cry1Ac solution. Populations of *A. argillacea* were collected in Bahia, Goiás, Mato Grosso and Mato Grosso do Sul States, during 2008 and 2009 cotton-growing seasons. Ten microsatellite loci were isolated and characterized. The genetic variability was evaluated estimating observed and expected heterozygosities. For the studied of genetic structure, the F statistics was estimated, and Cluster analysis (Nei's distance) and Bayesian analysis were performed. Based on estimation of LC₅₀, natural variation up to 6-fold was detected in the susceptibility to Cry1Ac among tested populations. Based on analysis of concentration-mortality data by combining all populations, diagnostic concentrations of 10 and 32 µg of Cry1Ac/ml of water were defined for monitoring resistance. The mean number of alleles per loci was 7.1 (varying from 2 to 23 alleles). The observed and expected heterozygosities was 0,523 e 0, 395. The mean intrapopulation fixation index ($f \approx F_{IS}$) 0,268, varying from -0.008 to 0.736 between loci. The species fixation index (F_{IS}) estimated by analysis of variance was 0.244(95% CI of 0.093 to 0.418). The estimated value of F_{ST} was 0.036 (95% CI of 0.007 to 0.080). The F_{ST} value was not significantly different from zero, indicating absence of genetic structure. However, some degree of intrapopulation inbreeding was detected. Spatial structure of genetic variability was not detected because tested populations showed cohesion kept by high migration rate (≈ 6.7 migrants per generation). However, evidence of genetic structure across time was detected by Cluster analysis of genetic distance as well as by Bayesian analysis with group formation by population collection seasons. Factors affecting changes in genetic variability were not identified; however, natural factors or management practices may be determining some genetic bottleneck events. Due to intense gene flow among *A. argillacea* populations in Brazil, resistance management strategies must be implemented in a national basis.

Keywords: *Alabama argillacea*; Genetically modified cotton; Microsatellite markers; Genetic variability; Genetic structure

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – A) Preparo das placas para bioensaio de imersão de discos de folhas: células contendo 500 µL de solução de ágar a 2,5%; camada de papel filtro sobre a camada de ágar; discos de folhas que foram imersos em soluções de Cry1Ac (µg de I.A. / ml de água); B) transferência de lagartas de *A. argillacea* para cada célula após a secagem da solução contendo toxina Cry1Ac; e C) material utilizado para a realização do bioensaio de imersão de discos de folhas: a) pincel para a transferência das lagartas; b) filme plástico para selagem das placas42
- Figura 2 – Caracterização da linha-básica de suscetibilidade das populações de *Alabama argillacea* coletadas nos estados da Bahia (BA-1, BA-3 e BA-4), Mato Grosso (MT-1), Mato Grosso do Sul (MS-1) e a suscetível de referência (LAB) à toxina Cry1Ac57
- Figura 3 – Caracterização da resposta de inibição de crescimento para a população de *A. argillacea* do estado de Bahia (BA-3) à toxina Cry1Ac63
- Figura 4 – Caracterização da resposta de inibição de crescimento para a população de *A. argillacea* do estado de Mato Grosso (MT-1) à toxina Cry1Ac.....64
- Figura 5 – Caracterização da linha-básica de suscetibilidade à toxina Cry1Ac mediante agrupamento de dados obtidos com as caracterizações de curvas de concentração-resposta de quatro populações de *A. argillacea* coletadas nas safras 2007/2008.68
- Figura 6 – Frequências de motivos microssatélites perfeitos, interrompidos, compostos e compostos interrompidos isolados em *A. argillacea*.....72
- Figura 7 – Porcentagem de motivos microssatélites encontrados nos 117 insertos de *A. argillacea* seqüenciados que apresentaram pelo menos uma região microssatélite.....72
- Figura 8 – Porcentagem de motivos microssatélites encontrados nos *primers* obtidos para *A. argillacea*.75
- Figura 9 – Frequência dos motivos dinucleotídeos que são acessados pelos *primers* obtidos para *A. argillacea*75
- Figura 10 – Teste inicial utilizando os *primers* 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 23; e três indivíduos de *A. argillacea* escolhidos ao acaso nas populações diferentes à temperatura de 60°C.....79
- Figura 11 – Gel de acrilamida 7% com os testes dos *primers* isolados na primeira triagem. *Primers* que acessam os locos Aar14, Aar15, Aar16, Aar19, Aar21 e Aar23 em *A. argillacea*.....79
- Figura 12 – Histograma das frequências alélicas dos dez locos microssatélites, estimados para ≈20 indivíduos de *A. argillacea*. O eixo Y indica a frequência alélica e o eixo X indica o tamanho do alelo, em pares de base83

Figura 13 – Padrão de divergência genética entre as populações de *A. argillacea*, definido pelo agrupamento UPGMA, a partir das distâncias genéticas de Nei (1978). Correlação cofenética igual a 0,99%. Para testar a consistência dos nós foram realizadas 1000 reamostragens por *bootstrap*..... 99

Figura 14 – Resultado da análise obtida para a determinação do valor de agrupamento que melhor representa a variabilidade genética das populações de *A. argillacea* estudadas: K variando de 1 a 15, com cinco repetições cada K, *burn in* de 50.000 permutações e seguidas por 500.000 permutações MCMC 100

Figura 15 – Resultado obtido para K=2, através do programa Structure 2.2. O número de K que melhor representa o conjunto de dados determinou a formação de dois grupos, que se distinguem apenas pelo ano em que as populações desses grupos foram coletadas; a) as populações foram ordenadas segundo suas proximidades geográficas, e b) foram ordenadas segundo ano de coleta. Essas informações não foram determinadas *a priori* para a análise bayesiana 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização da linha-básica de suscetibilidade à toxina Cry1Ac em populações de <i>Alabama argillacea</i>	56
Tabela 2 – Modelo de regressão não-linear para estimativa dos parâmetros EC ₅₀ e EC ₉₉ para a população de <i>A. argillacea</i> da Bahia (BA-3).....	61
Tabela 3 – Modelo de regressão não – linear para estimativa dos parâmetros EC ₅₀ e EC ₉₉ para a população de <i>A. argillacea</i> Mato Grosso (MT-1).....	62
Tabela 4 – Caracterização da linha-básica de suscetibilidade à toxina Cry1Ac mediante agrupamento de dados obtidos com as caracterizações de curvas de concentração-resposta de quatro populações de <i>A. argillacea</i> coletadas nas safras 2007/2008.....	69
Tabela 5 – <i>Primers</i> desenhados para <i>A. argillacea</i> a partir das regiões microssatélites.	73
Tabela 6 – Característica dos dez locos microssatélites obtidos para <i>Alabama argillacea</i> : Sequência do <i>primer forward</i> (F) e <i>reverse</i> (R).....	82
Tabela 7 – Estimativas de variabilidade genética para os locos microssatélites utilizados em <i>A. argillacea</i>	85
Tabela 8 – Estimativa de parâmetros descritivos de variabilidade genética nas onze populações de <i>A. argillacea</i>	86
Tabela 9 – Probabilidade do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg	87
Tabela 10 – Frequência alélica encontrada em cada loco microssatélite encontrada em cada população de <i>A. argillacea</i>	90
Tabela 11 – Alelos privados obtidos em 70 alelos de marcadores microssatélites. Loco, alelo, frequência que ocorrem na população que são encontrados e população de origem	92
Tabela 12 – Estimativa das estatísticas F de Wright, através da análise de variância das frequências alélicas e do número de migrantes por geração (N _e m) em onze populações naturais de <i>A. argillacea</i> . Intervalo de confiança (IC) de 95% de probabilidade.....	94
Tabela 13 – Estimativa do parâmetro θ par-a-par entre as populações.....	95
Tabela 14 – Distâncias genéticas de Nei (1978), calculadas entre as populações	98

1 INTRODUÇÃO

As plantas geneticamente modificadas (GM) resistentes a insetos são uma das novas tecnologias para controle de pragas. Desde meados dos anos 90 tem sido crescente a utilização de plantas GM contendo genes da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis* Berliner que codificam proteínas com ação inseticida, na agricultura mundial. O Brasil ocupa a terceira posição no quadro mundial em relação à área plantada com cultivares transgênicos, ficando atrás dos EUA e da Argentina (INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS - ISAAA, 2008). Das variedades transgênicas para controle de insetos plantadas no Brasil, destacam-se as de algodão e de milho. O algodão Bollgard® (Monsanto) foi aprovado pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) no Brasil em 2005. Essa variedade possui o gene proveniente de *Bacillus thuringiensis* (Bt) que codifica a proteína inseticida Cry1Ac. Essa proteína tem como pragas-alvos, os seguintes insetos da ordem Lepidoptera na cultura do algodão no Brasil: *Alabama argillacea* (Hüb.), *Heliothis virescens* (Fabr.) e *Pectinophora gossypiella* (Saund.). Recentemente, em 2009, a CTNBio aprovou a liberação de mais duas variedades de algodão GM resistentes a insetos, o algodão Bollgard® II (Monsanto) que expressa as toxinas Cry1Ac e Cry2Ab2 e o algodão Widestrike® (Dow AgroSciences Industrial Ltda) que expressa as toxinas Cry1Ac e Cry1F de *B. thuringiensis*. Além de controlarem as pragas alvos do algodão Bollgard®, outras espécies são controladas por essas novas variedades, tais como: *Helicoverpa zea* (Hüb.), *Spodoptera exigua* (Hüb.), *Spodoptera eridania* (Cramer), *Pseudoplusia includens* (Walker), *Trichoplusia ni* (Hüb.) (Widestrike®) e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Bollgard® II e Widestrike®).

Um dos problemas da utilização indiscriminada de uma tecnologia para o manejo de pragas é a evolução da resistência. Com isso, esforços devem ser tomados para frear ou mitigar a evolução da resistência, a fim de manter o uso sustentável de uma tecnologia e permitir que não ocorra o seu desuso. Sendo assim, as primeiras ações que devem ser tomadas, dentro de programas de manejo da resistência é a caracterização de linhas-básicas de suscetibilidade, a definição de concentrações diagnósticas e a implementação de programas de monitoramento da evolução da resistência (ROUSH; MILLER, 1986; MARÇON et al., 2000; WU et al., 2002; ALI et al.,

2006). O monitoramento é eficiente de acordo com a habilidade de detectar alelos raros que conferem resistência quando estes estão em baixa frequência na população, pois assim é possível direcionar as estratégias de manejo antes da resistência se tornar um problema (ROUSH; MILLER, 1986; ANDOW; HUTCHINSON, 1998)

A principal estratégia de manejo da resistência a proteínas inseticidas expressas por plantas GM tem sido baseada na manutenção de uma área de refúgio, onde são plantadas variedades convencionais não transgênicas da mesma cultura próximas à área de plantio da variedade GM que expressa uma ou mais toxinas em alta dose (GOULD, 1998). Contudo, para o sucesso dessa estratégia é necessário que ocorra às seguintes condições: a) gene da resistência seja de caráter recessivo, b) a concentração da toxina expressa seja alta o suficiente para matar os indivíduos heterozigotos da população e c) que o cruzamento entre indivíduos que carregam o gene da resistência e indivíduos suscetíveis ocorra ao acaso (ALSTAD; ANDOW, 1995).

Estudos de variabilidade genética, estrutura populacional e fluxo gênico são de grande importância dentro do contexto de manejo pró-ativo da resistência de insetos a plantas GM (CAPRIO; TABASHNIK, 1992; CAPRIO et al., 2000). Como o fluxo gênico é uma força coesiva que mantém a uniformidade da variabilidade genética entre as populações de uma espécie e é responsável em trazer variação nas populações, é por meio desse fluxo que os alelos que conferem resistência são espalhados para outras populações. Além disso, como a estrutura populacional e variabilidade genética variam entre populações, a frequência dos alelos que conferem resistência pode estar também distribuída desigualmente. Portanto, entendimento da estrutura genética e do fluxo gênico intra-específico entre as populações de uma espécie-praga permite o delineamento de práticas de manejo mais eficientes com o objetivo de se retardar a evolução da resistência (CAPRIO; TABASHNIK, 1992) e identificar unidades evolutivas distintas que são áreas focos para o manejo da resistência.

Conhecimentos de processos ecológicos que influenciam a variabilidade genética entre populações são de grande relevância para refinar as estratégias de manejo da resistência (GOULD, 1998). Esses estudos permitem entender a estruturação hierárquica da diversidade genética, padrões e processos que determinam a diferenciação genética e o fluxo gênico entre populações de insetos. Marcadores

moleculares têm sido utilizados para os estudos reportados para os principais alvos de controle da primeira geração de plantas GM, e envolvem, por exemplo, insetos-pragas como *Ostrinia nubilalis* (Hüb.) (BOURGUET et al., 2000; COATES et al., 2004; 2005), *Helicoverpa armigera* (Hüb.) (SCOTT et al., 2006), e *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (MARTINELLI et al., 2006; 2007).

Dentre os insetos-alvo do controle das plantas de algodão Bt, *A. argillacea* é uma das espécies que apresenta o mais elevado risco para evolução da resistência (FITT et al., 2006). *A. argillacea* é uma espécie monófaga que se alimenta exclusivamente de algodão (*Gossypium* spp.). Características como a sua alimentação apenas em plantas de algodão e a alta mobilidade das lagartas e dos adultos desta praga elevam a probabilidade da exposição continuada deste inseto ao longo do tempo às toxinas de Bt e deste modo aumentam o risco de evolução da resistência (FITT et al., 2006).

Portanto, o objetivo do trabalho foi de realizar um estudo genético ecológico em populações de *A. argillacea* no Brasil para obter subsídios para o manejo pró-ativo da resistência à toxina Cry1Ac expressa em algodão GM. Para tanto, foram conduzidos (a) estudos para caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade à proteína Cry1Ac de Bt para verificar se existe variabilidade natural na resposta à toxina dependente da localidade geográfica e (b) estudos da variabilidade e estrutura genética de populações de *A. argillacea* mediante uso de marcadores microssatélites para avaliar se a variabilidade genética está estruturada dentro ou entre populações no Brasil e testar se ocorre fluxo gênico entre as populações de *A. argillacea*.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Características bioecológicas de *Alabama argillacea* (Hübner)

Alabama argillacea (Hübner) é uma espécie nativa das Américas do Sul e Central, e é encontrada em todos os países do continente. A distribuição geográfica dessa espécie abrange o extremo meridional da Argentina e toda região algodoeira dos Estados Unidos (CALGAGNOLO, 1965). No Brasil, *A. argillacea* é o principal inseto-praga da cultura do algodão, podendo reduzir em até 67% a produtividade da cultura (RAMALHO, 1994).

As lagartas de *A. argillacea*, também conhecida como curuquerê-do-algodoeiro, atacam o limbo das folhas, devorando-as quase totalmente, e quando o ataque se dá por ocasião abertura das maçãs, ocorre à maturação forçada das mesmas, diminuindo a resistência das fibras. Na América Tropical, o seu ataque pode ocorrer em qualquer época do ano ou durante todo o ciclo da planta dependendo das condições climáticas de cada região (SILVA et al., 1980). As lagartas alimentam-se das folhas e quando em altas densidades populacionais, podem desfolhar completamente o algodoeiro, reduzindo assim consideravelmente a produtividade da planta (GRAVENA; CUNHA 1991; JÁCOME et al., 2001; QUIRINO; SOARES 2001). A produção do algodão, peso do capulho e das sementes, e a porcentagem de uniformidade das fibras foram influenciadas pelos níveis de população das pragas até os 135 dias, não proporcionando mais danos econômicos após este período (MARCHINI et al., 1976). Em algodão mocó (*Gossipium hirsutum* var. Maria Galante), o ataque de *A. argillacea* é responsável pelo retardo do ciclo floral da planta em aproximadamente um mês (SEARA, 1970). *A. argillacea* é uma espécie monófoga durante o estágio larval, sendo encontrada apenas se alimentando de folhas de algodão, por essa razão, esta espécie-praga tem grande importância para essa cultura (AZEVEDO et al., 2002).

A. argillacea é uma espécie que possui hábito migratório. Essa praga surge, na cultura do algodão, em épocas distintas de ocorrência entre estados e países, devido ao

fato dessa espécie realizar migrações cíclicas (SILVEIRA NETO, 1972; HENDRICKS, 1975). Mediante estudos de flutuação populacional, foi observado que *A. argillacea* ocorre na cultura do algodão no Brasil, nos meses de janeiro a julho. Essa espécie ocorre a partir de dezembro, na região Centro-Sul do país (LADEIRA, 1957). No estado de São Paulo, *A. argillacea* começa a surgir também no mês de dezembro e permanece até julho, apresentando pico populacional no mês de abril (SILVEIRA NETO, 1972; BOTELHO, 1976). Nos estado de Minas Gerais e Goiás infestações dessa praga podem ocorrer a partir de novembro (GALLO et al., 2002). Na região Nordeste, no município de Canindé, Ceará, *A. argillacea* surge na cultura do algodão Mocó nos primeiros dias do mês de janeiro, permanecendo na região até o início do mês de maio (SANTOS, 1980). As infestações no estado de São Paulo iniciam-se com adultos provenientes da região Centro-Norte que em seguida se dirigem para a região Centro-Sul do país e norte da Argentina, que partem por fim para a região Norte do Brasil. Ocorrem de três a cinco gerações de *A. argillacea* em todo o ciclo do algodoeiro, sendo que cada geração ocorrem em um período médio de 24 dias. Com isso as primeiras gerações que ocorrem na cultura em determinado ano são de adultos migrantes provenientes de outra região produtora adjacente, as gerações intermediárias são de indivíduos que estabelecem a população na área, e as ultimas gerações são de indivíduos migrantes responsáveis pela colonização de outras regiões (CALCAGNOLO, 1965). Com a expansão da cultura do algodão para a região dos Cerrados nos últimos anos, a ocorrência dessa praga está em sincronia com as épocas de cultivo nas diferentes regiões produtoras de algodão no Brasil.

O controle populacional de *A. argillacea* tem sido feito principalmente mediante a utilização de inseticidas sintéticos. Contudo, métodos alternativos de controle têm sido sugeridos. A utilização de agentes microbianos, como *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *Metharizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Bacillus thuringiensis*, mostraram ser eficientes para o controle de *A. argillacea* (MARTINS et al., 2007). Além disso, a utilização de variedades de algodão que apresentam algum tipo de resistência ao ataque de *A. argillacea* também tem se mostrado eficientes no controle da praga (SANTOS; BOIÇA JUNIOR, 2001). Dentro desse contexto, a utilização de plantas geneticamente modificadas que expressam toxinas Cry, provenientes de *B.*

thuringiensis, são as mais novas alternativas para o controle desse inseto na cultura do algodão no Brasil. Entretanto, as características bioecológicas de *A. argillacea* como hábito alimentar monófago e grande capacidade de dispersão, aumentam a exposição do inseto à proteína inseticida de *B. thuringiensis*, aumentando assim os riscos de evolução de resistência a toxinas expressas por plantas GM (FITT et al., 2006).

2.1.2 Resistência de insetos a plantas geneticamente modificadas

Plantas geneticamente modificadas que expressam toxinas provenientes de *Bacillus thuringiensis* são as mais novas tecnologias para o controle de pragas agrícolas. Nos EUA são plantadas desde 1996, com a liberação comercial do algodão Bt Bollgard[®] (Monsanto) que expressa a toxina Cry1Ac. No Brasil a liberação comercial da primeira variedade ocorreu em 2005, com a aprovação do algodão Bollgard[®]. Mais recentemente, em 2009, houve a liberação comercial de mais duas variedades, o algodão Bollgard[®] II (Monsanto) que expressa às toxinas Cry1Ac e Cry2Ab2 e o algodão Widestrike[®] (Dow AgroSciences) que expressa às toxinas Cry1Ac e Cry1F. Apesar de essas novas tecnologias trazerem uma maior variedade de toxinas para o sistema de produção do algodão, todas expressam a toxina Cry1Ac. Portanto essa toxina ainda irá impor uma pressão de seleção para as pragas alvos de seu controle (ALI et al., 2006).

As plantas 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). Os cristais protéicos (também chamados de δ -endotoxinas) de Bt são extremamente tóxicos para determinadas pragas, contudo são pouco ou não-tóxicos para a maioria dos insetos benéficos e outros organismos não-alvos (CROFT, 1990).

As toxinas de Bt são protoxinas que necessitam ser ativadas pelas proteases do sistema digestivo de insetos para se tornarem tóxicas. As toxinas ativadas se ligam a receptores específicos nas microvilosidades das membranas celulares das células epiteliais do mesêntero (HOFFMANN et al., 1988; VAN RIE et al., 1989). Ao serem ativadas, esses receptores específicos desencadeiam a formação de poros no epitélio do mesêntero, e essa formação modifica o equilíbrio osmótico que leva a lise celular e

ruptura do sistema digestivo, causando a morte do inseto (KNOWLES; ELLAR, 1987; GILL et al., 1992; SCHNEPF et al., 1998). A ligação da toxina nos receptores é específica por isso sua atividade depende da presença de receptores específicos no mesêntero dos insetos (VAN RIE et al., 1989).

Devido à expressão contínua das toxinas inseticidas, as plantas GM que contêm os genes de Bt exercem uma elevada pressão de seleção, na direção da sobrevivência dos genótipos resistentes nas populações de insetos-pragas alvos do controle. O potencial de evolução de resistência de populações de insetos às toxinas de Bt é uma das principais ameaças e limitações ao emprego dessa tecnologia no manejo de pragas agrícolas (GOULD, 1998; BATES et al., 2005; FITT et al., 2006).

A resistência envolve a sobrevivência e reprodução diferencial de organismos expostos à pressão de seleção que resultaria na mortalidade da maioria dos indivíduos de uma população. A resistência a toxinas (inseticidas naturais e sintéticos) provêm do estresse imposto por essas substâncias que agem na variabilidade genética existente de populações naturais. Segundo Dobzhansky (1951), a resistência é uma característica “pré-adaptativa”, genética e hereditária. Na evolução da resistência ocorre uma substituição de alelos: o alelo para a suscetibilidade é substituído, ao longo das gerações, pelo alelo que confere resistência. Os alelos que conferem resistência surgem ao acaso por mutação e ocorrem em baixas frequências. Com a pressão de seleção, esses alelos passam a ocorrer com maior frequência, alterando assim a proporção entre os alelos existentes na população. Esta substituição pode ocorrer em um ou em vários locos e é favorecida pela forte seleção que o pesticida promove na variação genética inicial (ROUSH; MCKENZIE, 1986).

Em princípio, o mecanismo de resistência ao Bt poderia ser localizado em cada um das diferentes etapas do modo de ação das proteínas Cry, tais como: solubilização, transformação proteolítica, passagem através da membrana peritrófica, sítio de ação na membrana plasmática das células do mesêntero, formação dos poros, e lise osmótica das células (FERRÉ; VAN RIE, 2002). Considerando que diversos mecanismos têm sido observados em linhagens resistentes selecionadas em laboratório, apenas dois mecanismos de resistência têm sido relatados. O mecanismo de resistência mais importante tem sido aquele ligado à diminuição da sensibilidade dos sítios de ação da

toxina. Em segundo lugar está o mecanismo relacionado à pro-ativação das δ -endotoxinas pelas proteases do sistema digestivo (TABASHNIK, 1994).

Pelo fato de Bt ter sido utilizado comercialmente por mais de três décadas sem relatos de desenvolvimento de resistência nas populações de campo, alguns autores presumiram que a evolução da resistência a essas toxinas seria improvável (TABASHNIK, 1994). Entretanto, foram observados casos de resistência a biopesticidas formulados à base de Bt em populações de campo da traça-das-crucíferas, *Plutella xylostella* L. (TABASHNIK 1991, 1994). Além disso, foram detectadas mudança e diminuição da suscetibilidade de populações naturais de *Heliothis virescens* e *Helicoverpa zea* às proteínas purificadas Cry1Ac e Cry1Ab (STONE; SIMS, 1993; ALI et al., 2006). Já em relação a plantas GM, já foram reportados a capacidade de *Helicoverpa armigera* (Hüb.) em desenvolver resistência, quando submetida à pressão de seleção com algodão Bt, que expressa a toxina Cry1Ac, em condições de laboratório na China (FENGXIA et al., 2003; LU et al., 2004). Contudo o único caso de resistência a Cry1Ac, presente em planta GM foi de *H. zea*, nos estados de Arizona e Mississipi, EUA, onde a área de refúgio plantada é menor que 20% (TABASHNIK et al., 2008)

Nos países em que se tem utilizado com sucesso a tecnologia das plantas GM resistentes a insetos, os programas de manejo da resistência tem se baseado na expressão das toxinas inseticidas em altas doses associadas à manutenção de áreas refúgio e monitoramento da suscetibilidade a estas proteínas nas populações de insetos. A área de refugio consiste no plantio de variedade convencionas que não expressam a(s) toxina(s), juntamente com as plantas GM (GOULD, 1998; BATES et al., 2005; TABASHNIK, 2008). O uso de concentrações diagnósticas em um programa de monitoramento da resistência, permite que um número maior de insetos seja testado apenas nas concentrações com maior capacidade de informar sobre a suscetibilidade a um determinado inseticida e/ou biopesticida na população da praga, e conseqüentemente, os resultados podem ser obtidos de uma forma mais rápida, precisa e prática (ROUSH; MILLER, 1986) Contudo, para um programa monitoramento da resistência ser eficiente, esse necessita de métodos de bioensaios sensíveis, capazes de identificar a presença de indivíduos resistentes quando esses estão em baixa frequência na população. Sims et al. (1996) compararam a sensibilidade relativa de dois

métodos de bioensaio de ingestão com a avaliação da mortalidade e da inibição de crescimento como critérios de resposta e concluíram que os ensaios onde foi avaliada a inibição de crescimento larval utilizando concentrações subletais da proteína Cry1Ac foram mais sensíveis que os ensaios de concentração-resposta.

Muitas vezes os programas de monitoramento da resistência são negligenciados, pois a ao invés de ocorrer a sua implementação concomitante com o início do uso de uma determinada tecnologia para o controle de pragas, essa ocorre quando a resistência de insetos já é um problema no campo (SIMS et al., 1996). Sobre estratégias de manejo e programas de monitoramento da resistência, existe uma discussão a respeito de quando se deve introduzir uma variedade GM e desenvolver áreas de refúgio: a primeira abordagem diz respeito a uma prática de manejo pró-ativa da resistência, no qual a uma interpretação conservativa dos dados disponíveis é utilizada para o desenvolvimento de estratégias de manejo da resistência. Essa abordagem empregaria uma área de refúgio relativamente grande associada ao plantio inicial de plantas transgênicas, além de envolver uma série de estudos envolvendo a planta transgênica, ecologia dos insetos e outros aspectos antes de haver a liberação da planta para o plantio comercial; a segunda abordagem seria a introdução rápida das plantas transgênicas combinada com práticas de manejo adaptativa da resistência. Essa prática adotaria uma interpretação menos conservativa dos dados disponíveis, mas utilizaria uma abordagem contínua de monitoramento e avaliação dos dados para estar sempre adotando práticas de manejo condizentes com a situação. Essa prática de manejo depende da nossa habilidade de identificar alelos raros que conferem resistência quando esses ainda estão em baixa frequência nas populações (ANDOW; HUTCHINSON, 1998).

Sendo assim, percebe-se que tanto as práticas de utilização conservativa quanto as táticas de manejo adaptativo depende de geração de conhecimento sobre o complexo de pragas que são alvos de controle de determinada planta GM e informações sobre os aspectos agroecológicos do ambiente. Portanto, conhecer a diversidade genética dos insetos pragas, e como essa está estruturada em unidades populacionais menores dentro do complexo ecossistema permite entender os processos que determinam essa distribuição espacial além de permitir isolar locais e populações com

maior potencial para a evolução da resistência, uma vez que a estrutura populacional e a variabilidade genética divergirem entre populações, da mesma forma os alelos que conferem resistência também podem estar distribuídos desigualmente. Dessa forma percebe-se a importância de se entender os padrões de distribuição da variabilidade genética e fluxo gênico para se determinar áreas foco para o monitoramento e desenvolver estratégias para mitigar a evolução da resistência nesses locais. (CAPRIO et al., 2000).

2.1.3 Marcadores moleculares

A genética de populações sofreu uma revolução nas últimas décadas, após o advento dos marcadores moleculares. Essa revolução se deve ao fato de hoje, ser possível estudar genética de qualquer organismo existente, sem a necessidade de se ter um organismo mutante que manifesta diferenças visíveis, como ervilhas lisas e rugosas, ou *Drosophila* spp. com olhos vermelhos ou brancos.

E essa revolução veio com a abundância de dados experimentais gerados pelo uso de métodos moleculares nos estudos dos polimorfismos genéticos. Presente em todos os organismos, os polimorfismos moleculares permitem que as populações sejam estudadas independentemente da espécie ou do hábitat, e sem a necessidade de cruzamentos controlados, genes mutantes ou de quaisquer estudos genéticos anteriores (HARTL, 2008)

Sendo assim, marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondendo a regiões expressas ou não do genoma). A revolução neste plano se iniciou com o descobrimento e utilização de marcadores isoenzimáticos a partir do ano de 1959, ampliando vastamente o número de marcadores genéticos e possibilitando a aplicação da técnica praticamente todas as espécies de plantas e animais (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Os marcadores isoenzimáticos são formas distintas de uma mesma enzima, que não precisam estar num mesmo indivíduo, com função catalítica idêntica ou similar que diferem entre si pela a seqüência de aminoácidos. O princípio básico da técnica consiste

na utilização de eletroforese em gel e na visualização da atividade enzimática por meio de métodos histoquímicos. Trata-se de uma técnica de fácil manipulação, ainda muito utilizada, custo relativamente baixo, e que permite analisar vários sistemas isoenzimáticos e grande número de indivíduos. Os marcadores isoenzimáticos são do tipo co-dominantes. Apresentam como propriedade mais expressiva, a base genética simples envolvida ligada a essas enzimas (SOLTIS; SOLTIS, 1989), entretanto com limitações na cobertura reduzida dos genomas investigados, devido ao pequeno número de locos que podem ser detectados, e o baixo nível de polimorfismo identificado por loco (ALFENAS, 1998; BORÉM; CAIXETA, 2006).

Outro marcador molecular desenvolvido foi o RFLP – “*Restriction Fragment Length Polymorphism*” (polimorfismo no tamanho de fragmentos de restrição). O desenvolvimento dessa técnica só foi possível a partir de descobertas das enzimas de restrição na década de 60. Esse marcador possibilitou detectar diferenças entre indivíduos por meio de cortes no DNA estudado. Com esta técnica, o DNA genômico de um indivíduo pode ser isolado e digerido com enzimas de restrição, os fragmentos obtidos são separados em um gel num processo denominado eletroforese, gerando fragmentos de tamanho e número variáveis que evidenciam o polimorfismo genético. Os fragmentos são transferidos para uma membrana de náilon ou nitrocelulose – técnica denominada “*Southern blot*”. A próxima etapa consiste na hibridização do DNA das amostras já imobilizadas em membranas, com uma sonda radioativa de DNA complementar ao fragmento de interesse. A última etapa é a auto-radiografia, ou seja, exposição da membrana hibridizada com a sonda radioativa a um filme de raios-X, revelando a presença de bandas, que são os marcadores RFLP (HELENTJARIS et al., 1986). Uma das principais vantagens desse marcador é a sua expressão co-dominante, que permite distinguir indivíduos homocigóticos de indivíduos heterocigóticos, outra vantagem que merece destaque é a possibilidade de utilização de sondas heterólogas, permitindo o mapeamento comparativo entre as espécies. As principais desvantagens são o trabalho que envolve a execução das várias etapas, o alto custo e o uso de radioatividade (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Com o desenvolvimento de uma tecnologia simples e eficiente que automatizou a reação em cadeia da polimerase – PCR “*Polymerase Chain Reaction*” pelo

pesquisador Kary Mullis permitiu uma revolução na biologia molecular e conseqüentemente no desenvolvimento e aplicação de marcadores moleculares, tais como RAPD, STS, SCARS, AFLP, SNPs e microssatélites. Através deste processo é possível multiplicar “*in vitro*” e em escala exponencial cópias de um segmento específico de DNA, na presença da enzima DNA polimerase (MULLIS; FALLOONA, 1987).

O RAPD – “*Random Amplified Polymorphic*” DNA (DNA polimórfico amplificado arbitrariamente) – é basicamente uma variação do protocolo de PCR, difere em duas características, utiliza um *primer* único e menor ao invés de um par de *primers* e este tem seqüência alvo desconhecida. Esta técnica permite a detecção de fragmentos aleatórios de DNA. Em relação aos RFLPs, os RAPDs são mais baratos, requerem pouco tempo e não necessitam de radioisótopos, entretanto são marcadores dominantes, ou seja, não é possível distinguir os genótipos dos heterozigotos, e conseqüentemente não é possível se estimar a freqüências alélicas e genotípicas de um determinado loco, a não ser que se assuma equilíbrio de Hardy-Weinberg para aquele loco e população. Outra desvantagem deste marcador é que se trata de uma técnica muito sensível e que, portanto, não possui reprodutibilidade entre laboratórios (WILLIAMS, 1990).

AFLP – “*Amplified Fragment Length Polymorphisms*” (polimorfismos de comprimento de fragmentos amplificados) são marcadores moleculares desenvolvidos por Zabeu (1993); cuja técnica combina a digestão de fragmentos de DNA com enzimas de restrição de corte raro e enzimas de corte freqüente e a amplificação desses fragmentos por PCR (VANTOAL et al., 1996). Assim sendo, o DNA de um indivíduo é clivada com uma combinação de duas enzimas, uma de corte raro, outra de corte freqüente e esses fragmentos após serem clivados são ligados às extremidades dos adaptadores específicos de cada enzima de restrição, que servem de sítios de ligação dos *primers* para posterior reação de PCR; os produtos dessa amplificação são separados em gel de poliacrilamida desnaturante e o polimorfismo é identificado pela presença ou ausência de bandas (VOS et al., 1995). Os marcadores AFLP também são dominantes. Contudo, apresenta como vantagens a visualização em um único gel de um grande número de fragmentos gerados, proporcionando uma amostragem ampla e simultânea de um genoma, grande poder de detecção de variabilidade genética, e

apresentam maior robustez e reprodutibilidade quando comparado com marcador RAPD.

Os marcadores moleculares os SNPs – “*Single Nucleotide Polymorphisms*” (polimorfismo de um único nucleotídeo) são mais recentes. Os SNPs são alterações de uma única base no genoma, ocorrendo a cada 600 pares de bases aproximadamente, quando se compara segmentos correspondentes do genoma entre indivíduos da mesma espécie. Esses polimorfismos ocorrem quando há substituições de um único nucleotídeo A, C, G, T em uma determinada posição do genoma com frequência alélica mínima de 1% em uma população (BROOKES, 1999). Os SNPs são, portanto, marcadores genéticos baseados na detecção de polimorfismos resultantes de alterações de nucleotídeos, que devido à frequência em que ocorrem são considerados importantes ferramentas para obtenção de mapas genéticos de alta resolução. A via direta para identificação de SNP é o seqüenciamento de fragmentos de DNA, amplificados por PCR, com *primers* desenhados para este fim. A identificação também pode ser feita por análise eletrônica de variação pontual (KWOK, 2001).

2.1.4 Marcadores moleculares microssatélites e genética de populações

Microssatélites, também conhecidos como sequências de repetição simples – “*Simple Sequence Repeats*” (SSR), ou repetições curtas em “*tandem*” – “*Short Tandem Repeats*” (STR), são regiões de DNA repetitivo não codificantes compostos por pequenos motivos de um a seis nucleotídeos repetidos em “*tandem*”, que são encontrados em quase todos os genomas de procaríotos e eucariotos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; TOTH; GASPARI; JURKA, 2000; ZANE; BARGRLLONI; PATARNELLO, 2002). Estão presentes em regiões codificantes e não-codificantes e geralmente são caracterizados por um alto grau de polimorfismo. São muito utilizados como marcadores moleculares por possuírem um atributo particular que é ter uma alta taxa de mutação quando comparados com o restante do genoma (JARNE; LAGODA, 1996).

A forma como se originam e a dinâmica de mutação dos microssatélites no genoma dos organismos ainda é incerta (SCHLOTTERER, 2000), entretanto sabe se

que a taxa de mutação dos microssatélites é muito alta quando comparada com outras partes do genoma, variando de 10^{-6} a 10^{-2} nucleotídeos por loco por geração (SIA et al., 2000). Muitos mecanismos já foram sugeridos para explicar as altas taxas de mutação dos microssatélites, incluindo erros durante a recombinação, “*crossing-over*” desigual e “*slippage*” da DNA polimerase durante a replicação ou reparo do DNA (STRAND et al., 1993). Sobre as teorias da dinâmica de mutação dos microssatélites duas são mais aceitas e dizem que essa pode estar associada ao sistema de reparo pela DNA polimerase ou ainda, ser consequência do processo de recombinação (SCHLOTTERER; TAUTZ, 1992; FIELD; WILLS, 1996). Durante o processo de recombinação o “*crossing-over*” desigual pode ser responsável pela alta taxa de polimorfismo destes marcadores, que por problemas no pareamento dessas seqüências durante o quiasma, aumenta a taxa de mutação das regiões microssatélites e são estas mutações que tornam estes marcadores tão informativos (STRAND et al., 1993; SCHLÖTTERER et al., 1998). Já sobre mutações ligadas a eventos de “*slippage*”, ou deslizamento da DNA polimerase durante a replicação, acredita-se que na replicação de uma região repetitiva, as fitas de DNA separam-se e une-se novamente de forma incorreta, o que geraria cópias de trechos de DNA (alelos) com diferentes tamanhos ou números de repetições de um determinado motivo no próximo ciclo de replicação, por meio da inserção ou deleção de uma unidade de repetição. Esse tipo de evento possivelmente gera alta taxa de mutação dos microssatélites, numa freqüência de 10^{-4} e 10^{-3} por loco e por gameta em cada geração (SCHLOTTERER; TAUTZ 1992; SCHLOTTERER, 2004).

O polimorfismo de um loco microssatélite é resultado do número de repetições do motivo que o caracteriza. Portanto, os diferentes alelos que um loco microssatélite pode apresentar distinguem-se uns dos outros pelo número de repetições dos motivos microssatélites. Um loco microssatélite homocigoto tem o mesmo número de repetições em ambos os cromossomos homólogos, entretanto um loco heterocigoto tem um número de repetições do motivo para cada alelo de cada cromossomo homólogo. Por exemplo, um alelo pode ter nove repetições e outro dez (OLIVEIRA et al., 2006). O número de repetições é um fator crucial para determinar a dinâmica evolutiva do DNA microssatélite, e por isso é importante conhecer quais parâmetros influenciam o comprimento das repetições.

Os microssatélites são classificados conforme a composição das seqüências repetidas: (a) repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção, por exemplo: GTGTGTGTGTGTGT; (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 adjacentes, por exemplo: GTGTGTGTGTGTTCACACACACACA (BORÉM; CAIXETA, 2006).

Apesar das seqüências microssatélites variarem de um indivíduo para outro, as seqüências de DNA que as flanqueiam são bastante conservadas entre indivíduos da mesma espécie. Conhecendo essas regiões é possível desenhar *primers* (iniciadores) capazes de amplificar, através de PCR, as regiões adjacentes e as que contêm os microssatélites. Os produtos de amplificação podem ser visualizados em gel de poliacrilamida desnaturante ou não desnaturante, em gel de agarose de alta resolução ou por meio de *primers* fluorescentes em seqüenciador automático. O polimorfismo entre bandas é decorrente dos tamanhos diferentes entre as seqüências repetitivas (SOUZA, 2001; BORÉM; CAIXETA, 2006). Esses marcadores são, portanto, facilmente detectados através de PCR, produzindo resultados altamente reprodutíveis se comparado a outros tipos de marcadores moleculares (TAUTZ; TRICK; DOVER, 1986; WRIGHT; BENTZEN, 1994; O'CONNELL; WRIGHT, 1997).

Os microssatélites são marcadores moleculares úteis em um grande número de análises. Sua aplicação vai desde o mapeamento gênico a estudos forenses, abrangendo áreas de estudo como a da genética de populações e conservação e manejo de recursos naturais (JARNE; LAGODA, 1996). São marcadores ideais para estudos de genética e evolução de populações devido ao alto poder discriminatório, à robustez, confiabilidade, praticidade operacional e por serem mais informativos geneticamente (SLATKIN, 1995).

Além disso, apresentam as seguintes características, que fazem com que seja preferencialmente escolhido como marcador molecular: são marcadores co-dominantes; são amplamente distribuídos no genoma dos eucariotos; são multialélicos; são facilmente amplificados via PCR; e os *primers* uma vez desenvolvidos, podem ser facilmente compartilhados entre laboratório (SCHLÖTTERER, 2004).

Contudo o emprego da tecnologia envolve algumas limitações, como o grande trabalho para o desenvolvimento dos *primers* específicos para os locos microssatélites de cada espécie. Entretanto, pelo fato das sequências que flanqueiam os microssatélites serem altamente conservadas, os mesmos *primers* obtidos para uma espécie podem ser utilizados para outras espécies relacionadas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

O desenvolvimento de marcadores microssatélites para espécies do grupo dos lepidópteros é extremamente difícil por razões não compreendidas. Entretanto novas descobertas demonstraram que muitas seqüências de microssatélites de lepidópteros existem em múltiplas cópias no genoma, e possuem regiões flanqueadoras iguais ou quase semelhantes. Essas descobertas forneceram uma convincente explicação para a baixa eficiência de isolamento de microssatélites em lepidópteros, e também deram luz para o entendimento da dinâmica evolutiva das sequências microssatélites nesse grupo de insetos (ZHANG, 2004). A abundância de microssatélites encontrada em genomas de lepidópteros é considerada baixa, quando comparada com outros grupos taxonômicos. Dentre 20 trabalhos reportados em literatura que foram feitos o isolamento de locos microssatélites, em 80% dos casos não mais do que cinco locos polimórficos foram encontrados (ZHANG, 2004; JI; ZHANG, 2004). Além disso, é importante o fato de que a eficiência de clonagem também é baixa. Enquanto que a eficiência foi de 14% para a clonagem de sequências contendo microssatélites em *Locusta migratória* (L.), para *H. armigera* essa eficiência foi em torno de 2,5% (JI, 2003; ZHANG, 2003). Esses resultados mostram a baixa freqüência de microssatélites nos genomas de lepidópteros. O isolamento de locos microssatélites em lepidópteros também é complicado por causa da ocorrência de famílias de DNA microssatélites. Essas famílias possuem as regiões flanqueadoras semelhantes (NEVE; MENGLÉZ, 2000), e na maioria dos casos essas regiões possuem DNA repetitivo. A associação de microssatélites com regiões flanqueadoras que possuem DNA repetitivo parece ser característica dos microssatélites de lepidópteros (JI; ZHANG, 2004). Contudo, em estudo de genética de populações, apenas a ocorrência de microssatélites cópia-única é usada para acessar o polimorfismo de populações naturais. Isso determina conseqüentemente, que as regiões flanqueadoras dos microssatélites isolados devem ser únicas no genoma do organismo estudado. Sendo assim, os microssatélites de lepidópteros são considerados

redundantes, pois as várias regiões flangeadoras semelhantes podem ser amplificadas utilizando um mesmo conjunto de *primers* desenvolvidos para acessar apenas um loco microsatélite. As conclusões a respeito das características dos locos microsatélites de lepidópteros (baixa frequência e alta redundância) são as de que os microsatélites estão em estágios iniciais de evolução, e que muitas dessas seqüências experimentaram eventos recentes de propagação e multiplicação. Portanto, as regiões flangeadoras dos microsatélites de lepidópteros ainda não acumularam mutações suficientes para promover a diferenciação dessas regiões, resultando baixa proporção de microsatélites únicos (ZHANG, 2004).

Em estudos de genéticas de populações, a escolha do marcador determina o grau de resolução das suas análises de variabilidade genética e estrutura populacional. Dentre as possibilidades de marcadores moleculares, hoje os microsatélites são amplamente utilizados por permitir esse grau de resolução, e tem sido amplamente utilizados em estudos de populações de pragas-alvo do controle de plantas transgênicas e no contexto do manejo integrado de pragas (COATES; HELLMICH; LEWIS, 2005; JI, 2003; SCOTT et al., 2006).

Uma população, sob o ponto de vista genético, é definida como um conjunto de indivíduos de uma mesma espécie, que compartilham o mesmo pool gênico, isto é, indivíduos que compartilham seus genes através de reprodução (FALCONER; MACKAY, 1989). Em genética de populações os parâmetros utilizados para descrever uma população são: as frequências alélicas e genotípicas, que se referem, respectivamente, à quantidade observada de um determinado alelo frente ao total de alelos da população e a quantidade observada de indivíduos com um determinado genótipo frente ao total de indivíduos da população, as heterozigosidades esperada (H_E) e observada (H_O) e a diversidade genética, que é medida da variabilidade genética da população, que permitem identificar os alelos e identificar o número de indivíduos heterozigotos, bem como a quantidade de indivíduos homozigotos diferentes (WEIR, 1996). Esses parâmetros além de descrever populações individuais são necessários para se estudar a variabilidade genética entre populações e como essa variabilidade está estruturada no espaço. 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). Além disso, as mudanças e distribuição das freqüências alélicas entre as populações de uma espécie determinam o grau de estruturação da variabilidade genética existente. Sendo assim os fatores que determinam a estruturação são: deriva genética, migração, mutação, seleção, sistema reprodutivo e número de gerações (HARTL, 2008).

O entendimento da estrutura genética e do fluxo gênico intra-específico entre populações e subpopulações de uma determinada espécie de inseto-praga é essencial para se delinear melhores de práticas de manejo com o objetivo de retardar a evolução da resistência a qualquer tática de controle de insetos, uma vez que é por meio dos eventos de migração que os alelos que conferem resistência são rapidamente distribuídos entre as populações de um inseto-praga (CAPRIO; TABASHNIK, 1992; TABASHNIK, 1991). Portanto a escolha do marcador molecular microssatélite foi feita baseada nas suas características únicas e no seu grau de resolução que melhor irá responder os questionamentos que irão auxiliar nos estudos sobre evolução da resistência.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Coleta das populações

As populações de *A. argillacea* foram coletadas nas regiões produtoras de algodão no Brasil, em quatro estados sobre a variedade comercial cultivada (*Gossipium hirsutum* L.), e também foram coletados indivíduos em *G. hirsutum* L. var. Maria Galante, que é uma variedade selvagem de algodão, comumente conhecido como algodão arbóreo ou mocó. Nas coletas, preferencialmente foram amostrados formas larvais ou então pupas do inseto. As coletas foram realizadas buscando a máxima variabilidade possível. Os pontos de amostragem da praga foram distribuídos dentro de cada região de coleta. Esses indivíduos foram armazenados adequadamente, juntamente com o substrato para alimentação para lagartas, e foram trazidos para o Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas, Departamento de Entomologia e Acarologia, ESALQ-USP. Os insetos provenientes de cada localidade foram criados em

laboratório de acordo com a metodologia descrita a seguir (item 2.2.2) e foram utilizados tanto para a caracterização da linha-básica de suscetibilidade à toxina Cry1Ac quanto para o estudo de variabilidade, estrutura genética e fluxo gênico da espécie no Brasil. As regiões de coleta, a identificação de cada população, o local (município) de origem e a data de coleta estão expressos no Quadro 1.

Região	População	Município	Coordenadas Geográficas	Data de Coleta
Bahia	BA-1	Barreiras	44°59'32,9"O 12°08'53,4"S	13/02/2008
	BA-2	Luis Eduardo Magalhães	45°47'53,7"O 12°05'57,9"S	24/02/2008
	BA-3	Roda Velha	45°49'23,2"O 12°41'36,9"S	17/03/2008
Goiás	GO-1	Montevidiu	51°08'27,9"S 17°29'11,9"O	17/03/2008
Mato Grosso	MT-1	Campo Verde	55°09'58,6"S 15°32'44,0"O	26/06/2008
Mato Grosso do Sul	MS-1	Chapadão do Sul	52°36'59,4"S 18°46'44,0"O	17/03/2008
Bahia	BA-4	São Desidério	44°59'03,2"S 12°21'07,6"O	05/03/2009
Goiás	GO-2	Cristalina	47°36'45,4"S 16°17'00,2"O	16/03/2009
Mato Grosso	MT-2	Rondonópolis	54°40'09,3"S 16°42'07,5"O	12/03/2009
	MT-3	Primavera do Leste	54°17'58,5"S 15°33'34,9"O	18/03/2009
Mato Grosso do Sul	MS-2	Chapadão do Sul	52°38'34,7"S 18°46'24,0"O	25/03/2009
Paraíba	PB-1	Campina Grande	35°52'56,3"S 07°13'51,6"O	13/09/2009

Quadro 1 – Identificação das populações de *Alabama argillacea* amostradas nas diferentes regiões, municípios, coordenadas geográficas e datas de coleta

2.2.2 Criação em laboratório

Os adultos de *A. argillacea* foram criados em laboratório, em gaiolas de PVC revestidas com papel sulfite, que foi utilizado com substrato para postura, e alimentados com solução de mel 30%. As gaiolas permaneceram em sala climatizada regulada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa (UR) acima de 60% e fotofase de 14h. A cada dois dias foi feita a troca das gaiolas, da solução de mel, e a separação das posturas. Essas posturas foram colocadas em recipientes plásticos de 10 ml com tampa juntamente com papel filtro umedecidos e acondicionados em câmara climatizada regulada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa (UR) 60% e fotoperíodo de 14:10 (claro:escuro) até a eclosão das lagartas. As lagartas neonatas foram transferidas para placas de Petri de vidro, juntamente folhas novas de algodão (cultivar Delta Opa) e permaneceram nesses recipientes até a fase de pupa. Para cada população foram separadas em torno de dez placas de Petri com aproximadamente 10 lagartas por placa, sendo que nos estádios larvais mais próximos do estágio de pupa, foram deixadas em torno de cinco lagartas por placa. As folhas de algodão foram trocadas e as placas limpas a cada dois dias nos primeiros instares, e todos os dias após o terceiro instar até a fase de pupa. Essas placas foram acondicionadas em sala climatizada regulada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa (UR) 30% e fotofase de 14h até as lagartas se tornarem pupas. As pupas foram separadas do restante das lagartas e colocadas sobre vermiculita, em placas de Petri, e foram acondicionadas em sala climatizada, regulada para umidade relativa (UR) para 60%, sendo que a vermiculite foi umedecida a cada dois dias. Uma parte das lagartas (10%) foi utilizada para a manutenção das populações, e o restante e foi utilizada para a realização dos bioensaios de caracterização da linha-básica de suscetibilidade e validação da concentração diagnóstica.

2.2.3 Caracterização da suscetibilidade de *Alabama argillacea* à toxina Cry1Ac.

2.2.3.1 Linha-básica de suscetibilidade

As caracterizações da linha-básica de suscetibilidade das populações de *A. argillacea* (Quadro 1) foram realizadas por meio de bioensaios de imersão de discos de folhas de algodão em soluções contendo toxina Cry1Ac, obtida a partir do biopesticida MVP II (Dow Agrosiences, San Diego, EUA), e 0,1% do agente surfactante Triton X-100. Os discos, após a imersão nas diferentes concentrações, foram colocados em placas de acrílico de 12 células de 2,0 cm de diâmetro (Costar, Cambridge, Massachusetts, EUA) contendo no fundo 500 µL de solução de ágar 2,5% e sobre essa camada, disco de papel de filtro. Após a secagem da toxina foi realizada a transferência de uma lagarta neonata (24 h após eclosão) de *A. argillacea* em cada célula. As lagartas do tratamento testemunha foram dispostas sob o mesmo substrato sem a presença da toxina. Para cada concentração foram utilizadas aproximadamente 96 lagartas neonatas, divididas em oito repetições. Essas placas foram fechadas com filme plástico e esse foi perfurado com alfinete entomológico para haver trocas gasosas entre as células e o ambiente da câmara climatizada, a fim de evitar o acúmulo de água dentro de cada célula (Figura 1). Essas placas foram mantidas em câmara climatizada regulada a $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 14 h. Os bioensaios foram avaliados cinco dias após a transferência das lagartas. Os critérios de resposta avaliados foram a mortalidade e a inibição de crescimento.

A mortalidade foi observada pela constatação visual das condições diagnóstico-toxicológicas características da toxina, que são: não desenvolvimento das lagartas, ou seja, não ultrapassam o primeiro instar, as lagartas apresentam sinais de dessecação e as folhas contendo a toxina não apresentam sinais de consumo. As concentrações utilizadas foram definidas a fim de compreender as porcentagens de mortalidade entre o intervalo de 5 a 95%. Os dados de mortalidade obtidos com os bioensaios foram submetidos à análise de regressão utilizando o modelo de Probit, por meio do programa PoloPlus (LeOra Software, 2002) e as estimativas dos seguintes parâmetros foram obtidas: CL_{50} e CL_{95} (Concentração Letal capaz de causar mortalidade em 50% e 95%

da população, respectivamente); intervalo de confiança a 95% (IC 95%) das concentrações letais; o coeficiente angular (\pm erro padrão) da regressão de Probit. Para a comparação das linhas-básicas obtidas foram comparados os limites dos intervalos de confiança a 95% (IC 95%) das CL_{50S} e CL_{95S} estimadas para cada população. As estimativas foram consideradas significativamente diferentes ($p < 0,05$) quando os IC 95% não se sobrepuseram. O teste de igualdade e paralelismo de retas, que compara os valores de coeficiente angular (parâmetro β) e os valores de intercepto das retas no eixo Y (parâmetro α) entre as retas obtidas com a regressão de Probit, foi utilizado para confirmar as diferenças estatisticamente com um nível de significância. As retas foram consideradas não paralelas se os valores de β apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$). Já as retas foram consideradas diferentes se os valores de α e de β foram significativamente diferentes ($p < 0,05$). Contudo as retas foram consideradas significativamente diferentes se o teste de hipótese H_0 tanto para o paralelismo, quanto para o de similaridade foram rejeitados.

Para a avaliação da inibição de crescimento, foram obtidos os valores de peso agrupando as lagartas sobreviventes em cada tratamento, de cada repetição. Para os dados de peso médio foi realizado análise de regressão não-linear utilizando o modelo de regressão logístico não-linear seguinte: $\text{peso} = W_0 / [1 + (\text{concentração} / EC_{50})^B]$, onde W_0 é o peso esperado da testemunha, concentração é a quantidade de toxina Cry1Ac por ml de água, EC_{50} é a concentração efetiva capaz de reduzir 50% do peso da lagarta e B parâmetro de angulação da função logística (SIMS; BERBERICH, 1996). Para o cálculo da EC_{99} e seu respectivo intervalo de confiança (IC 95%) a seguinte equação modificada foi utilizada: $\text{peso} = W_0 / [1 + (100-1)(\text{concentração} / EC_{99})^B]$. Através desse modelo foi possível obter as estimativas dos parâmetros EC_{50} e EC_{99} e seus respectivos intervalos de confiança a 95% de probabilidade (IC_{95}).

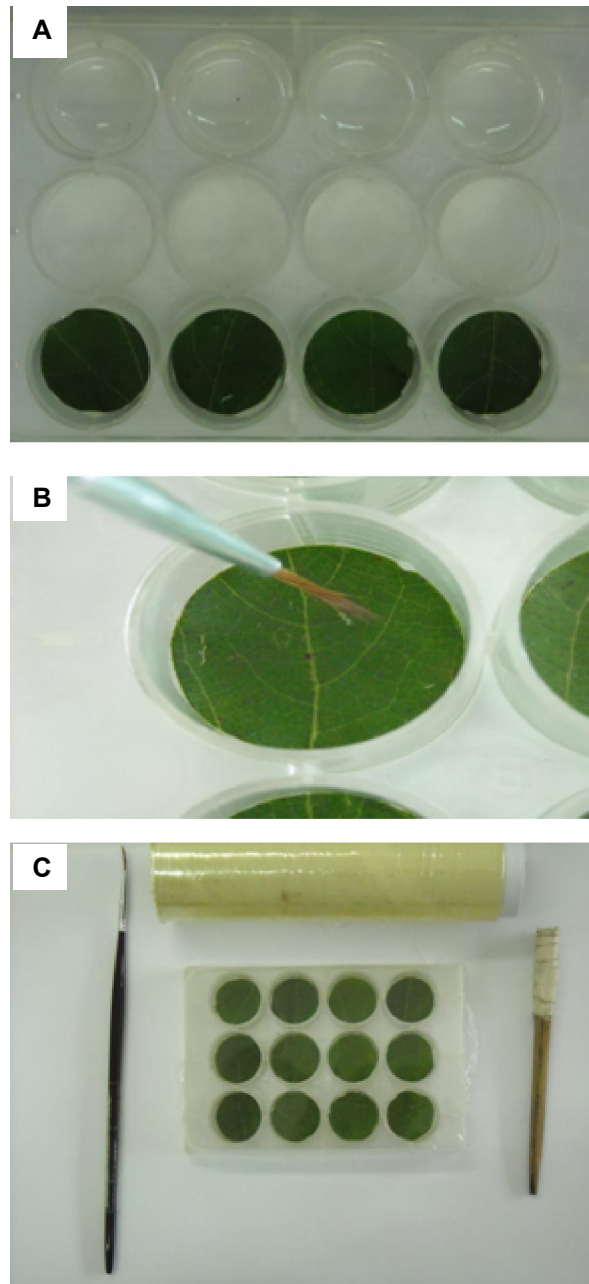


Figura 1 – A) Preparo das placas para bioensaio de imersão de discos de folhas: células contendo 500 μL de solução de ágar a 2,5%; camada de papel filtro sobre a camada de ágar; discos de folhas que foram imersos em soluções de Cry1Ac (μg de I.A. / ml de água); B) transferência de lagartas de *A. argillacea* para cada célula após a secagem da solução contendo toxina Cry1Ac; e C) material utilizado para a realização do bioensaio de imersão de discos de folhas: a) pincel para a transferência das lagartas; b) filme plástico para selagem das placas

2.2.3.2 Determinação e validação da concentração diagnóstica para o monitoramento da suscetibilidade

As duas abordagens para a caracterização da suscetibilidade permitiram determinar as concentrações diagnósticas que foram utilizadas no monitoramento da suscetibilidade de *A. argillacea* à toxina Cry1Ac. Foi feita uma regressão de Probit agrupando todos os dados obtidos com as caracterizações das linhas-básicas de suscetibilidade das populações da safra agrícola de 2007/2008. As estimativas dos parâmetros: CL₅₀, CL₉₅ e CL₉₉ (concentração letal de 50, 95 e 99%, respectivamente), intervalo de confiança a 95% (IC 95%) para cada concentração letal e o coeficiente angular (\pm erro padrão) da regressão de Probit também foram obtidas (item 2.2.3.1). Foi feita a comparação dos resultados obtidos com a caracterização da linha-básica de suscetibilidade com os dados obtidos com a regressão para o modelo de resposta de inibição de crescimento.

Os procedimentos de bioensaio foram os mesmos utilizado para a caracterização da linha-básica de suscetibilidade, Foram testadas aproximadamente 500 lagartas neonatas, divididas em repetições de 12 lagartas. Foram estimados a porcentagem de mortalidade em cada repetição e a média dessa estimativa e seu respectivo erro padrão em cada população estudada.

2.2.4 Desenvolvimento e caracterização dos microssatélites

2.2.4.1 Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA foi realizada com adultos provenientes de lagartas coletadas no campo. Esses adultos foram armazenados a -20°C até o momento da extração de DNA. Para a extração do DNA foi utilizado o protocolo CTAB descrito por Doyle e Doyle (1990) com modificações. O DNA foi extraído a partir do tórax de indivíduos adultos de *A. argillacea* macerados da seguinte maneira: (1) Em tubos plásticos de tipo

“Eppendorff’s” de 1,5 mL identificados foi adicionado um tórax, devidamente separado do restante do corpo; (2) foram adicionados 500 μ L de tampão de extração CTAB pré-aquecido, os tubos foram fechados e agitados para ressuspender o tecido no tampão; (3) foram levados ao banho-maria (65°C) por 60 minutos, agitando-os manualmente a cada 10 minutos; (5) após serem retirados do banho-maria e com a mistura em temperatura ambiente foram adicionados 700 μ L de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e os tubos foram agitados por 10 minutos invertendo-os no mínimo 20 vezes até fazer uma emulsão homogênea; (6) os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 12000 rpm; (7) o sobrenadante foi transferido para novos tubos também marcados; (8) foram adicionados 2,5x do volume do volume da solução (\approx 1500 μ l) de isopropanol gelado, que foi misturado suavemente ao sobrenadante que estava no tubo e esse foi deixado em repouso, por 60 minutos, a -20°C, para formar um precipitado; (9) os tubos foram centrifugados durante 10 minutos a 12000 rpm; (10) suavemente foi descartado o máximo de sobrenadante invertendo os tubos sem perder o pélete; e após a secagem do precipitado à temperatura ambiente; (11) foram adicionados 300 μ L de etanol 70% (v/v) para lavar o precipitado, deixando-o imerso por 5 a 10 minutos, invertendo-o suavemente; (12) os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 12000 rpm; (13) foi retirado o máximo do etanol sem perder o pélete; (14) foi adicionado novamente 300 μ L de etanol 70% (v/v) para lavar o precipitado, invertendo-o suavemente; (15) os tubos foram centrifugados durante 5 minutos a 12000 rpm; (16) foi retirado o máximo do etanol e o pellet secou em temperatura ambiente; (17) cada precipitado foi dissolvido em 50 μ L de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 8,0) acrescido de 1% RNase (10mg/mL) e deixando-se sobre a bancada no decorrer da noite. As amostras foram então armazenadas a -20°C.

A quantidade de DNA presente em cada amostra foi estimada pela intensidade de fluorescência emitida pelo corante Sybr Safe[®] (Invitrogen) sob UV em géis de agarose a 0,8% (p/v). Essa intensidade foi comparada a de padrões com pesos moleculares e concentrações específicas e conhecidas de DNA (DNA do fago λ).

2.2.4.2 Construção de biblioteca genômica enriquecidas em microssatélites

Para a construção da biblioteca genômica enriquecida em microssatélites foram utilizados DNA do tórax de dois indivíduos adultos de *Alabama argillacea* que foi extraído utilizando o protocolo descrito anteriormente. O protocolo utilizado para a construção da biblioteca foi o descrito por Billotte et al. (1999), com modificações. Inicialmente foi feita a digestão do DNA genômico utilizando enzima de restrição. A digestão de aproximadamente 30,0 µg de DNA (1000 ng/µL) foi feita utilizando 5,0 µL enzima RsaI (10 U/ µL). Foram adicionados na reação 10,0 µL de tampão de reação (50 mM Tris-HCL, p H7,8; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 25 µg/ml BSA), 10,0 µL de espermidina (40mM) e água milliQ autoclavada para completar 100 µL. O material foi incubado a 37° C por 6 horas.

Em seguida foi realizada a ligação dos adaptadores. Os adaptadores *Rsa21* (5' – CTC TTG CTT ACG CGT GGA CTA – 3') e *Rsa25* (5' – TAG TCC ACG CGT AAG CAA GAG CAC A – 3') foram ligados aos fragmentos digeridos de extremidade abrupta com a enzima T4 DNA ligase. Para isso foram utilizados 1,5 µL do adaptador *Rsa21* (10 µM) e 1,5 µL do adaptador *Rsa 25* (10 µM), 5,0 µg do DNA genômico digerido, 5,0 µL do tampão 5X (50 mM Tris-HCL, pH7,8; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 25 µg/ml BSA), 2,0 µL de T4 DNA ligase (1U / µL) e água milliQ autoclavada para completar 25,0 µL. Esta reação foi incubada a 20°C por 2 horas.

Após a ligação dos adaptadores foi realizada uma reação de amplificação para gerar uma maior quantidade de DNA para a seleção. Os fragmentos foram amplificados utilizando 5,0 µL do produto da ligação; 2,0 µL do *primer* *Rsa21* (10 µM), 5 µL de tampão 10 X (50 mM KCl; 10 mM de Tris-HCl pH 8,9); 1,5 µL de MgCl₂ (50, mM); 4 µL (2,5 mM) de dNTP) 5,0 µL (3U) de Taq polimerase e água milliQ autoclavada para completar 50,0 µL. Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 4 minutos, seguida de 20 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, e uma etapa de extensão de 72°C por 8 minutos foi adicionado após o último ciclo. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o Kit “Qiaquick PCR purification kit” (Qiagen).

A seleção dos fragmentos contendo seqüências ricas em GA/CT, AT/TA e CA/GT foi feita por meio de hibridização com sondas biotiniladas, biotina - III(CT)₈ e biotina - III(GT)₈ e recuperados com estreptavidina ligadas a “beads” magnéticas utilizando o kit Streptavidine-Magnisphere da Promega (Promega, USA). Para realização das lavagens, as esferas magnetizadas foram atraídas por um ímã posicionado lateralmente ao tubo em um suporte. A fração enriquecida contendo os fragmentos de DNA previamente ligados aos adaptadores foi incubada a 95°C por 15 minutos para a desnaturação da dupla fita. Ao DNA desnaturado foram adicionados 3 µL de cada oligonucleotídeo marcado com as biotinas. Esta solução de hibridização foi incubada a temperatura ambiente sob constante agitação e após 20 minutos foi adicionada às esferas magnetizadas previamente lavadas seguindo as recomendações do fabricante. A suspensão contendo as esferas magnetizadas e o complexo DNA-sonda foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente sob suave agitação. Após a incubação, foram realizadas lavagens conforme descrito por Billotte et al. (1999) e os fragmentos selecionados foram recuperados através de lavagem com 250 µL de água milliQ autoclavada.

Após a seleção dos fragmentos enriquecidos, estes foram submetidos a uma PCR utilizando como *primer* o adaptador Rsa21. A amplificação foi realizada utilizando 20 µL do produto da ligação; 4,0 µL do primer Rsa21 (20 µM); 10 µL de tampão 10 X (50 mM KCl; 10 mM de Tris-HCl pH 8,9); 4,0 µL de MgCl₂ (2,0 mM); 8 µL de dNTP (2,5 mM), 5U de Taq polimerase (Invitrogen) e água milliQ autoclavada para completar 100,0 µL. Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos de 94°C por 40 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. Um passo prolongado de extensão de 72°C por 5 minutos foi adicionado após o último ciclo.

Em seguida, 3 µL dos produtos da PCR foram ligados a 1 µL do vetor pGEM-T (kit Promega), segundo o protocolo fornecido com o vetor plasmidial, e foram transformados em XL1-Blue SuperCompetent. As células transformadas foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina (100 µg/ml), 60 µL IPTG (24 mg/ml) e 60 µL X-Gal (20 mg/ml). As placas foram incubadas invertidas a 37 °C por 18 horas em estufa para o crescimento de colônias.

Os clones positivos (colônias brancas) foram selecionados com a ajuda de palitos estéreis. Cada colônia selecionada foi colocada em dos poços de uma placa de ELISA com fundo em U com 80 µL de meio LB contendo ampicilina (100µg/ml). As placas foram incubadas a 37 °C overnight em estufa para o crescimento de colônias. Após esse período as placas foram armazenadas em freezer -20°C por 30 minutos e então foram armazenadas em refrigerador -80°C com glicerol 50% (p/v).

Após o crescimento das colônias foi realizada uma reação de amplificação dos insertos diretamente das colônias obtidas na etapa anterior, utilizando o *primer* Rsa21, com o objetivo e verificar a eficiência do procedimento de enriquecimento e clonagem. Colônias individuais foram transferidas com um palito estéril para o tubo de PCR contendo 30,5 µL de água milliQ autoclavada. Esta suspensão de células foi utilizada em uma reação com volume final de 45,0 µL contendo as seguintes reagentes: 5,0 µL de tampão 10X (50 mM KCl; 10mM de Tris-HCl, pH 8,9), 4,0 µL de MgCl₂ (2,5 mM), 4,0 µL de dNTP (2,5 mM), 2,5 µL de Rsa21 (10 mM), 1,0 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL). Esta reação foi submetida a uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30segundos, 52°C por 45segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos e uma etapa final de extensão a 72°C por 8 minutos. Para controle, 10 µL do volume da reação foram utilizados na eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v).

Com o objetivo de isolar o DNA plasmidial das colônias recombinantes para posterior sequenciamento foi colocado 1 ml de meio Circle Grow contendo 100 µg/ml de ampicilina em cada pocinho da microplaca; foram inoculadas colônias individuais com o auxílio de pipeta multicanal; a placa foi selada com adesivo e furada com o auxílio de uma agulha para aeração durante o crescimento; esta placa foi incubada a 37°C em agitador a 300 rpm durante 22h; o adesivo foi trocado e a placa foi centrifugada por 6 minutos a 3000 rpm, para sedimentar as células; o sobrenadante foi descartado e a placa foi mantida invertida sobre papel absorvente por 1 minuto; foi adicionado a cada pocinho 240 µL de solução GTE [Glicose 20%, Tris 1 M (pH 7,4), EDTA 0,5 M (pH 8,0)], a placa foi selada com adesivo e feita a ressuspensão das células agitando-as no vortex por 2 minutos; a placa foi centrifugada por 6 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante foi descartado; foi adicionado a cada pocinho 80 µL de GTE, a placa foi selada com

adesivo para etanol e agitada no vortex por 5 minutos; foi transferido 60 μ L de cada suspensão de células para placa com fundo em U contendo 5 μ L de RNase (10 mg/mL); foram adicionados a cada pocinho 60 μ L de NaOH 0,2M – SDS 1% (p/v), a placa foi selada com adesivo e a solução foi misturada 10 vezes por inversão e incubada 10 minutos à temperatura ambiente; após esse período a placa foi centrifugada brevemente; foram adicionados a cada pocinho 60 μ L de KOAc 3 M, a placa foi selada com adesivo e a solução foi misturada 10 vezes por inversão, centrifugada brevemente; o adesivo foi removido e a placa incubada em estufa a 90°C por exatos 30 minutos; a placa foi esfriada em gelo por 10 minutos e centrifugada por 4 minutos a 4000 rpm; foi fixada com fita adesiva uma placa filtro no topo de uma placa de fundo em U, foi transferido todo o volume para a placa filtro, e centrifugada por 4 minutos a 4000 rpm, a 20°C; foi removida a placa filtro e adicionado ao filtrado 110 μ L de isopropanol; a placa foi selada com adesivo e a solução foi misturada 20 vezes por inversão e centrifugada por 45 minutos a 4000 rpm a 20°C; o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e foram adicionados 200 μ L de etanol 70% (v/v) gelado; a placa foi centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm a 20°C, e o sobrenadante descartado; a placa foi invertida sobre papel absorvente, centrifugada invertida por 600 rpm. A placa secou por 60 minutos à temperatura ambiente e o pellet foi ressuscitado em 60 μ L de água milliQ (overnight).

2.2.4.3 Seleção, seqüenciamento dos clones positivos e desenho de *primers*

Os fragmentos contendo clones positivos para SSR foram extraídos das colônias que apresentaram o incerto (colônias brancas) e os plasmídeos foram seqüenciados em seqüenciador automático. Foi realizada uma reação com 1 μ g do plasmídeo, 8 μ L do Big-Dye v.3.1 (Applied Biosystem) e água milliQ para completar 20 μ L. Os cromatogramas, produzidos pelo seqüenciador, foram analisados, a fim de checar a qualidade do seqüenciamento, utilizando o programa CHROMAS 2.2.1 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>).

Os pares de *primers* que flaqueiam as regiões de microsatélites foram desenhados com o auxílio dos seguintes programas: WEBTROLL (<http://www.bioinformatica.ucb.br/troll.html>), utilizado para identificar as regiões de sequências repetitivas, ou seja, regiões que contem os motivos microsatélites repetidos

em tandem nos fragmentos seqüenciados; PRIMER3 (http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www_slow.cgi), que foi utilizado para localizar as regiões que flanqueiam as sequências microssatélites e posteriormente a obtenção de sugestões de *primers* que mais se adéquam aos critérios como: temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos, variando entre 55 e 70 °C, a diferença de temperatura de anelamento entre os pares de *primers* de no máximo de 3 °C e conteúdo GC no mínimo de 50% e máximo de 60%; GENE RUNNER (<http://www.generunner.net/>), utilizado para testar a qualidade dos *primers* pré-selecionados; e novamente o programa CHROMAS 2.2.1 que também foi utilizado para testar a qualidade dos *primers*, contudo este teste é realizado na própria sequência genômica seqüenciada, a fim de observar se os *primers* que foram desenhados acessam uma região que foi bem seqüenciada, permitindo assim ter uma maior certeza sobre a qualidade e precisão desses *primers* obtidos.

2.2.4.4 Amplificações iniciais e otimização dos *primers*

Primeiramente foram feitos testes para se determinar as melhores condições de amplificação dos *primers* desenhados. Esses testes iniciais foram necessários para se determinar a reação e o ciclo de amplificação que puderam ser utilizadas nas otimizações dos *primers*. As amplificações iniciais foram feitas com cinco indivíduos provenientes das populações naturais e 3 *primers* escolhidos ao acaso. Em uma reação de amplificação utilizando um dos *primers* selecionados, para um volume final de 20µL, foram utilizados cerca de 10 ng do DNA genômico; 0,4 µL do *primer forward* (10 µM) e 0,4 µL do *primer reverse* (10 µM); 2,5 µM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato (dNTP); 2,0 µL solução tampão Buffer 10 X (50 mM de KCl; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,9); 2,0 µL de MgCl₂ (2,5 mM); 5,0 µL de BSA (2,5µg / ml) e 1 U de Taq DNA polimerase. As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador MyCycler™ (BIO-RAD, Inc.) programado para uma desnaturação inicial de 2 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos com 1 minuto de desnaturação a 95°C, 1 minuto de anelamento a 60°C e 1 minuto de extensão a 72°C, finalizando com uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Para a determinação das condições ideais de amplificação de cada *primer* sintetizado, as reações foram submetidas a diferentes temperaturas de anelamento. Foi

realizado um teste inicial utilizando quatro temperaturas (48, 52, 56 e 60°C), o mesmo ciclo, para os 23 pares de *primers*, em três indivíduos das populações naturais escolhidos ao acaso. Outros testes também foram realizados para otimização dos *primers* que não apresentaram amplificação no teste com as quatro temperaturas. Esses testes foram realizados submetendo as reações de PCRs com variação de temperatura em gradiente, variação nas concentrações de MgCl₂, DNA e BSA. O objetivo dessas otimizações foi de obter um mínimo de 10 *primers* que acessam locos microssatélites polimórficos. Os produtos da PCR foram observados em géis de agarose a 1,5%. A partir desses resultados foi possível determinar a temperatura de anelamento dos *primers* utilizados para a genotipagem dos locos microssatélites.

2.2.4.5 Caracterização dos locos microssatélites

A caracterização dos locos obtidos nas otimizações foi feita em uma população de campo de *A. argillacea* com aproximadamente 20 indivíduos, escolhida ao acaso, buscando locos altamente polimórficos. Essa caracterização foi feita em géis de poliacrilamida 7% revelados com nitrato de prata, segundo procedimento descrito por Creste e colaboradores (2001). Os dados obtidos após leitura dos géis foram submetidos à análise utilizando o programa MStools, que é um suplemento desenvolvido para Microsoft Excel®, e foi utilizado para estimar as estatísticas descritivas de cada loco como: HO, HE, número de alelos por loco, amplitude alélica e o PIC (Polymorphism Information Content).

2.2.5 Estudo da variabilidade genética e estrutura populacional

2.2.5.1 Genotipagem dos locos microssatélites

Os locos obtidos por meio da otimização e caracterização foram utilizados para a genotipagem dos indivíduos das populações de *A. argillacea* coletadas, para o estudo de genética de populações, em géis de poliacrilamida 7% desnaturante, corado com nitrato de prata (CRESTE; TULMANN NETO; FIGUEIRA, 2001). O tamanho da amostra (N) utilizado foi de aproximadamente 20 adultos de cada população natural coletada. Os

dados de frequência alélica e genotípica de cada loco por população, obtida através das leituras dos géis, foram analisados utilizando os programas computacionais desenvolvido para estudo de genética de populações.

Após a leitura dos géis foi feito um teste utilizando o programa MICRO-CHEKER (VAN OOSTERHOUT et al., 2004) a fim de observar erros de genotipagem e a presença de alelos nulos nos locos utilizados. A constatação de presença de alelos nulos também foi feita através do teste para Equilíbrio de Hardy-Weinberg, onde foi utilizado como critério para definir que um loco possui alelos nulos, quando esse não aderiu às proporções de Equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as populações.

2.2.5.2 Variabilidade genética intrapopulacional

Para as estimativas dos parâmetros descritivos populacionais como: de número médio de alelos por população (n_A), número médio de alelos por loco (A), heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) por loco e as heterozigosidades observadas (H_O) e esperadas (H_E) médias por população, além das estimativas do índice de fixação intrapopulacional médio por loco e por população, foi utilizado o programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2006). Foi feito o teste para equilíbrio Hardy-Weinberg utilizando o teste de aderência (teste exato de Fisher), conforme definido por Weir (1996) utilizando o programa TFGA (MILLER, 1997). O valor de significância foi ajustado realizando a correção de Bonferroni, e para isso foi dividido o valor de alpha a 95% de probabilidade ($\alpha = 0,05$) pelo número de locos (10 locos). Foi realizado o teste de desequilíbrio de ligação entre os locos, ajustando o valor de significância (*p-value*) para o nível nominal 5%, através do programa FSTAT (GOUDET, 2009).

2.2.5.3 Variabilidade interpopulacional e estrutura genética populacional

Para o estudo da variabilidade interpopulacional e estruturação genética de *A. argillacea* no Brasil, inicialmente foram obtidos as estimativas de diversidade e frequência alélica por loco e por população, utilizando o programa FSTAT (GOUDET,

2001). Além disso, foram obtidas as estimativas de alelos exclusivos (ou privados) de cada loco em cada população, utilizado o programa GDA, uma vez que a distribuição desses alelos entre as populações pode indicar a similaridade e determinar o grau de isolamento entre as populações.

As estimativas das estatísticas F de Wright (F_{IS} , F_{ST} e F_{IT}) foram obtidas através do método proposto por Weir e Cockerham (1984) ($F_{IS} \approx f$; e $F_{ST} \approx \theta$), utilizando o programa GDA que assume o modelo aleatório de acordo com Weir (1996), em que as populações amostradas são consideradas como representativas da espécie e com uma história evolutiva comum, e que assume também o modelo de alelos infinitos. Além disso, foram obtidas as estimativas de R_{ST} , que é uma estatística análoga ao F_{ST} de Wright, desenvolvida por Slatkin (1995), mas que assume o modelo de mutação *stepwise* para os locos microssatélites. Também foram obtidas as estimativas de F_{ST} par-a-par, entre as 11 populações (onde $F_{ST} \approx \theta$), utilizando também o programa FSTAT, com o objetivo de observar quais são as contribuições de cada pareamento de populações para a estimativa de F_{ST} total.

Para o cálculo das distâncias genéticas de Nei (1978) e da consistência dos nós dos agrupamentos empregando o procedimento de reamostragem por 10000 *bootstrap* foi utilizado o programa TFPGA. Para a construção dos dendrogramas, a partir das distâncias de Nei (1978) e dos valores de *bootstrap*, e utilizando o critério de agrupamento UPGMA foi empregado o programa NTSYSpc 2.1.

Para aumentar a robustez das análises, também foi utilizada a estatística bayesiana para verificar a estruturação da variabilidade genética e o fluxo gênico entre as populações. Para isso foi utilizado o programa STRUCTURE 2.2 (PRITCHARD et al., 2002). Para a estimativa do número de populações (K) foi utilizado o modelo de ancestralidade “admixture”, com alelos correlacionados (“correlated”) e K variando de um a 16, foi definido a variação de K para cinco agrupamentos a mais do número original de populações. Para cada valor de K foram realizadas cinco interações independentes com 50.000 permutações *burn in* e 500.000 permutações que utilizam o algoritmo Monte Carlo cadeia de Markov (MCMC). Para estimar qual valor de K que se ajusta aos dados, foi utilizado o procedimento descrito por Evanno e colaboradores

(2005). Os gráficos dos resultados do STRUCTURE 2.2, foram editados utilizando o programa DISTRUCT 1.1 (ROSENBERG, 2004).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Caracterização da suscetibilidade de *Alabama argillacea* à toxina Cry1Ac.

2.3.1.1 Linha-básica de suscetibilidade

A CL_{50} estimada para a toxina Cry1Ac para a população de laboratório (LAB) foi de 0,16 μg de Cry1Ac / mL de água, com intervalo de confiança de 95% (IC 95%) de 0,09 – 0,28 e coeficiente angular (\pm erro padrão) de 1,49 (\pm 0,19). A CL_{50} estimada para essa população se deve ao aumento na proporção de indivíduos resistentes, uma vez que essa população não foi exposta à toxina. Isso se deve ao fato de que a população LAB apresenta baixa variabilidade genética e tenha sofrido eventos de depressão endogâmica durante o tempo que está sendo criada em laboratório. Dessa forma, a amplitude de resposta à toxina dessa população foi baixa. Portanto, a caracterização da resposta dessa população ao aumento da toxina serviu de controle permitindo realizar a comparação das respostas das outras populações em relação a uma população de laboratório que não tinha sido exposta à toxina Cry1Ac.

A caracterização da suscetibilidade através das curvas de concentração-resposta permitiu observar a existência de variabilidade natural de até seis vezes na resposta à toxina nas populações coletadas em diferentes locais e estados produtores de algodão (Tabela 1). A CL_{50} estimada para a toxina Cry1Ac na população coletada na Bahia, município de Barreiras (BA-1), foi de 0,96 μg de Cry1Ac / mL de água, IC 95% de 0,58 – 1,63 e coeficiente angular (\pm erro padrão) de 1,62 (\pm 0,21). Já a CL_{50} estimada na população coletada na Bahia, município de Roda Velha (BA-3), foi de 0,45 μg de Cry1Ac / mL de água, com IC 95% de 0,37 - 0,56 e coeficiente angular (\pm erro padrão) de 1,40 (\pm 0,10). Para a população coletada em Mato Grosso, município de Campo Verde (MT-1), a CL_{50} estimada para a toxina Cry1Ac foi de 0,50 μg de Cry1Ac / mL de água, com IC 95% de 0,38 - 0,64 e coeficiente angular (\pm erro padrão) de 1,38 (\pm 0,10). Para a

população coletada em Mato Grosso do Sul, município de Chapadão do Sul (MS-1), a CL_{50} estimada para a toxina Cry1Ac foi de 0,53 μg de Cry1Ac / mL de água, com IC 95% de 0,25 – 0,92 e coeficiente angular (\pm erro padrão) de 1,16 (\pm 0,17). E por fim para a população coletada na Bahia, município de São Desidério (BA-4), a CL_{50} estimada para a toxina Cry1Ac foi de 0,22 μg de Cry1Ac / mL de água, com IC 95% de 0,08 – 0,39 e coeficiente angular (\pm erro padrão) de 1,72 (\pm 0,23).

Comparando os valores de CL_{50} percebe-se que não houve diferenças significativas na resposta ao aumento da concentração da toxina Cry1Ac entre as populações BA-3, MT-1 e MS-1, pois os valores de CL_{50} são semelhantes e os intervalos de confiança estimados para esse parâmetro se sobrepuseram. Além disso, quando comparado a razão relativa de suscetibilidade entre essas populações, foi possível observar que as respostas dessas populações foram semelhantes. A população BA-1 se assemelhou as populações MT-1 e MS-1 pela sobreposição dos intervalos de confiança, mas foi a que apresentou os maiores valores das concentrações letais de 50 e 95%, e a que apresentou a maior razão relativa de suscetibilidade. Percebe-se nitidamente que essa população respondeu significativamente a toxina. Comparando-se os intervalos de confiança das CL_{50} s e CL_{95} s estimadas, a resposta da população BA-4 se comportou igualmente a resposta das populações BA-3, MT-1 e MS-1, e diferiu da população BA-1. Interessante notar que a resposta dessa população foi à única mais próxima da resposta da população de laboratório (Tabela 1).

Já através do teste de paralelismo de retas foi possível confirmar a hipótese que as retas são paralelas ($p > 0,05$). Entretanto as retas não são semelhantes ($p < 0,05$). Foram testadas então as retas de cada população par-a-par, a fim de se determinar quais delas são semelhantes e quais divergem significativamente pela comparação dos valores de intercepto (parâmetro β) e do coeficiente angular (parâmetro α). Foram consideradas conclusivamente semelhantes aquelas que diferiram significativamente no teste de similaridade de retas. As populações BA-3 MT-1 e MS-1 foram significativamente semelhantes entre si ($p > 0,05$). A população BA-1, apesar da análise dos IC 95% CL_{50} s e CL_{95} s estimadas ter apresentado semelhança a população MS-1, através desse teste pode se confirmar que são significativamente semelhantes ($p > 0,05$). Contudo BA-1 diferiu significativamente de BA-3 e MT-1 ($p < 0,05$). Todas as

populações apresentaram respostas distintas em relação à população de laboratório, exceto a população BA-4 ($p > 0,05$).

As linhas-básicas de suscetibilidade das populações BA-3, MT-1 e MS-1 foram bastante próximas. A resposta da população BA-4 foi mais próxima da população LAB (Tabela 1, Figura 2).

Tabela 1 – Caracterização da linha-básica de suscetibilidade à toxina Cry1Ac em populações de *Alabama argillacea*

População	N ¹	Coefficiente angular (± erro padrão)	χ^2	g.l. ²	CL ₅₀ (μg de I.A. ³ /ml de água) (95% I.C.)	CL ₉₅ (μg de I.A. ³ /ml de água) (95% I.C.)	RR ⁴
LAB ^c	171	1,49 ± 0,19	4,31	3	0,16 (0,09 – 0,28)	1,98 (0,68 – 33,32)	---
BA-1 ^b	176	1,62 ± 0,21	2,62	3	0,96 (0,58 – 1,63)	19,38 (7,97 – 105,21)	6,00
BA-3 ^a	631	1,40 ± 0,10	2,78	5	0,45 (0,37 – 0,56)	6,66 (4,75 – 10,15)	2,81
BA-4 ^c	399	1,72 ± 0,23	6,23	5	0,22 (0,08 – 0,39)	1,28 (1,15 – 5,30)	1,37
MT-1 ^a	588	1,38 ± 0,10	1,00	5	0,50 (0,38 – 0,64)	7,70 (5,31 – 12,47)	3,12
MS-1 ^{ab}	261	1,16 ± 0,17	3,85	3	0,53 (0,25 – 0,92)	13,60 (4,04 – 466,55)	3,31

¹ Número de lagartas testadas

² graus de liberdade

³ μg de Cry1Ac / mL de água

⁴ Razão relativa de suscetibilidade: CL₅₀ da população de campo / CL₅₀ da população de laboratório

* significância ao teste de paralelismo de retas: letras iguais não apresentaram diferenças significativas à $\alpha = 0,05$.

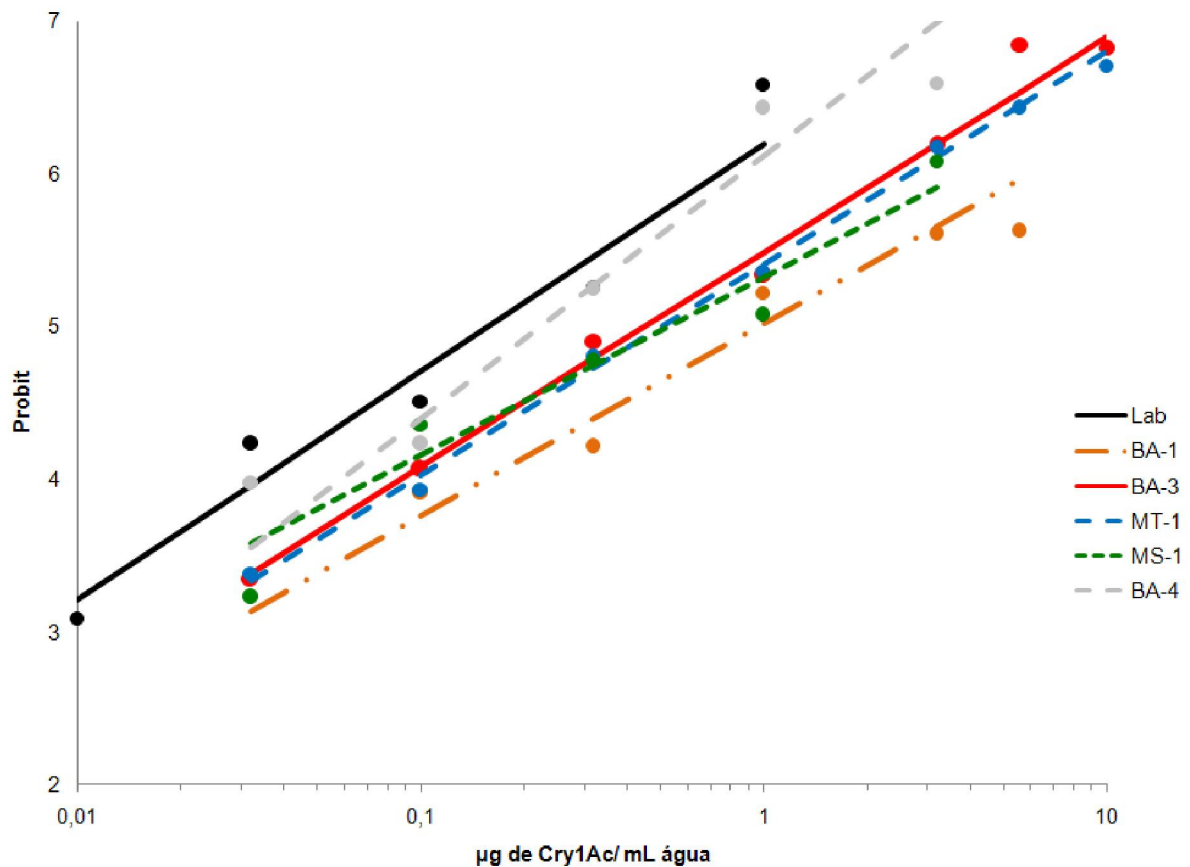


Figura 2 – Caracterização da linha-básica de suscetibilidade das populações de *Alabama argillacea* coletadas nos estados da Bahia (BA-1, BA-3 e BA-4), Mato Grosso (MT-1), Mato Grosso do Sul (MS-1) e a suscetível de referência (LAB) à toxina Cry1Ac

O conhecimento da suscetibilidade de uma espécie de inseto-praga a inseticidas entre regiões geográficas é importante para se avaliar o risco potencial de evolução de resistência, entender se a variação na suscetibilidade entre diferentes populações está associada com o histórico de uso de um inseticida e para mensurar o quanto programas de manejo da resistência estão sendo eficientes (US EPA, 2001). Variações significativas na suscetibilidade a um inseticida entre regiões geográficas de uma espécie geralmente indica alto risco para evolução de resistência (KINSINGER; McGAUGHEY, 1979).

Diferenças geográficas na suscetibilidade à toxina Bt em várias espécies – alvos do controle de plantas GM já foram reportadas, incluindo, *Ostrinia nubilalis* nos

Estados Unidos (MARÇON et al., 1999; REED; HALLIDAY, 2001) na Espanha (GONZALEZ-NUÑEZ et al., 2000), e Alemanha (SAEGLITZ et al., 2006); *Helicoverpa zea* nos Estados Unidos (SIEGFRIED et al., 2000); e *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte no Centro-Oeste dos EUA no cinturão do milho (SIEGFRIED et al., 2005). Contudo a variação na suscetibilidade entre populações de regiões geográficas dessas espécies estudadas, em geral, foram relativamente baixas, com diferenças entre as CL₅₀s menores que sete vezes. Contudo, a variação da suscetibilidade de populações de *Diatraea saccharalis* a toxina Cry1Ab presente em milho transgênico foi ligeiramente maior (≤ 10 vezes a diferença entre CL₅₀s) que a variação na suscetibilidade reportada nos estudos anteriores (HUANG et al., 2008).

Já para a principal praga-alvo de controle do algodão transgênico nos Estados Unidos, os resultados para as caracterizações das linhas-básicas de populações de diferentes regiões geográficas se assemelharam aos resultados obtidos com as pragas de milho. Antes da introdução do algodão Bt, uma notável variação, acima de oito vezes, foi encontrada na suscetibilidade de *Heliothis virescens* de regiões geográficas diferentes nos Estados Unidos (STONE; SIMS, 1993; LUTTRELL et al., 1999), contudo essas populações de campo apresentaram suscetibilidade semelhante as populações de laboratório, que nunca tiveram contato com a toxina Bt (LUTTRELL et al., 1999). Após vários anos de uso comercial do algodão Bt, as populações de campo de *Heliothis virescens* apresentaram a mesma suscetibilidade que as populações de laboratório (HARDEE et al., 2001; ALI; LUTRELL; YOUNG, 2006).

Comparando os dados obtidos para *A. argillacea* no Brasil, as populações de campo não apresentaram diferenças na suscetibilidade maiores que seis vezes. Dentre as populações estudadas, apenas as resposta das populações BA-1 e BA-4 se diferenciaram das respostas das outras populações. A população BA-1 foi a que apresentou a maior diferença em relação à população suscetível de laboratório, sendo essa diferença maior que seis vezes. Contudo, comparando essa população com as outras, a diferença na suscetibilidade não ultrapassa cinco vezes. Já a população BA-4, que foi coletada no estado da Bahia, em uma região próxima a da população BA-1, foi a que apresentou a suscetibilidade mais próxima da população de laboratório. Curioso, que essa população diferiu das outras em relação à safra de coleta. Enquanto que as

outras foram coletadas na safra agrícola de 2007/2008, essa última foi coletada na safra agrícola de 2008/2009, mais precisamente no início do ano de 2009.

As diferenças na suscetibilidade a toxina Bt entre populações de *A. argillacea* observadas aqui estão mais ligadas a variações naturais entre as populações do que causada por pressões seletivas causada pela exposição à toxina Bt. Como reportado para outras espécies de insetos-pragas, essas diferenças podem estar relacionadas a diferenças no valor adaptativo (crescimento e desenvolvimento) de cada população (ROSSITER; YENDOL; DUBOIS, 1990; MARÇON et al., 1999), variações incontroláveis nas condições dos bioensaios, ou outros fatores não genéticos (SIMS et al., 1996).

Portanto, os resultados obtidos com as caracterizações das linhas-básicas das populações de campo de *A. argillacea* sugerem que estão ainda permanecem suscetíveis à toxina Cry1Ac, mesmo após quatro anos do início da utilização da tecnologia do algodão GM. Os dados obtidos com as caracterizações das suscetibilidades foram utilizados para se estabelecer as concentrações diagnósticas que poderão ser utilizadas em programas de monitoramento da evolução da resistência de *A. argillacea* a toxina Bt. Além disso, as linhas-básicas obtidas também poderão ser utilizadas como referência para se compara as alterações na suscetibilidade de outras populações da espécie, coletadas futuramente, como um indicativo de potencial de evolução de resistência da espécie a toxina Cry1Ac.

2.3.1.2 Caracterização da curva de concentração-resposta de inibição de crescimento

Para as populações BA-3 e MT-1 os valores de peso médios obtidos se ajustaram ao modelo de regressão logístico não-linear e assim permitiu estimar as EC_{50} e EC_{99} (concentração capaz de inibir o crescimento em 50% e 99%, respectivamente) para cada população (Tabelas 2 e 3).

Para a população coletada na Bahia, município de Roda Velha (BA-3), a EC_{50} estimada foi de 0,093, IC 95% de 0,061 – 0,125. Já a EC_{99} estimada foi de 29,65 com IC 95% de -4,82 – 64,12 (tabela 2). Já para a população proveniente do município de Campo Verde, Mato Grosso (MT-1), a EC_{50} estimada foi de 0,067 com IC 95% de 0,048

– 0,086. A EC_{99} estimada para essa população foi de 17,27 com IC 95% de -0,15 – 34,70 (tabela 3). É possível observar que existe variabilidade na resposta de inibição de crescimento entre as duas populações. Mesmo havendo sobreposição dos intervalos de confiança (IC 95%) da estimativa da EC_{50} entre as populações, os valores de cada concentração foram significativamente diferentes e, além disso, o IC 95% da EC_{50} da população MT-1 não abrange o valor de EC_{50} estimado para a população BA-3. Já em relação a EC_{99} , apesar de o IC 95% da estimativa de EC_{99} da população BA-3 abranger todo o IC 95% dessa concentração letal da população MT-1, esse intervalo é muito extenso, não permitindo afirmar com precisão a semelhança dessa estimativa entre as populações.

Apesar de haver variabilidade na resposta entre as duas populações avaliadas, o comportamento das curvas obtidas pela regressão linear não-logística foi semelhante. Isso pode ser visto na extremidade final das curvas de ambas as populações, onde a concentração de 10 μg de Cry1Ac / mL foi capaz de reduzir o desenvolvimento em 99%. (Figuras 3 e 4)..

Tabela 2 – Modelo de regressão não-linear para estimativa dos parâmetros EC₅₀ e EC₉₉ para a população de *A. argillacea* da Bahia (BA-3)

Fonte	g.l. ^a	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	<i>p-value</i> ^b
Modelo	3	34159,9	11386,6	< 0,0001
Erro	5	90,5659	18,1132	
Total não corrigido	8	34250,4		

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	Intervalo de Confiança 95% (IC 95%)
W0 ^c	136,9	4,2381	126,0 – 147,8
B ^d	0,7972	0,0673	0,624 – 0,970
EC ₅₀ ^e	0,0931	0,0125	0,061 – 0,125
EC ₉₉ ^f	29,649	13,409	-4,818 – 64,116

^a graus de liberdade

^b valor de significância ao ajuste ao modelo de regressão logístico não - linear

^c peso esperado da testemunha

^d parâmetro de angulação da função logística

^e concentração efetiva capaz de reduzir 50% do peso da lagarta

^f concentração efetiva capaz de reduzir 99% do peso da lagarta

Tabela 3 – Modelo de regressão não – linear para estimativa dos parâmetros EC₅₀ e EC₉₉ para a população de *A. argillacea* Mato Grosso (MT-1)

Fonte	g.l.	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	<i>p-value</i>
Modelo	3	18165,9	6055,3	< 0,0001
Erro	5	37,0692	7,4138	
Total não corrigido	8	18202,9		

Parâmetro	Estimativa	Erro padrão	Intervalo de Confiança 95% (IC 95%)
W0	104,8	2,7225	97,782 – 111,8
b	0,8285	0,0634	0,665 – 0,991
EC ₅₀	0,0674	0,00748	0,048 – 0,086
EC ₉₉	17,2770	6,7799	-0,151 – 34,705

^a graus de liberdade

^b valor de significância ao ajuste ao modelo de regressão logístico não - linear

^c peso esperado da testemunha

^d parâmetro de angulação da função logística

^e concentração efetiva capaz de reduzir 50% do peso da lagarta

^f concentração efetiva capaz de reduzir 99% do peso da lagarta

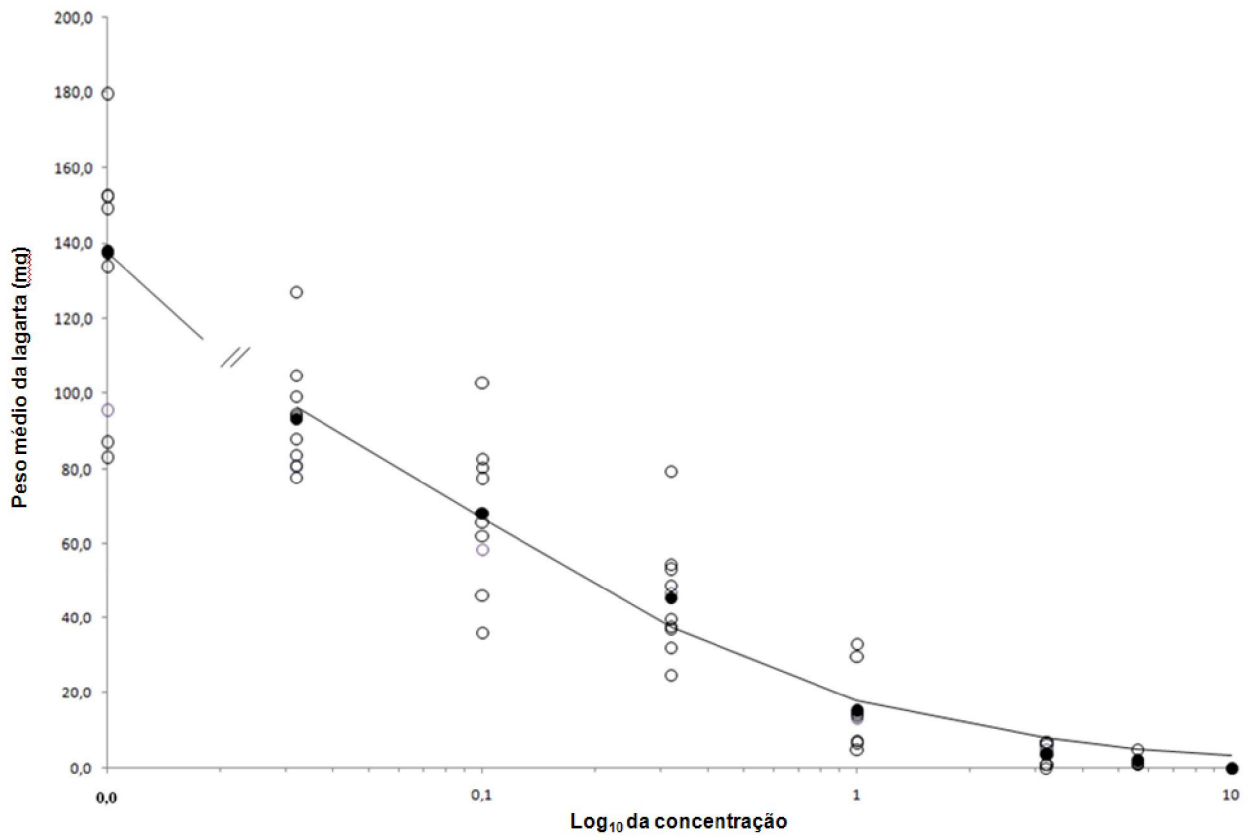


Figura 3 – Caracterização da resposta de inibição de crescimento para a população de *A. argillacea* do estado de Bahia (BA-3) à toxina Cry1Ac

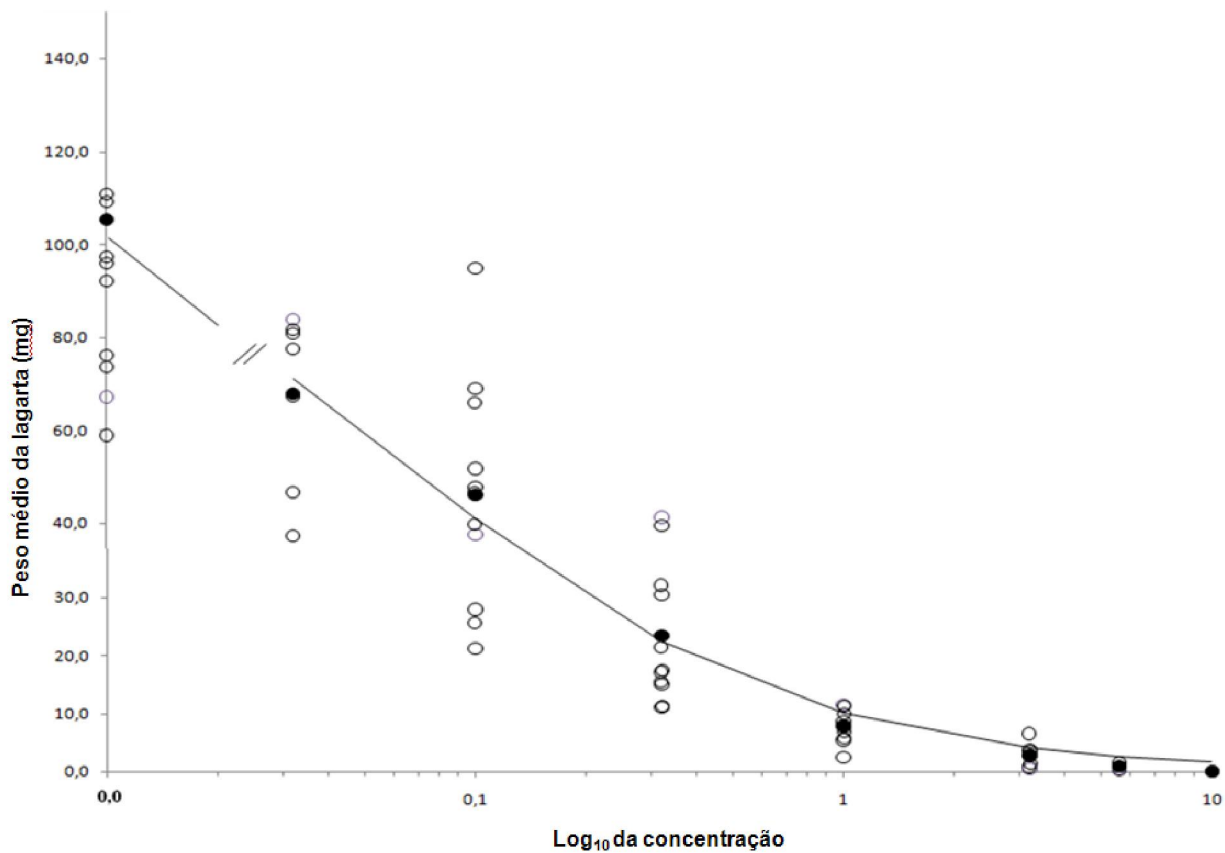


Figura 4 – Caracterização da resposta de inibição de crescimento para a população de *A. argillacea* do estado de Mato Grosso (MT-1) à toxina Cry1Ac

As caracterizações das respostas de inibição de crescimento para as populações BA-3 e MT-1 permitiram estimar com maior precisão as concentrações diagnósticas para o monitoramento da evolução da resistência de *A. argillacea* a proteína inseticida Cry1Ac. Apesar de haver variabilidade nas respostas de inibição de crescimento das duas populações, as estimativas da EC₉₉ juntamente com os respectivos IC 95% para cada população serviram de confirmação para as concentrações letais determinadas como concentrações diagnósticas. A confiabilidade desse método de bioensaio em identificar genótipos resistentes em populações naturais quando esses se encontram em baixa frequência foi levada em consideração na utilização das estimativas dos parâmetros EC₅₀ e EC₉₉ para auxiliar a escolhas das concentrações diagnósticas. Além disso, esse método de bioensaio permite uma adequada discriminação entre lagartas suscetíveis e resistentes utilizando uma concentração muito menor da toxina (SIMS et al., 1996)

2.3.1.3 Determinação e validação da concentração diagnóstica para o monitoramento da suscetibilidade

A caracterização da linha-básica de suscetibilidade e da resposta de inibição de crescimento permitiu se determinar com maior precisão as concentrações diagnósticas com potencial para serem utilizadas no monitoramento da alteração da suscetibilidade de *A. argillacea* ao uso de plantas GM que expressão a toxina Cry1Ac. Entretanto, percebe-se que existe uma grande amplitude de variação da resposta à toxina entre as populações. Por isso, foi então feita caracterização da linha-básica agrupando em um mesmo conjunto de dados todos os valores de mortalidade obtidos com as caracterizações das linhas-básicas das quatro populações de campo da safra 2007-2008 (BA-1, BA-3, MS-1, MT-1) (Figura 5). Isso foi feito objetivando aumentar a sensibilidade da análise de regressão e da estimativa da dos parâmetros: CL_{95} e CL_{99} ; coeficiente angular e IC 95% das concentrações letais (Tabela 4).

Com as caracterizações das linhas-básicas das populações coletadas na safra agrícola de 2007/2008 pode se estimar a CL_{95} que poderia ser escolhida como concentração diagnóstica. Observando os valores obtidos, essa concentração está próximo a de 10 μg de Cry1Ac / mL de água. Os limites superiores dos IC 95% de das CL_{95} e CL_{99} foram escolhidos como ponto de partida para determinação das concentrações diagnósticas. Para aumentar a probabilidade de escolha de concentrações diagnósticas ideais, valores totais de EC_{99} (concentração que efetivamente causa redução em 99% no desenvolvimento larval) para a toxina Cry1Ac também foram estimados. Os valores estimados para a EC_{99} das populações BA-3 e MT-1 e a análise das curvas obtidas com o modelo de regressão logístico não-linear, permitiram definir as concentrações diagnósticas com mais acuidade, uma vez que os bioensaios de resposta de inibição de crescimento são mais sensíveis em se detectar genótipos resistentes (SIMS et al., 1996). As concentrações diagnósticas definidas foram as que determinam os menores valores de peso médio das lagartas e estão próximo aos valores de EC_{99} determinados.

Sendo assim, com base na análise de Probit dos dados agrupados foi possível determinar as concentrações de 10 e de 32 μg de Cry1Ac / mL de água como

concentrações diagnósticas, que correspondem respectivamente as CL_{95} e CL_{99} da caracterização da linha-básica dos dados agrupados.

Um dos componentes mais importantes da estratégia de manejo da resistência é a habilidade de monitorar efetivamente a evolução da resistência em populações da praga alvo de controle (DENNEHEY, 1987). A habilidade em se detectar a resistência é necessária para (1) se determinar quando as falhas no controle são determinadas pela presença de indivíduos resistentes na população, (2) avaliar a extensão e a distribuição das populações resistentes, e (3) testar a efetividade dos programas de manejo em reduzir a frequência dos indivíduos resistentes (HALLIDAY; BURNHAM, 1990).

A resistência a inseticidas químicos e microbianos tem sido tradicionalmente monitorada e comparada utilizando caracterizações de linhas-básicas de populações de campo obtidas através da regressão de Probit. Essa abordagem permite calcular a razão de resistência (CL_{50} da testada dividida pela CL_{50} da população suscetível de referência) e a comparação estatística das CL_{50} s e do coeficiente angular obtido com a regressão de Probit (ROBERTSON; PREISLER, 1992). Similarmente, estudos para se caracterizar linha-básica de insetos alvos de controle de plantas GM gerou estimativas de CL_{50} s e coeficiente angulares de diferentes populações expostas à toxina Bt. Contudo as estimativas de CL_{50} s e de coeficiente angulares permitem distinguir fenótipos resistentes em populações naturais quando estes estão já em alta frequência, e essa abordagem não é suficientemente sensível para detectar a presença de indivíduos resistentes quanto são raro nas populações (frequência entre 10^{-4} e 10^{-3}) (ROUSH; MILLER, 1986; HALLIDAY; BURNHAM, 1990). Uma alternativa a caracterização e comparação de linhas-básicas de suscetibilidade envolvem a determinação e o uso de concentrações diagnósticas ou discriminatórias em programas de monitoramento (FFRENCH-CONSTANT; ROUSH, 1990). Com o uso de concentrações diagnósticas, um número maior de insetos é testado apenas nas concentrações mais informativas sobre as mudanças nas frequências dos fenótipos resistentes em populações naturais, conseqüentemente os resultados podem ser obtidos de uma forma rápida e precisa (ROUSH; MILLER, 1986)

Após a determinação das concentrações diagnósticas deveriam ter sido feitas a validação das mesmas, realizando bioensaios de imersão de discos de folhas contendo

toxina Cry1Ac apenas nas concentrações determinadas. Contudo, por problemas ocorridos durante a criação em laboratório das populações de *A. argillacea* obtidas de campo, na safra agrícola de 2008/2009, foi possível apenas validar a concentração de 10 µg de Cry1Ac / mL de água.

Essa validação foi feita apenas em uma população, utilizando em torno de 500 indivíduos da população da Bahia, coletada no município de São Desidério. A porcentagem de mortalidade 97,08% ($\pm 1,00$) na concentração diagnóstica. Contudo, diferenças nos valores de mortalidade em populações naturais, utilizando essa metodologia são esperadas (MARÇON et al., 2000). Entretanto, em programas de manejo da resistência onde os objetivos são identificar os genótipos resistentes quando esses são menos raros na população, a determinação das concentrações diagnósticas para o monitoramento das mudanças na suscetibilidade deve ser criteriosa e mais precisa possível. Pois, mesmo pequenos erros na estimativa de CL_{99} e EC_{99} podem causar erros consideráveis na estimativa da frequência de indivíduos resistentes quando essas concentrações são utilizadas como concentrações diagnósticas (ROUSH; MILLER, 1986). Portanto, a concentração diagnóstica final pode apenas ser designada após a validação empírica feita testando em várias populações da praga (MARÇON, 2000). Sendo assim, para uma melhor determinação dessas concentrações há a necessidade de validar essas em outras populações naturais de *A. argillacea*.

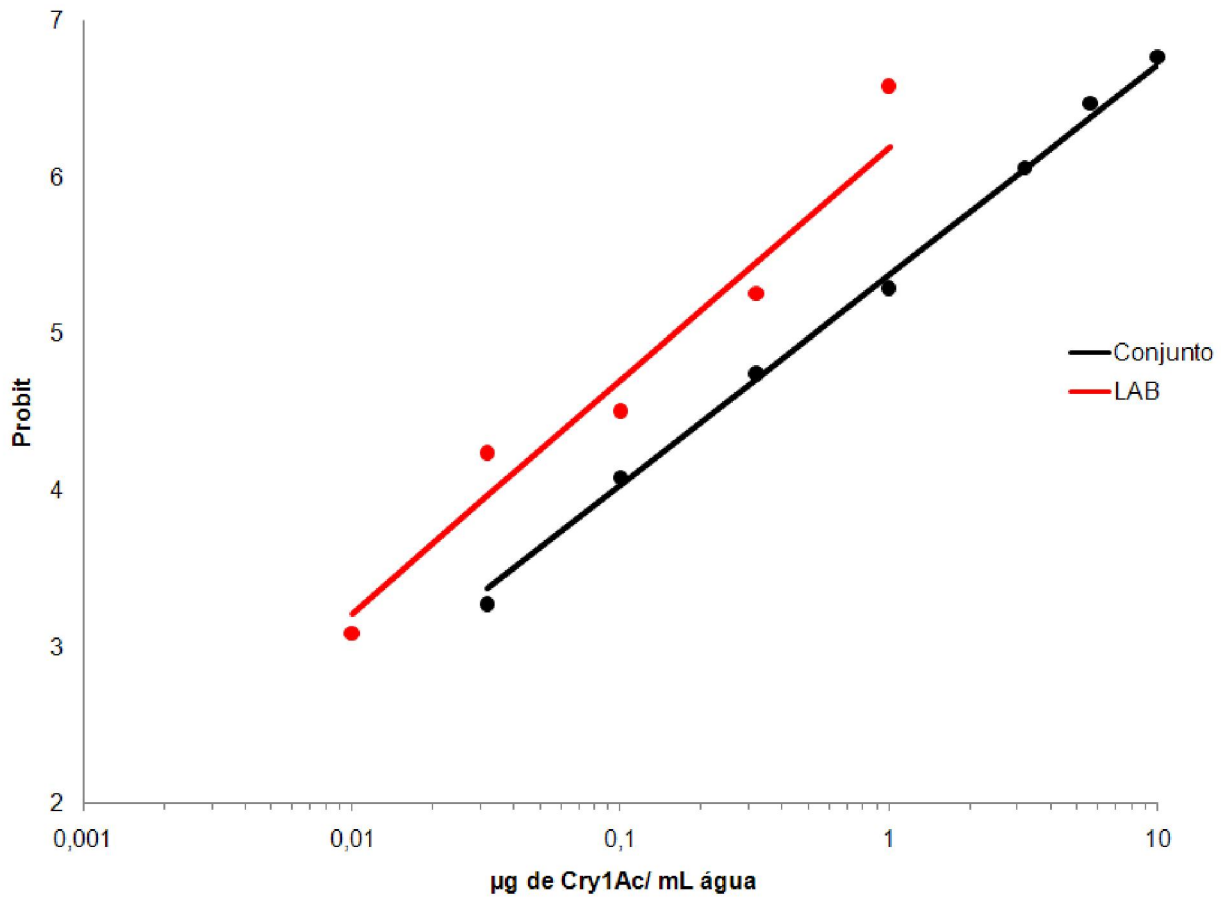


Figura 5 – Caracterização da linha-básica de suscetibilidade à toxina Cry1Ac mediante agrupamento de dados obtidos com as caracterizações de curvas de concentração-resposta de quatro populações de *A. argillacea* coletadas nas safras 2007/2008.

Tabela 4 – Caracterização da linha-básica de suscetibilidade à toxina Cry1Ac mediante agrupamento de dados obtidos com as caracterizações de curvas de concentração-resposta de quatro populações de *A. argillacea* coletadas nas safras 2007/2008

População	N ^a	Coefficiente angular (± erro padrão)	χ^2	g.l. ^b	CL ₅₀ (µg de I.A. ^c /ml de água) (95% I.C.)	CL ₉₅ (µg de I.A. ^c /ml de água) (95% I.C.)	CL ₉₉ (µg de I.A. ^c /ml de água) (95% I.C.)
LAB	171	1,49 ± 0,19	4,31	3	0,16 (0,09 – 0,28)	1,98 (0,68 – 33,32)	5,66 (1,43 – 253,42)
Conjunto	1668	1,34 ± 0,63	2,29	5	0,52 (0,45 – 0,60)	8,77 (6,88 – 11,64)	28,22 (20,31 – 41,65)

^a Número de lagartas testada

^b graus de liberdade

^c µg de Cry1Ac / mL de água

2.3.2 Desenvolvimento e caracterização dos microssatélites

2.3.2.1 Construção de biblioteca genômica enriquecidas em Microssatélites

A extração do DNA genômico a partir do tórax de indivíduos adultos de *A. argillacea* forneceu uma concentração de aproximadamente 250 ng/ μ L de DNA e foram utilizados aproximadamente 5 μ g na reação. Na digestão com a enzima RsaI o DNA genômico foi digerido não foi gerado nenhum tamanho preferencial de fragmento, assim foi produzido o perfil adequado para a construção da biblioteca. A ligação dos adaptadores foi importante para garantir que cada fragmento tivesse uma terminação comum e conhecida. A pré-amplificação foi realizada com sucesso, confirmando a ligação dos adaptadores aos fragmentos e gerando uma maior quantidade de DNA para a seleção. Não houve a amplificação aparente de fragmentos preferenciais, o que poderia ser prejudicial nas etapas posteriores da construção da biblioteca, pois levaria a clonagem e seqüenciamento de fragmentos preferenciais, obtenção de microssatélites redundantes e aumentando o tempo e os custos para a identificação de microssatélites.

A eficácia do enriquecimento foi verificada através dos produtos de PCR obtidos diretamente de colônias individuais e foi confirmada com a técnica de seqüenciamento. Cerca de 90% dos clones analisados apresentaram presença de motivos de sequências repetitivas, sendo que muitas das seqüências apresentavam mais de uma região microssatélite.

2.3.2.2 Seleção, seqüenciamento dos clones positivos e desenho de *primers*

Dos 117 insertos que foram seqüenciados, 109 apresentaram regiões microssatélites, sendo que muitos apresentaram mais de uma região. Foram encontrados 236 motivos microssatélites no total e os motivos encontrados apresentaram as seguintes freqüências: 89% perfeitos, 6% interrompidos, 2% compostos perfeitos e 3% compostos interrompidos (Figura 6). Dentre os motivos encontrados nas 109 seqüências, os pentanucleotídeos foram os mais abundantes, sendo 48%, seguidos pelos motivos dinucleotídeos e mononucleotídeos com 35% e

13% respectivamente (Figura 7). Vinte e três dessas sequências puderam ser utilizadas para o desenho dos *primers* das regiões flangeadoras dos motivos microssatélites (Tabela 5). As seqüências restantes não foram utilizadas, pois a região flangeadora era também um microssatélite ou estava muito próximo de uma das extremidades da seqüência impossibilitando o desenho dos *primers*. Dentre as 23 *primers* obtidos, 87 % apresentaram motivos dinucleotídeos e 13 % apresentaram motivos trinucleotídeos (Figura 8). Dentre os motivos dinucleotídeos os mais abundantes, nos microssatélites isolados, foram às repetições AC/CA, seguida das repetições TG/GT, AG/GA TC/CT (Figura 9).

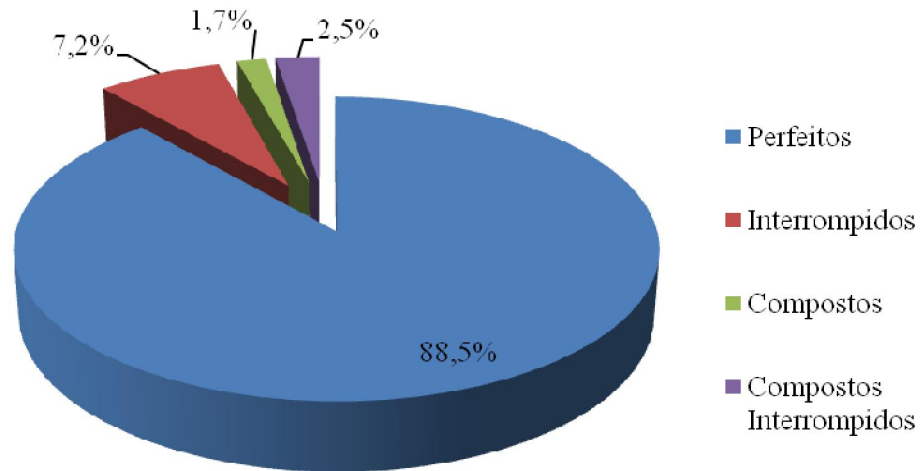


Figura 6 – Frequências de motivos microssatélites perfeitos, interrompidos, compostos e compostos interrompidos isolados em *A. argillacea*

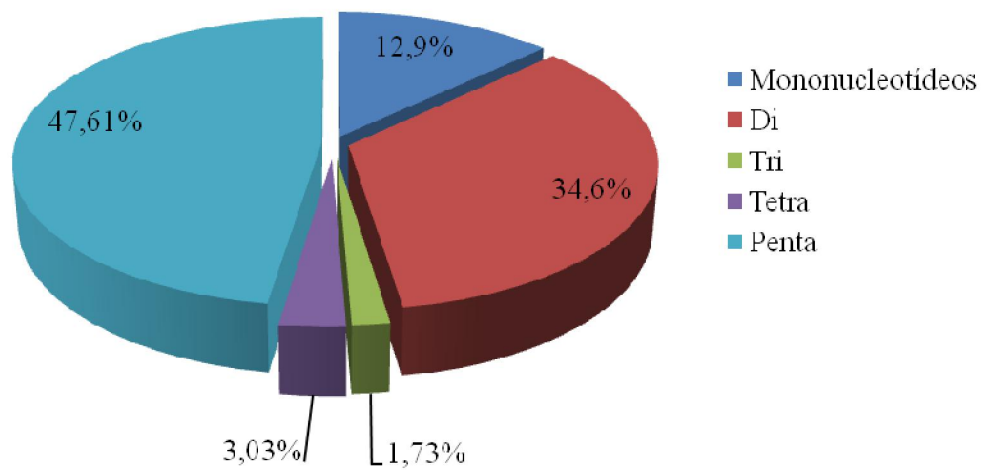


Figura 7 – Porcentagem de motivos microssatélites encontrados nos 117 inserts de *A. argillacea* seqüenciados que apresentaram pelo menos uma região microssatélite

Tabela 5 – *Primers* desenhados para *A. argillacea* a partir das regiões microssatélites

(continua)

<i>Primers</i>	Motivo ^a	Classificação	Produto Pb ^b	TA ^c °C	Seqüência (<i>Primer</i>)
1	(AC)33	Perfeito	236	60	F TTACACCCAGACACAGGACA R GTAGTGGTCGTGCGTTTTGA
3	(CA)8 (CACG) ₄	Composto	248	59	F CTAGTGATTCTGCGCCATGT R TTCTCATTGAAGGCGGTTCT
3	(AC)14	Perfeito	189	59	F CGATGGAGCCGTTCTACTG R TTGGAGTCTGCGTTTCTTCA
4	(TG)8	Perfeito	215	59	F TGTCGCCTCGATTACTCTCA R CAACCCAACACAAACACACA
5	(GT)8	Perfeito	213	64	F GAACTTAATACAGTCCCCACCA R AGTCAGCTCGTATTTACCGTGA
6	(CA)13	Perfeito	212	63	F GTTTCACGACCTACTAGCAAGC R GGGTTTCGTTATTCGTCATCT
7	(AC) 5 CCATAT (AC)11	Interrompido	235	62	F CCCGTCTTACACCACCCTAC R CGCAGTTAGCATACGTGACA
8	(AAG)5	Perfeito	180	61	F GACCATCTTGCTGGAGGAG R TGACGTGGGATTGATAAAGTTG
9	(AC)10	Perfeito	239	57	F CCATGTGTGAAATGTTCCAG R TACAGGAAAGCGGGATCG
10	(AC)8	Perfeito	223	61	F ACTTCGCTGTCCGTCAGTC R GCTATCACAGTTCTTGCGACA
11	(AG)32 (GA)10	Composto	233	63	F CGGACACGTTTTGTTATATTGG R CTTAACGCACTCTCTCTCG
12	(AC)6 GCAA (AC)7	Interrompido	197	60	F GCCATGACAACAAATAAAGCA R GTGGTGATCTGTGAGCGTGT

Tabela 5 – *Primers* desenhados para *A. argillacea* a partir das regiões microssatélites

(conclusão)

<i>Primers</i>	Motivo ^a	Classificação	Produto Pb ^b	TA ^c °C	Seqüência (<i>Primer</i>)
13	(ATA)4	Perfeito	250	62	F TTTGTTCCATCTAAGGCTACG R GCGGACTATGAGAGTGAAGGA
14	(GT)9	Perfeito	185	58	F TCACACTGATGCGTGATTGA R TCGATTGAAAACCTCCTCCT
15	(GT)6	Perfeito	245	62	F TCCATAGAAGACAGCGATTTTG R CCCACAAACCACACTAAAGGA
16	(CT)10 CACT (ACTC)3	Interrompido	194	62	F GTCCCTATGCGTGGACAGTA R TTCTGGCTAGTTTTGTTCCCTA
17	(CA)9 A (AC) ₅	Imperfeito	170	56	F CTTGCGGTTTGAGGCTCT R TCCATTAAGCGATCAATGC
18	(AC)10	Perfeito	242	56	F AGCCATGTGTGAAATGTTCC R AAGAAAAGCGGGGATCGT
19	(TG)7 (TC)5 (TG)5	Composto	166	62	F GCCAGGTTTCTCTCTCTCGAT R TGACGCACACACACAAAGAG
20	(AC)22	Perfeito	193	62	F AGTCCAAATCCAACACGAG R GAGCACTTACTGTGTGCCAGA
21	(GAA)6	Perfeito	177	61	F CACGAAAATGCTTACAACACG R CAAAGGGTCAAAGTCAAACC
22	(TG)8	Perfeito	167	59	F GCACACACCGGGTCTTTAT R CTCCAAAGTCACATCGTCCA
23	(CA)7	Perfeito	239	62	F TTGACTATGGGTGGAGTGAGG R TGGTCAGACTTCCTGCACAT

^a Repetição de nucleotídeos em *tandem* que caracterizam uma região microssatélite.^b Pares de bases.^c Temperatura de Anelamento do *primer*.

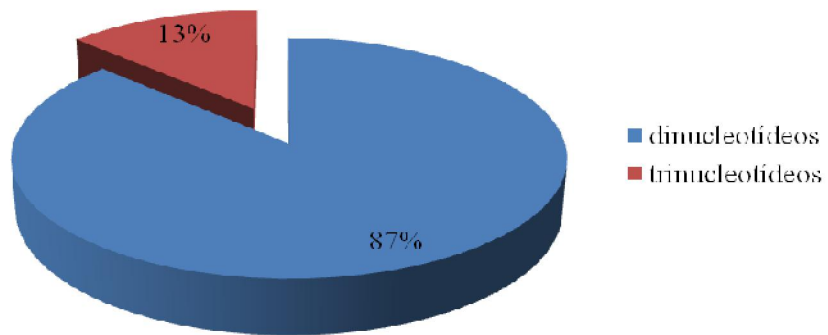


Figura 8 – Porcentagem de motivos microsatélites encontrados nos *primers* obtidos para *A. argillacea*

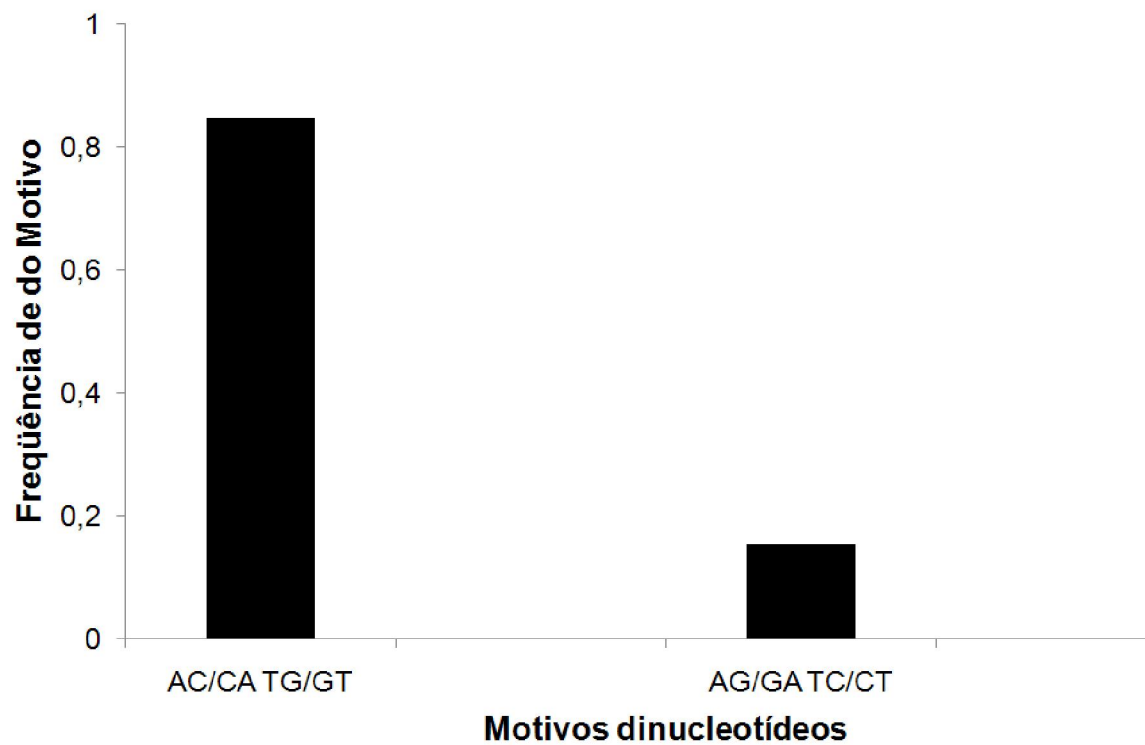


Figura 9 – Frequência dos motivos dinucleotídeos que são acessados pelos *primers* obtidos para *A. argillacea*

O grau de eficiência, da metodologia utilizada para isolar locos microssatélites presentes no genoma de *A. argillacea* pôde ser avaliada pela razão entre eficiência de clonagem vezes a razão número de sequências com microssatélites utilizada dividido pelo número total de seqüências clonadas com microssatélites. O resultado dessa estimativa é de uma eficiência de 19,53%.

Já a eficiência de isolamento de locos de microssatélites através dos *primers* desenhados, pode ser medida através da razão entre número total de microssatélites em condições de serem utilizados, sobre o número total de microssatélites isolados. A razão de eficiência foi de 9,74%.

2.3.2.3 Amplificações iniciais e otimização dos *primers*

Dos 23 *primers* sintetizados, apenas dez foram utilizados no estudo de genética de populações. Através da primeira triagem, utilizando quatro temperaturas de anelamento (48, 52, 56 e 60°C), com o objetivo de abranger um espectro de condições maior, foi possível isolar inicialmente seis pares de *primers* (Figura 10). As condições de PCR utilizadas para esta série de triagens foram às mesmas determinadas nos testes iniciais para os *primers* sintetizados para *A. argillacea*. Contudo, desses seis, um não apresentou polimorfismo (*primer* 15) em gel de poliacrilamida 7%, sendo assim, esse foi descartado. Apenas os *primers* 14, 16, 19, 21 e 23 foram isolados. Pode – se ver que esses *primers* foram os únicos que acessaram locos polimórficos nesse teste (Figura 11).

Na tentativa de se isolar dez pares de *primers* dos 23 sintetizados, uma série de testes foi realizada. Foram então testados seis pares de *primers*, utilizando a mesma reação, mas submetendo as reações em gradiente de temperatura. Três foram posteriormente descartados, pois não apresentaram polimorfismo e as amplificações geraram produtos de amplificação inespecíficos (05 e 20), ou não apresentaram produto de amplificação (18) Apenas os *primers* 13 e 17 apresentaram polimorfismo e produtos de amplificação satisfatório.

Após esse teste, uma série de outros foram realizados alterando as condições da reação de PCR, como: alteração na concentração de *primers*, MgCl₂, dNTP's, de DNA,

temperatura de anelamento e número de ciclos. Desses testes foram isolados três pares de *primers*: 06, 10 e 11. As condições de amplificação utilizadas para o par de *primers* 06 e 11 foram: para um volume final de 20 µL, foram utilizados cerca de 6 ng do DNA genômico; 0,4 µL do *primer forward* (10 µM) e 0,4 µL do *primer reverse* (10 µM); 2,5 µM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato (dNTP); 2,0 µL solução tampão Buffer 10 X (50 mM de KCl; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,9); 0,5 µL de MgCl₂ (0,625 mM); 5,0 µL de BSA (2,5 µg / ml) e 3 U de Taq DNA polimerase. As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador MyCycler™ (BIO-RAD, Inc.) programado para uma desnaturação inicial de 2 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos com 1 minuto de desnaturação a 95°C, 1 minuto de anelamento a 50°C, para o *primer* 06; 1 minuto de anelamento a 56°C para o *primers* 11, e 1 minuto de extensão a 72°C, finalizando com uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Já para o *primers* 10, as condições utilizadas foram: para um volume final de 20 µL, foram utilizados cerca de 6 ng do DNA genômico; 0,4 µL do *primer forward* (10 µM) e 0,4 µL do *primer reverse* (10 µM); 2,5 µM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfato (dNTP); 2,0 µL solução tampão Buffer 10 X (50 mM de KCl; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,9); 0,5 µL de MgCl₂ (2,5 mM); 3,0 µL de BSA (2,5 µg / ml) e 3 U de Taq DNA polimerase. As reações de amplificação foram realizados em um termociclador MyCycler™ (BIO-RAD, Inc.) programado para uma desnaturação inicial de 2 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos com 1 minuto de desnaturação a 95°C, 1 minuto de anelamento a 56°C e 1 minuto de extensão a 72°C, finalizando com uma etapa de extensão final de 5 minutos a 72°C.

Essa etapa do trabalho foi a mais demorada e a que foi mais trabalhosa. Muitos dos testes realizados não serviram para separar pares de *primers*, outros apenas serviram para se chegar próximo de uma condição ideal para a amplificação. Outros testes determinaram as condições ideais, mas quando foi feita a caracterização dos *primers* otimizados, esses não apresentaram polimorfismo ou apresentaram produtos de amplificação inespecíficos.

Dos 23 pares de *primers*, dez foram apresentaram condições satisfatórias para amplificação, quatro não apresentaram polimorfismo, e nove não apresentaram produtos de amplificação satisfatórios e foram descartados. Portanto os *primers*

escolhidos para a genotipagem e avaliação da variabilidade e estrutura genética foram aqueles que apresentaram maior especificidade, melhores ampliações e polimorfismo.

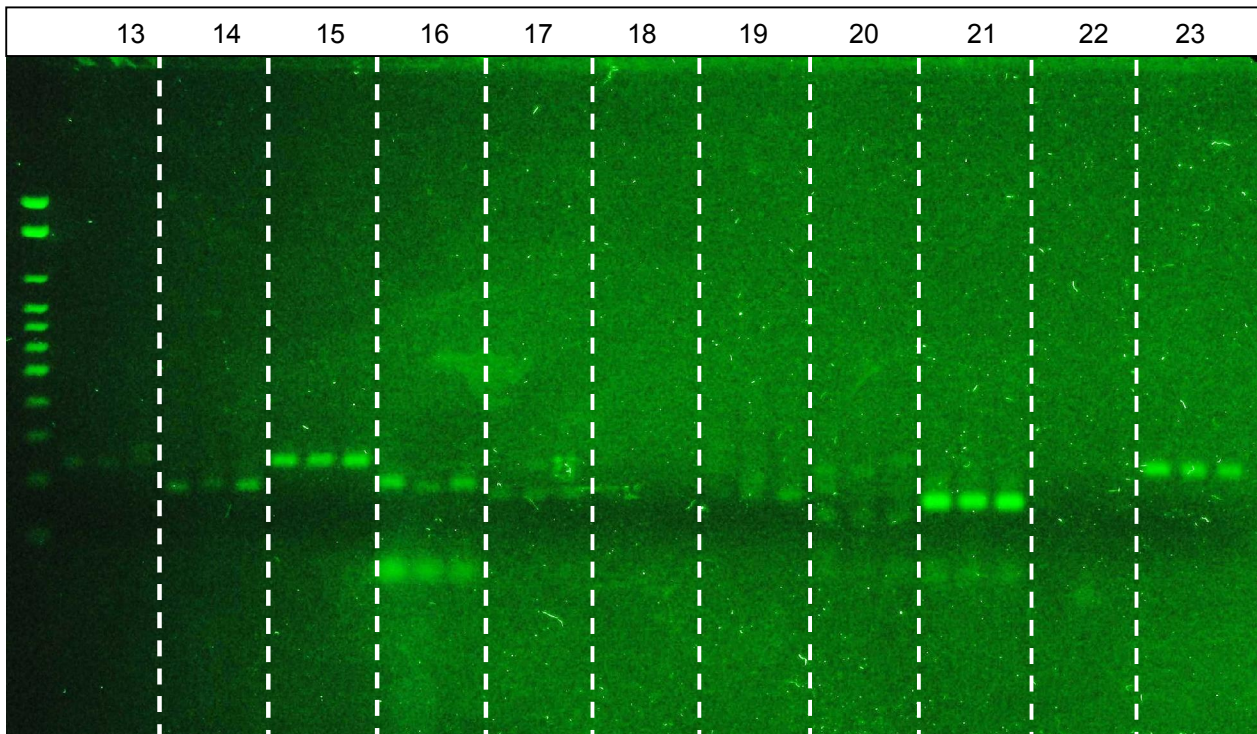


Figura 10 – Teste inicial utilizando os *primers* 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 e 23; e três indivíduos de *A. argillacea* escolhidos ao acaso nas populações diferentes à temperatura de 60°C

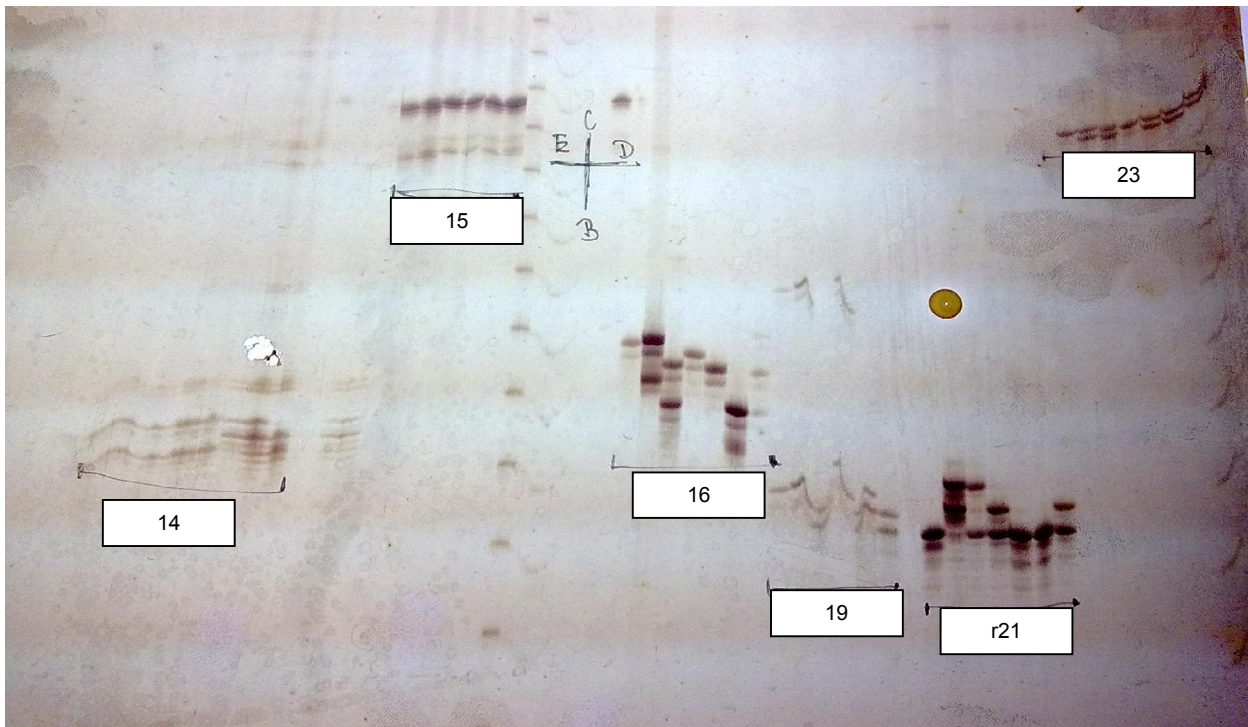


Figura 11 – Gel de acrilamida 7% com os testes dos *primers* isolados na primeira triagem. *Primers* que acessam os locos Aar14, Aar15, Aar16, Aar19, Aar21 e Aar23 em *A. argillacea*

2.3.2.4 Caracterização dos locos microssatélites

Os locos Aar06, Aar10, Aar11, Aar13, Aar14, Aar16, Aar17, Aar19, Aar21 e Aar23, que são acessados pelos *primers*: 06, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 21 e 23, respectivamente, foram caracterizados quanto à amplitude de variação alélica, número de alelos, H_O , H_E , conteúdo de informação polimórfica (PIC) e se o loco se ajusta as proporções de equilíbrio de Hardy – Weinberg. Para isso, foram feitas as genotipagens de uma população (≈ 20 indivíduos) escolhida ao acaso, em gel de acrilamida 7% e posterior leitura desses géis.

Dos dez locos caracterizados, três desses apresentaram alto grau de polimorfismo, possuindo cada um deles de cinco a 11 alelos (Aar16, Aar19 e Aar11), sendo o loco Aar11, que apresentou o maior valor de PIC. Cinco desses locos apresentaram grau de polimorfismo intermediário com número de alelos variando de três a quatro. E por fim dois locos apresentaram baixo grau de polimorfismo (locos Aar13 e Aar23). A heterozigosidade observada (H_O) variou de 0,000 a 0,630, sendo que os menores valores pertencem aos locos Aar06 e Aar13 e o maior valor pertence ao loco Aar19. Já a heterozigosidade esperada (H_E) variou de 0,114 a 0,920, com o menor valor atribuído ao loco Aar13, e o maior valor ao loco Aar11. Os valores de PIC variaram de 0,104 a 0,870, sendo o menor determinado pelo loco Aar13 e o maior pelo loco Aar11. Apenas o loco Aar06 não se ajustou as proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,005$) (Tabela 6). Os baixos valores de H_O dos locos Aar06 e Aar13 foram determinados pela baixa proporção de heterozigotos nesses locos na população estudada. Já os valores altos de H_O foram determinados pela grande porcentagem de indivíduos heterozigotos. Os valores de H_E foram determinados pelo número de alelos e pela distribuição da frequência dos alelos em cada loco. Pode-se notar que os locos que apresentaram os maiores valores de H_E são aqueles que possuem um maior número de alelos e uma distribuição homogênea das frequências desses alelos na população. Já os que possuem os menores valores de H_E são os que apresentaram menor número de alelos.

No total, foram encontrados 42 alelos distribuídos entre os dez locos caracterizados. Os alelos encontrados em cada loco e as frequências relativas desses

alelos estimados para ≈ 20 indivíduos de *A. argillacea* estão representadas graficamente na Figura 12.

Tabela 6 – Característica dos dez locos microssatélites obtidos para *Alabama argillacea*: Sequência do primer forward (F) e reverse (R)

Loco	Seqüências dos pares de primers (5' - 3')	Motivo	T (°C)	Amplitude alélica (bp)	N ^a	H _O ^b	H _E ^c	PIC ^d	P value EHW ^e
Aar06	F: GTTTCACGACCTACTAGCAAGC R: GGGTTTCGTTATTCGTCATCT	(CA) ₁₃	60	196 – 200	3	0,000	0,420	0,363	0,0016*
Aar10	F: ACTTCGCTGTCCGTCAGTC R: GCTATCACAGTTCTTGCGACA	(AC) ₈	56	269 – 273	3	0,300	0,347	0,311	1,0000
Aar11	F: CGGACACGTTTTGTTATATTGG R: CTTAACGCACTCTCTCTCTCG	(AG) ₃₂ (GA) ₁₀	56	196 – 270	11	0,333	0,920	0,870	0,0062
Aar13	F: TTTGTTCCATCTAAGGCTACG R: GCGGACTATGAGAGTGAAGGA	(ATA) ₄	60	250 – 259	2	0,000	0,114	0,104	0,0303
Aar14	F: TCACACTGATGCGTGATTGA R: TCGATTGAAAACCTCCTCCT	(GT) ₉	60	206 – 212	4	0,412	0,586	0,484	0,3280
Aar16	F: GTCCCTATGCGTGGACAGTA R: TTCTGGCTAGTTTTGTTCCCTA	(CT) ₁₀ CACT(ACTC) ₃	62	230 – 240	5	0,579	0,815	0,760	0,6478
Aar17	F: CTTGCGGTTTGAGGCTCT R: TCCATTAAAGCGATCAATGC	(CA) ₉ A(AC) ₅	60	178 – 182	3	0,350	0,304	0,265	1,0000
Aar19	F: GCCAGGTTTCTCTCTCTCGAT R: TGACGCACACACACAAAGAG	(TG) ₇ (TC) ₅ (TG) ₅	60	194 – 242	6	0,632	0,735	0,668	0,1682
Aar21	F: CACGAAAATGCTTACAACACG R: CAAAGGGTCAAAGTCAAACC	(GAA) ₆	60	180 – 186	3	0,500	0,422	0,345	1,0000
Aar23	F: TTGACTATGGGTGGAGTGAGG R: TGGTCAGACTTCCTGCACAT	(CA) ₇	60	310 – 312	2	0,400	0,467	0,351	0,6331

^a Número de alelos encontrados no loco.

^b Heterozigosidade observada.

^c Heterozigosidade esperada.

^d Conteúdo de informação polimórfica.

^e Grau de significância ao teste exato de Fisher para Equilíbrio de Hardy-Weinberg – Correção de Bonferroni $\alpha=0,005$.

* Não se ajusta as proporções do Equilíbrio de Hardy – Weinberg.

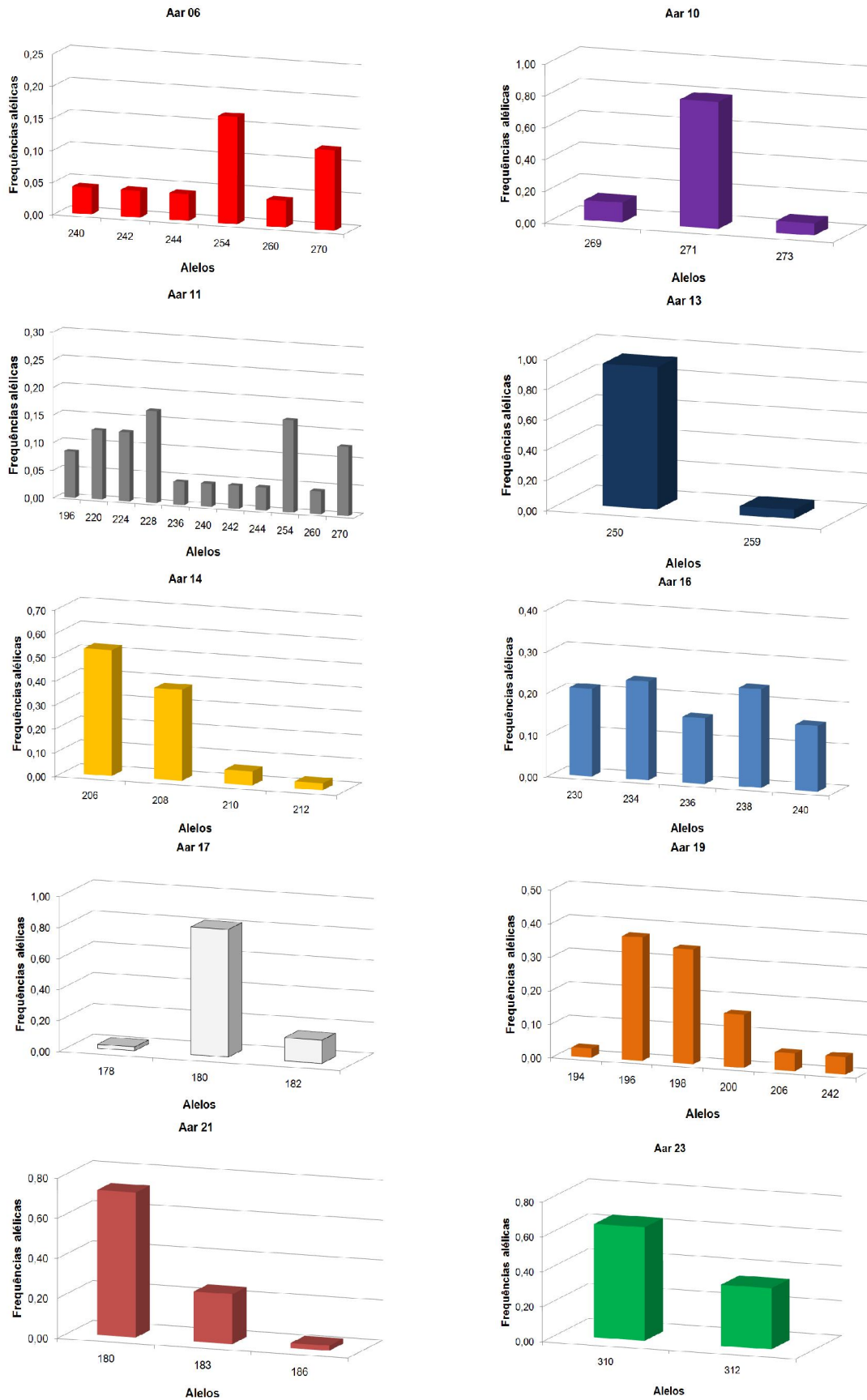


Figura 12 – Histograma das freqüências alélicas dos dez locos microssatélites, estimados para ≈20 indivíduos de *A. argillacea*. O eixo Y indica a freqüência alélica e o eixo X indica o tamanho do alelo, em pares de base

2.3.3 Estudo da variabilidade genética e estrutura populacional

2.3.3.1 Variabilidade genética intrapopulacional

Através do uso de marcadores moleculares microssatélites foi possível observar variabilidade genética nas populações de *A. argillacea* estudadas. O número de alelos encontrados nos dez locos microssatélites isolados variou de dois a 23. No total foram identificados 71 alelos. A heterozigosidade observada média entre os locos foi de 0,541, variando de 0,205 a 0,938. Já a heterozigosidade esperada média entre os locos foi de 0,396, com variação de 0,173 a 0,717. O índice de fixação intrapopulacional, também chamado de coeficiente de endogamia foi de 0,268, com variação de -0,039 a 0,736. (Tabela 7)

Já em relação a estimativas de variabilidade genética obtidas para cada população, o número médio de alelos encontrados, foi de 4,281, variando de 3,70 alelos ao máximo de cinco alelos. A heterozigosidade observada e esperada média foram 0,523 e 0,395, respectivamente. A maior heterozigosidade observada foi a da população MT-3 e a menor foi a da população MS-1. Já em relação à heterozigosidade esperada, o maior valor foi o da população GO-1 e o menor valor foi da população GO-2. Os índices de fixação intrapopulacional (f) estimados para cada população através das heterozigosidades (H_O e H_E), estão apresentados na tabela 8. O valor médio foi de 0,017, com variação de 0,098 a 0,405 (Tabela 8).

Através do teste exato de Fisher foi possível verificar quais populações não se ajustaram as proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco estudado. Podemos ver que todas as populações estão em EHW para a maioria dos locos. Contudo podemos notar que o teste Exato de Fischer deu significativo ($p < 0,005$) para a maioria das populações no loco Aar06, na população MT-1 para o loco Aar11, nas populações MS-2 e MT-3 para o loco Aar14 e apenas na população MT-3 para o loco Aar16 (Tabela 9). O teste para verificar se existe desequilíbrio de ligação entre os locos, nas populações estudadas, foi feito com o valor de significância (p -value) para o nível nominal de 5% de 0,0001. Nenhum desequilíbrio foi detectado entre todos os locos ($p > 0,0001$).

Tabela 7 – Estimativas de variabilidade genética para os locos microssatélites utilizados em *A. argillacea*

Loco	A ^a	H _O ^b	H _E ^c	f ^d
Aar06	7,0	0,657	0,173	0,736
Aar10	7,0	0,429	0,369	0,140
Aar11	23,0	0,938	0,451	0,519
Aar13	3,0	0,205	0,178	0,130
Aar14	5,0	0,590	0,369	0,376
Aar16	6,0	0,735	0,575	0,218
Aar17	5,0	0,255	0,265	-0,039
Aar19	9,0	0,740	0,717	0,031
Aar21	4,0	0,370	0,364	0,016
Aar23	2,0	0,491	0,495	-0,008
Média	7,1	0,541	0,396	0,268

^a Número de alelos total por loco polimórfico

^b Heterozigosidade observada por loco

^c Heterozigosidade esperada por loco

^d Índice de fixação intrapopulacional estimado para cada loco.

Tabela 8 – Estimativa de parâmetros descritivos de variabilidade genética nas onze populações de *A. argillacea*

População	N ^a	n _A ^b	H _O ^c	H _E ^d	f ^e
BA-2	11	4,300	0,436	0,548	0,211
BA-3	20	4,200	0,350	0,513	0,321
BA-4	22	4,100	0,441	0,489	0,098
GO-1	20	4,500	0,434	0,559	0,225
GO-2	24	4,200	0,355	0,474	0,255
MS-1	20	4,500	0,326	0,547	0,405
MS-2	24	4,300	0,389	0,513	0,245
MT-1	20	3,700	0,376	0,523	0,281
MT-2	24	4,400	0,367	0,531	0,314
MT-3	24	5,000	0,471	0,540	0,131
PB-1	24	3,900	0,395	0,511	0,230
Média		4,281	0,523	0,395	0,248

^a Número de indivíduos amostrados.

^b Número médio de alelos por população.

^c Heterozigosidade observada média.

^d Heterozigosidade esperada média.

^e Índice de fixação intrapopulacional.

Tabela 9 – Probabilidade do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg

População	Aar06	Aar10	Aar11	Aar13	Aar14	Aar16	Aar17	Aar19	Aar21	Aar23
BA-2	0,015	0,537	0,157	1,000	0,520	0,537	1,000	0,554	1,000	0,554
BA-3	0,001	1,000	0,006	0,030	0,328	0,648	1,000	0,168	1,000	0,633
BA-4	0,130	0,353	0,076	0,025	0,659	0,034	1,000	0,213	1,000	1,000
GO-1	0,003	0,149	0,058	1,000	0,281	0,644	0,538	0,149	0,276	1,000
GO-2	0,000	0,365	0,019	1,000	0,695	1,000	1,000	1,000	0,164	0,391
MS-1	0,002	0,149	0,007	0,151	0,021	0,645	1,000	0,597	1,000	0,543
MS-2	0,000	1,000	0,012	1,000	0,005*	0,328	0,272	1,000	0,235	0,038
MT-1	0,004	0,619	0,002	1,000	0,656	0,603	1,000	0,647	1,000	0,367
MT-2	0,040	0,113	0,438	1,000	0,048	0,199	0,525	0,684	0,151	0,150
MT-3	0,089	0,538	1,000	0,056	0,002	0,002	0,000	0,387	0,538	1,000
PB-1	0,000	0,501	0,075	0,501	0,015	0,684	0,398	1,000	1,000	1,000

Em negrito: não se ajusta as proporções do Equilíbrio de Hardy – Weinberg com grau de significância $\alpha = 0,005$.

Esses valores representam as estimativas médias desses parâmetros nas populações e servem para mostrar a variabilidade genética encontrada nos locos microssatélites isolados. As estimativas de índice de fixação intrapopulacional obtidas para cada loco representam as diferenças entre as frequências de heterozigotos reais encontradas nas populações, em relação à frequência de heterozigotos esperadas, baseadas no número de alelos e nas frequências desses, por loco e por população. Diferenças significativas entre H_0 e H_E são influenciadas por eventos que alteram a frequência dos genótipos homozigotos em relação à frequência dos genótipos heterozigotos, como a endogamia e a seleção natural (HARTL; CLARK, 2007). Como não podemos ter certeza sobre a ligação desses locos microssatélites com alelos de genes que possam estar aumentando o valor adaptativo de determinados indivíduos na população, pela forma que esses microssatélites foram isolados, apenas podemos então inferir que os valores de índice de fixação intrapopulacional podem ter sido influenciados por eventos de endogamia. Entretanto, pelos dados apresentados na tabela 7, podemos descartar essa possibilidade, pois existe uma grande variação nesses valores. Podemos então aceitar que o número de indivíduos utilizados não foi

suficiente para amostrar toda variabilidade genética dos locos Aar06, Aar11, Aar14 e Aar16.

O índice de fixação intrapopulacional é determinado pela variação das estimativas dos parâmetros H_O e H_E . Quanto maior as diferenças entre essas estimativas na população, maior será o valor de f estimado, uma vez que as estimativas de H_E são obtidas através das frequências alélicas e informa sobre a quantidade de heterozigotos esperados na população em relação à frequência encontrada dos alelos, e o parâmetro H_O informa sobre o número total de heterozigotos contados na população. Havendo então uma grande diferença entre H_E em relação à H_O , essa deve estar relacionada à endogamia, pois essa aumenta a frequência de genótipos homozigotos em detrimento aos heterozigotos na população. Nesse caso, como os valores de índice de fixação intrapopulacional são obtidos através desses valores estimados para cada loco e calculado então o valor médio para cada população, podemos considerar então que valores altos indicam então haver certo grau de endogamia na população. Entretanto, não podemos afirmar com certeza, pois não podemos descartar a possibilidade de erro amostral.

Para os locos Aar14 e Aar16 os desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg podem estar relacionados a problemas de amostragem, não estando relacionados com desvios causados pela endogamia, uma vez que para os outros locos essas populações não apresentaram desvios significativos. Já em relação ao loco Aar06 em que a maioria das populações apresentou desvios no EHW, esse fato deve estar relacionado com a presença de alelos nulos, que podem ter determinado um excesso de genótipos homozigotos levando assim os desvios no EHW observados. Alelos nulos ocorrem quando a região que flanqueia os microssatélites sofre mutação na porção de anelamento do *primer*, não permitindo assim que esse se ligue corretamente (DAKIN; AVISE, 2004). Com isso não ocorre à amplificação do segmento que contem o microssatélite. A consequência disso pode ser vista em uma amostra de uma população, onde uma parte dos indivíduos tem seus alelos amplificados e outra parte não. Outra possível causa da ocorrência de alelos nulos seria a amplificação diferencial dos alelos de tamanhos diferentes (WATTIER et al., 1998), e a erros de genotipagem, que por motivos relacionados às condições da eletroforese, os dois alelos por

possuírem tamanhos poucos discrepantes acabam sendo lidos como sendo apenas um só. Em ambos os casos ocorrem erros de genotipagem que levam a um excesso de homocigotos na amostra, determinando os desvios no EHW.

Para testar a presença de alelos nulos nos locos e nas populações foi então utilizado o programa Micro-Checker. Esse programa testa a presença de alelos nulos comparando as frequências observadas dos alelos, com a esperada sobre equilíbrio de Hardy-Weinberg. Foram então detectados a presença de alelos nulos, em todas as populações, para os locos Aar06 e Aar11. Contudo, esses não apresentaram desvios no EHW em todas as populações e, portanto, foram mantidos nas análises, por serem locos informativos.

2.3.3.2 Variabilidade interpopulacional e estrutura genética populacional

Através das estimativas das frequências alélicas foi possível observar a diversidade existente em cada loco estudado, nas onze populações de *A. argillacea*. Podemos afirmar que *A. argillacea* apresenta grande variabilidade genética, que pode ser confirmada pela diversidade alélica encontrada. Foram identificados 71 alelos totais existentes nas populações estudadas sendo que 90,15% são compartilhados entre todas as populações (Tabela 10). Através estimativa de alelos exclusivos, pode se verificar que apenas 9,85%, ou seja, apenas sete alelos são restritos a algumas populações (Tabela 11). Das 11 populações, seis possuem alelos exclusivos. Contudo, dentre essas populações, o número de alelos exclusivos é baixo, variando de um ao máximo de dois (GO-2). Portanto a maioria dos alelos é compartilhada entre todas as populações estudadas indicando assim, de forma indireta, que existe fluxo gênico entre essas populações. As estimativas de alelos exclusivos indicam que apenas o loco Aar06 possui 14,3% de seus alelos restritos a população MS-1. O loco Aar11 possui 8,7% de seus alelos restritos a duas populações, GO-1 e GO-2. Os locos Aar14 e Aar16 possuem cada um 20% de alelos de seus exclusivos nas populações MT-1 e MS-2, respectivamente. Já os locos Aar19 e Aar21, possuem 11,1% e 25% de alelos exclusivos, respectivamente.

Tabela 10 – Frequência alélica encontrada em cada loco microssatélite encontrada em cada população de *A. argillacea*

(continua)

Loco	BA-2	BA-3	BA-4	GO-1	GO-2	MS-1	MS-2	MT-1	MT-2	MT-3	PB-1
Aar06											
N	8	12	22	10	23	9	13	9	18	13	24
196	-	0,083	0,045	-	0,022	-	0,077	-	0,139	0,231	-
	0,125	0,167	-	0,100	-	-	-	0,111	0,167	0,115	-
200	0,750	0,750	0,182	0,700	0,152	0,444	0,423	0,333	0,389	0,115	0,292
202	-	-	0,682	0,100	0,804	0,444	0,462	0,278	0,306	0,500	0,604
208	0,125	-	0,045	-	0	-	-	-	-	0,038	0,104
210	-	-	0,045	0,100	0,022	-	0,038	0,278	-	-	-
212	-	-	-	-	-	0,111	-	-	-	-	-
Aar10											
N	11	20	20	20	23	20	18	20	24	22	24
213	0,091	-	-	0,025	-	0,025	-	-	0,042	-	-
217	-	-	-	0,050	-	0,025	-	-	0,021	-	-
265	-	-	0,050	0,150	0,065	0,050	0,028	0,025	0,083	0,045	0,063
269	0,182	0,125	0,050	0,100	0,152	0,100	0,111	0,100	0,042	0,091	0,042
271	0,636	0,800	0,850	0,650	0,696	0,650	0,750	0,700	0,750	0,795	0,833
273	0,091	0,075	0,050	0,025	0,087	0,150	0,083	0,175	0,063	0,045	0,063
275	-	-	-	-	-	-	0,028	-	-	0,023	-
Aar11											
N	10	12	8	9	15	11	9	11	11	15	13
192	-	-	-	-	-	0,091	0,111	-	0,091	-	-
196	-	0,083	-	-	-	-	0,167	-	0,091	-	-
218	-	-	-	0,056	-	0,091	0,056	-	-	0,033	-
220	0,100	0,125	0,063	0,167	-	0,091	0,056	0,182	0,136	0,067	0,192
224	0,100	0,125	0,125	-	0,067	-	-	-	-	0,033	-
228	0,100	0,167	0,313	-	-	0,182	-	-	0,045	0,100	0,231
230	-	-	-	0,056	0,067	-	0,167	0,182	-	0,033	0,154
236	0,100	0,042	-	-	0,100	-	0,111	0,091	0,227	0,133	-
238	0,100	-	-	-	-	-	-	-	-	0,033	-
240	-	0,042	-	0,278	-	0,182	-	-	-	-	-
242	0,05	0,042	-	0,056	-	-	-	-	-	-	-
244	0,15	0,042	0,063	-	-	-	-	-	0,091	-	-
253	-	-	-	0,056	-	-	-	-	-	-	-
254	-	0,167	-	0,111	0,033	0,091	-	-	-	0,033	0,038
258	0,100	-	0,063	-	0,067	-	0,111	0,091	0,045	-	0,077
260	0,100	0,042	0,125	0,056	0,167	0,091	0,222	0,273	0,045	0,167	-
270	-	0,125	-	-	0,067	0,091	-	-	0,091	0,033	-

Tabela 10 – Freqüência alélica encontrada em cada loco microssatélite encontrada em cada população de *A. argillacea*

(continuação)

Loco	BA-2	BA-3	BA-4	GO-1	GO-2	MS-1	MS-2	MT-1	MT-2	MT-3	PB-1
Aar11											
N	10	12	8	9	15	11	9	11	11	15	13
284	-	-	-	0,167	0,033	-	-	0,091	-	0,067	0,038
290	0,100	-	0,188	-	0,100	0,091	-	-	0,045	0,133	0,077
298	-	-	-	-	0,133	-	-	0,091	0,091	0,067	0,115
330	-	-	0,063	-	-	-	-	-	-	0,067	-
332	-	-	-	-	0,100	-	-	-	-	-	0,077
334	-	-	-	-	0,067	-	-	-	-	-	-
Aar13											
N	11	17	20	20	24	20	22	20	24	22	24
247	0,045	-	-	-	-	0,025	0,023	-	-	0,045	0,042
250	0,818	0,941	0,95	0,925	0,833	0,9	0,841	0,95	0,917	0,841	0,833
259	0,136	0,059	0,05	0,075	0,167	0,075	0,136	0,05	0,083	0,114	0,125
Aar14											
N	10	17	21	12	24	18	15	18	24	23	24
198	-	-	-	-	-	-	-	0,056	-	-	-
206	0,45	0,529	0,405	0,500	0,458	0,500	0,767	0,556	0,563	0,565	0,688
208	0,400	0,382	0,381	0,208	0,521	0,306	0,167	0,167	0,292	0,348	0,208
210	0,100	0,059	0,214	0,208	0,021	0,194	-	0,222	0,146	0,065	0,104
212	0,05	0,029	-	0,083	-	-	0,067	-	-	0,022	-
Aar16											
N	11	19	22	18	21	19	17	15	8	13	23
220	0,045	-	-	-	-	0,026	-	-	-	-	-
230	0,182	0,211	0,091	0,222	0,143	0,132	0,029	0,300	0,188	0,077	0,087
234	0,227	0,237	-	0,083	-	0,237	0,235	-	0,500	0,269	-
236	0,409	0,158	0,295	0,417	0,381	0,342	0,206	0,467	-	0,423	0,413
238	0,136	0,237	0,591	0,139	0,476	0,237	0,529	0,200	0,313	0,192	0,457
240	-	0,158	0,023	0,139	-	0,026	-	0,033	-	0,038	0,043
Aar17											
N	11	20	22	19	24	20	18	18	19	20	24
178	-	0,025	0,045	0,079	-	0,025	0,028	-	0,026	0,075	0,021
180	0,864	0,825	0,818	0,789	0,979	0,800	0,861	0,972	0,763	0,900	0,854
182	0,136	0,150	0,136	0,132	0,021	0,175	0,028	0,028	0,026	0,025	0,125
190	-	-	-	-	-	-	0,028	-	-	-	-
200	-	-	-	-	-	-	0,056	-	0,184	-	-

Tabela 10 – Frequência alélica encontrada em cada loco microssatélite encontrada em cada população de *A. argillacea*

(conclusão)

Loco	BA-2	BA-3	BA-4	GO-1	GO-2	MS-1	MS-2	MT-1	MT-2	MT-3	PB-1
Aar19											
N	11	19	22	20	22	18	17	20	22	22	23
192	0,045	-	0,091	-	0,023	0,056	0,029	0,100	-	0,136	0,043
194	0,045	0,026	0,068	0,05	0,068	0,056	0,059	-	0,091	0,023	-
196	0,091	0,368	0,409	0,300	0,477	0,306	0,412	0,375	0,455	0,386	0,457
198	0,409	0,342	0,182	0,350	0,295	0,333	0,324	0,350	0,341	0,227	0,326
200	0,227	0,158	0,068	0,125	0,023	0,139	0,029	0,050	0,045	0,114	0,065
204	0,045	-	0,023	0,025	-	0,028	-	-	0,023	-	-
206	-	0,053	-	-	-	-	-	-	-	-	-
240	-	-	0,159	0,05	0,114	-	0,147	0,025	0,045	0,114	0,109
242	0,136	0,053	-	0,100	-	0,083	-	0,100	-	-	-
Aar21											
N	11	20	22	17	23	20	19	19	24	19	23
177					0,022						
180	0,864	0,725	0,818	0,735	0,804	0,850	0,763	0,711	0,813	0,789	0,652
183	0,091	0,250	0,068	0,235	0,152	0,125	0,211	0,289	0,167	0,158	0,239
186	0,045	0,025	0,114	0,029	0,022	0,025	0,026		0,021	0,053	0,109
Aar23											
N	11	20	21	20	24	20	23	20	24	23	24
310	0,591	0,65	0,405	0,525	0,604	0,750	0,543	0,475	0,688	0,522	0,521
312	0,409	0,35	0,595	0,475	0,396	0,760	0,457	0,525	0,313	0,478	0,479

Tabela 11 – Alelos privados obtidos em 70 alelos de marcadores microssatélites. Loco, alelo, frequência que ocorrem na população que são encontrados e população de origem

População	Alelo (pb)	Frequência	Loco
MS-1	212	0,111	Aar06
GO-2	334	0,067	Aar11
GO-1	253	0,056	Aar11
MT-1	198	0,056	Aar14
MS-2	190	0,028	Aar17
BA-3	206	0,053	Aar19
GO-2	177	0,022	Aar21

O índice de fixação intrapopulacional da espécie, estimado pelo processo da análise de variância, com base nos dez locos microssatélites, 71 alelos e nas onze populações apresentou valor de 0,244 (IC 95% de 0,093 a 0,418). A estimativa de f não foi significativamente igual a zero, mostrando haver certo grau de endogamia intrapopulacional. Esse valor de endogamia intrapopulacional médio indica haver certo grau de cruzamento entre parentes, e também é o componente que mais influência a endogamia total entre as populações estudadas. Já o F_{ST} estimado a partir do parâmetro theta (θ) (WEIR; COCKERHAM, 1984) foi de 0,036, com (IC 95% de 0,007 a 0,080). A estimativa de R_{ST} foi de 0,040. A estimativa de θ total foi significativamente igual a zero, e indicam ausência de estruturação genética. O parâmetro $N_e m$ foi estimado com base na estimativa de θ , e resultou no valor de 6,694 indivíduos adultos migrantes em condições de se acasalar por geração (Tabela 12).

Para refinar as estimativas de θ com o objetivo de observar o grau de diferenciação entre pares de populações foi então estimado o θ par-a-par. Podemos observar que os valores dessa estimativa variaram de -0,0019 a 0,1082. As diferenças calculadas entre pares de populações estimativas não foram significativamente diferentes de zero para a maioria das interações, indicando não haver diferenciação genética entre as populações, mesmo entre as que estão mais distantes geograficamente. Entretanto apenas dois valores θ par-a-par foram superiores a 0,1 e ambos foram obtidos entre a população GO-2 e as duas populações da Bahia, BA-2 e BA-3, e todas as estimativas com a população GO-1 não foram possíveis calcular o valor de significância, apesar das não haver diferenciação significativas, que podem ser observadas pelos baixos valores de θ estimados. (Tabela 13).

Tabela 12 – Estimativa das estatísticas F de Wright, através da análise de variância das frequências alélicas e do número de migrantes por geração ($N_e m$) em onze populações naturais de *A. argillacea*. Intervalo de confiança (IC) de 95% de probabilidade

	f	F	θ	R_{ST}	*N_em
Estimativa	0,244	0,271	0,036	0,040	6,694
Limite Superior (IC 95%)	0,400	0,435	0,074		-
Limite Inferior (IC 95%)	0,073	0,090	0,008		-

*Número médio de migrantes por geração calculada através da estimativa de FST.

Tabela 13 – Estimativa do parâmetro θ par-a-par entre as populações

	BA-2	BA-3	BA-4	GO-1	GO-2	MS-1	MS-2	MT-1	MT-2	MT-3	PB-1
BA-2											
BA-3	-0,0095										
BA-4	0,0978	0,0971									
GO-1	-0,0068	-0,0019	0,0878								
GO-2	0,1045	0,1082	0,0182	0,0974							
MS-1	0,0029	0,0105	0,0380	0,0022	0,0362						
MS-2	0,0526	0,0421	0,0394	0,0422	0,0308	0,0142					
MT-1	0,0320	0,0440	0,0571	0,0036	0,0522	0,0196	0,0201				
MT-2	0,0347	0,0140	0,0737	0,0443	0,0680	0,0059	0,0086	0,0484			
MT-3	0,0500	0,0570	0,0231	0,0495	0,0171	0,0108	0,0136	0,0193	0,0226		
PB-1	0,0752	0,0669	0,0104	0,0501	0,0202	0,0211	0,0065	0,0231	0,0550	0,0147	

NS: Não significativo ($P < 0,05$).

** não foi possível calcular.

Os valores de F_{ST} obtidos através do estimador θ (WEIR; COCKERHAM, 1984) tanto o total, quanto os par-a-par, ficaram entre o intervalo de 0 e 0,10, com predominância de valores abaixo de 0,5, indicando que a estruturação genética entre as populações de *A. argillacea* estudadas ficou entre baixa e moderada, sendo a baixa estruturação predominante. Segundo Hartl e Clark (2007) valores de F_{ST} entre 0 e 0,05 indicam baixa estruturação genética; valores entre 0,05 e 0,15 indicam estruturação genética moderada, valores entre 0,15 e 0,25 estão relacionados à estruturação alta e valores acima de 0,25 indicam uma forte estruturação genética.

A estimativa de R_{ST} , que assume outro modelo mutacional para estimar o grau de diferenciação entre as populações corroborou com o resultado estimado para F_{ST} . As estimativas de F_{ST} geralmente diferem das estimativas de R_{ST} , uma vez que cada uma assume um modelo diferente de mutação dos alelos. O parâmetro F_{ST} assume o modelo de Alelos Infinitos (IAM), enquanto que o parâmetro R_{ST} baseia – se no modelo de mutação *stepwise* (SMM), que também é o modelo mais indicado para estimar diferenciação genética entre populações, uma vez que é o modelo que mais próximo chega da explicação da forma como os microssatélites evoluem. Sendo assim, espera – se que a estimativa de R_{ST} seja maior que a do F_{ST} (SLATKIN, 1995). Nos resultados obtidos, pode – se notar que a estimativa de R_{ST} foi maior que a do F_{ST} , entretanto não podemos afirmar que foram diferentes significativamente. Isso se deve ao fato de que, o modelo de SMM ser capaz de explicar a evolução de todos os locos microssatélites, uma vez que outras formas de evolução dos mesmos podem ocorrer (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002). Sendo assim, para o calculo de fluxo gênico médio entre as populações, foi utilizado o a estimativa do parâmetro F_{ST} .

Já a estimativa de fluxo gênico, indicou haver uma taxa alta de migração total entre as populações. Govindajaru (1989) distinguiu três níveis de fluxo gênico: alto $N_e m > 1$, Intermediário ($0,25 < N_e m < 0,99$) e baixo $N_e m < 0,25$. Em relação à ocorrência de deriva genética, essa causa diferenciação populacional se $N_e m < 1$, mas não resultará se $N_e m > 1$ (SLATKIN; BARTON, 1989). A estimativa obtida nesse estudo foi de (6,694), indicando haver alto fluxo gênico entre as populações sendo capaz, portanto, de impedir que haja perdas significativas na variabilidade genética determinada por deriva entre as populações.

Os baixos valores das estatísticas F de Wright, da estimativa de e e R_{ST} , das estimativas de diferenciação entre cada par de populações e o alto valor de $N_e m$ podem ser indicativos de que a espécie no Brasil possui estrutura de metapopulação com certo alto grau de panmixia (acasalamentos ao acaso). Isso sem se deve ao fato de fluxo gênico alta ser capaz de manter a coesão entre todas as populações, evitando assim as suas diferenciações. Para testar se existe algum grau de estruturação genética relacionado com a distância geográfica, foram então utilizadas duas abordagens para análise de dados. Primeiramente foram estimadas as distâncias genéticas segundo modelo de Nei (NEI, 1978) e construído o dendrograma utilizando o critério de agrupamento UPGMA, e assim inferir sobre possível diferenciação genética entre as populações. E a outra abordagem, baseada em estatística Bayesiana foi utilizada para observar se existe estruturação genética entre as populações.

As distâncias genéticas de Nei (1978) calculadas entre as populações variaram de 0,0078 a 0,1367. Esta análise revela que as populações estudadas não apresentam distâncias genéticas significativas. Contudo, os resultados obtidos com o cálculo das distâncias de Nei corroboram com os valores obtidos com as estimativas de F_{ST} par-a-par, e mostram que os valores mais significativos de distâncias foram entre a população GO-2 e as populações BA-2 e BA-3. Além disso, podemos notar que a distância entre BA-2 e BA-4 foi alta apesar de ambas estarem próximas geograficamente (Tabela14).

Podemos notar que não houve agrupamento das populações por estado. Uma vez que as distâncias genéticas entre as populações não são capazes de determinar essa resolução de agrupamento. Percebe – se que a resolução dos agrupamentos é baixa, evidenciada pela baixa consistência dos nós obtidos por reamostragem por *bootstrap* (Figura 13). Essa baixa resolução indica não haver diferenciações significativas entre populações. Entretanto apenas podemos observar consistência no primeiro nó, que agrupou as populações por safra. É importante ressaltar que as distâncias genéticas são de pequena amplitude e que dessa forma, determinam essa baixa resolução.

Tabela 14 – Distâncias genéticas de NEI (1978), calculadas entre as populações

	BA-2	BA-3	BA-4	GO-1	GO-2	MS-1	MS-2	MT-1	MT-2	MT-3	PB-1
BA-2											
BA-3	0,0078										
BA-4	0,1367	0,1065									
GO-1	0,0101	0,0024	0,1113								
GO-2	0,1352	0,1155	0,0236	0,1194							
MS-1	0,0257	0,0289	0,0562	0,0180	0,0459						
MS-2	0,1026	0,0612	0,0498	0,0653	0,0389	0,0485					
MT-1	0,0530	0,0519	0,0732	0,0192	0,0630	0,0370	0,0374				
MT-2	0,1100	0,0590	0,0922	0,0828	0,0834	0,0580	0,0224	0,0749			
MT-3	0,0884	0,0810	0,0272	0,0793	0,0206	0,0305	0,0232	0,0323	0,0367		
PB-1	0,1058	0,0702	0,0168	0,0658	0,0263	0,0329	0,0159	0,0356	0,0737	0,0216	

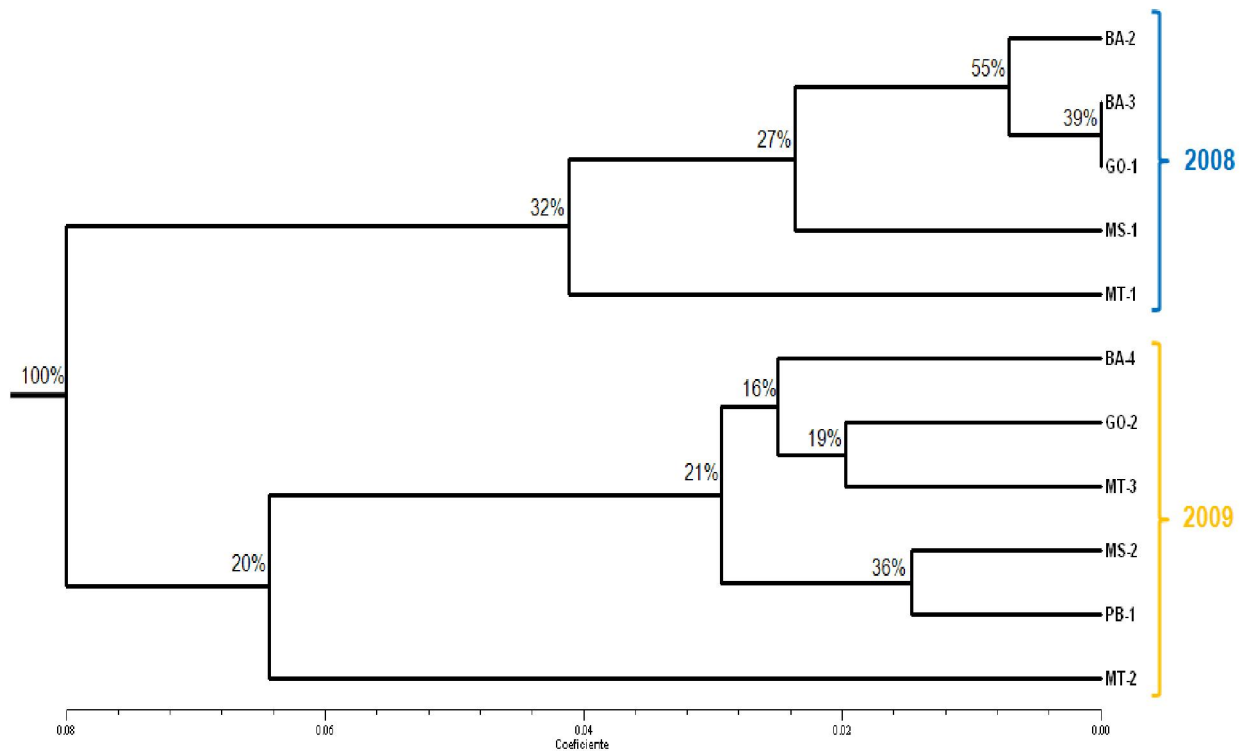


Figura 13 – Padrão de divergência genética entre as populações de *A. argillacea*, definido pelo agrupamento UPGMA, a partir das distâncias genéticas de Nei (1978). Correlação cofenética igual a 0,99%. Para testar a consistência dos nós foram realizadas 1000 reamostragens por *bootstrap*

Através da análise de estrutura populacional, realizada pelo programa Structure 2.2 (PRITCHARD et al., 2002) utilizando o modelo *admixture*, que considera que as populações *a priori* mantêm certa coesão genética; e determinando haver correlação entre as populações (o parâmetro *correlated*) indicou não haver estruturação espacial da variabilidade genética entre as populações estudadas.

Dentre as possibilidades para o valor de K, que variaram de 1 a 16, o valor obtido através do método proposto por Evanno (2005) foi de dois grupos (Figura 14). A partir desse valor de K, foi então obtida à melhor saída de dados para esse parâmetro, entre as cinco repetições de permutações. Pode se observar através da análise bayesiana que não existe estruturação geográfica da variabilidade genética, entretanto podemos observar uma tendência à estruturação temporal dessa variabilidade (Figura 15).

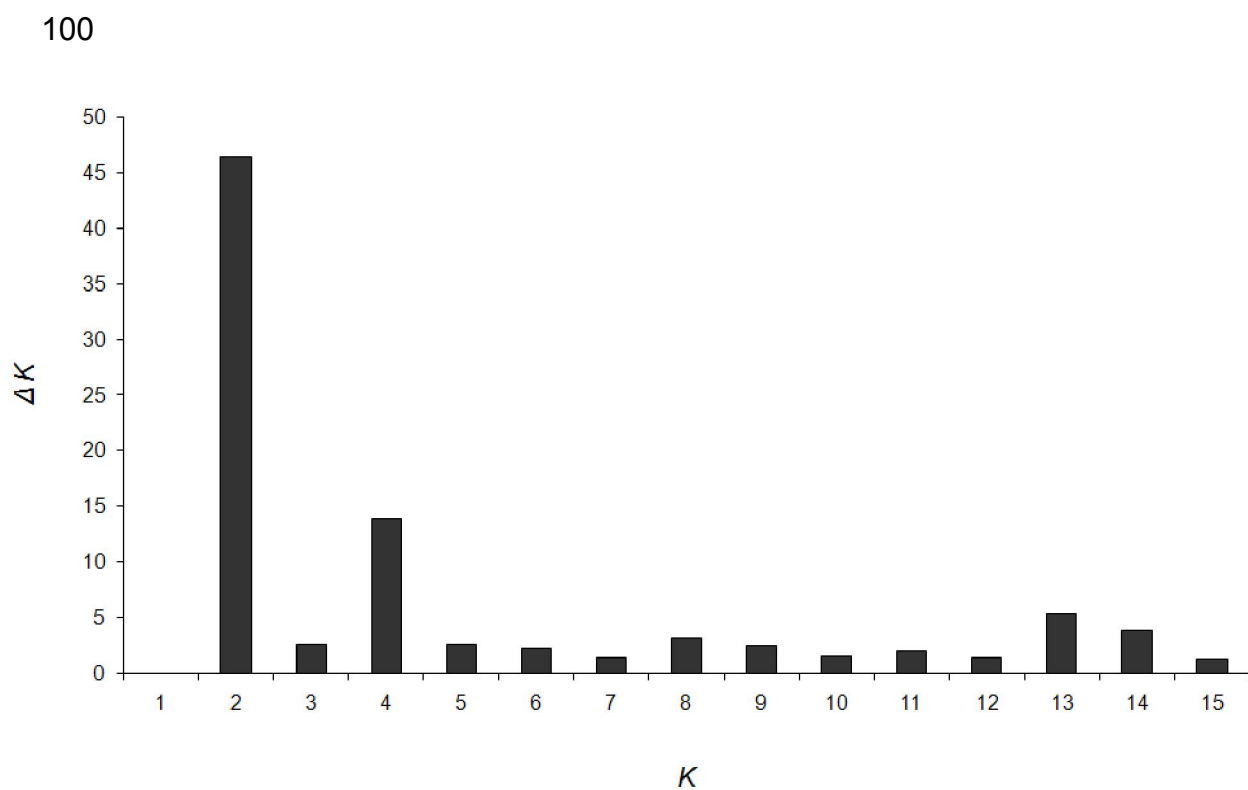


Figura 14 – Resultado da análise obtida para a determinação do valor de agrupamento que melhor representa a variabilidade genética das populações de *A. argillacea* estudadas: K variando de 1 a 15, com cinco repetições cada K , *burn in* de 50.000 permutações e seguidas por 500.000 permutações MCMC

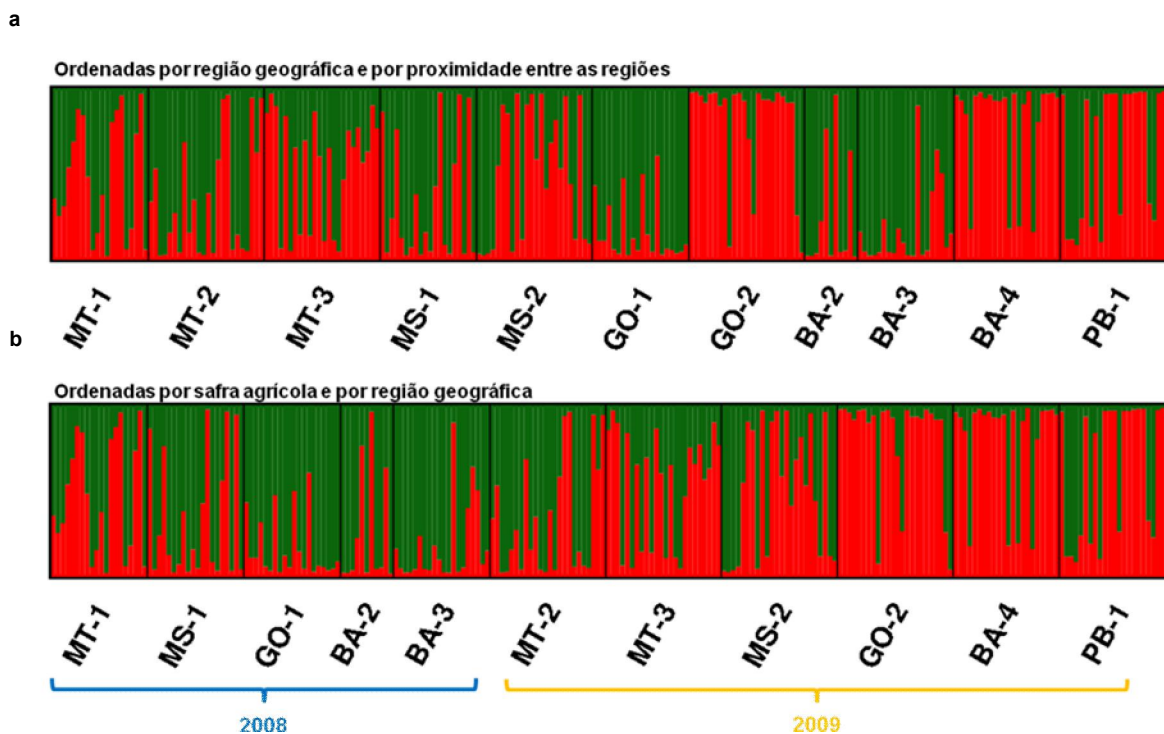


Figura 15 – Resultado obtido para $K=2$, através do programa Structure 2.2. O número de K que melhor representa o conjunto de dados determinou a formação de dois grupos, que se distinguem apenas pelo ano em que as populações desses grupos foram coletadas; a) as populações foram ordenadas segundo suas proximidades geográficas, e b) foram ordenadas segundo ano de coleta. Essas informações não foram determinadas *a priori* para a análise bayesiana

Entretanto, como foi observada com o dendrograma construído a partir das distâncias genéticas de Nei (1978) (figura 13), a análise bayesiana também identificou certa diferenciação entre as populações determinadas pelo ano em que essas foram coletadas. Através desses dados podemos concluir que houve de 2008 para o ano de 2009, mudanças na variabilidade genética nas populações de *A. argillacea*. Apesar de estas distâncias serem de baixa amplitude elas indicam uma estruturação entre safra.

Foi feito a mesma análise novamente, entretanto, atribuindo o valor de $K=2$, repetindo cinco permutações, agrupando as populações da safra de 2008 em um grupo e as de 2009 em outro. O resultado obtido mostra que 70% dos indivíduos coletados no ano de 2008 formam um grupo 61% dos indivíduos da safra de 2009 formam outro grupo. Esses resultados indicam haver diferenciação entre os indivíduos coletados em anos diferentes.

Para verificar se existe diferenciação dentro de cada safra. Foi então feita análise separando as populações coletadas em anos diferentes. Foram atribuídos o mesmo modelo e os mesmos parâmetros, definidos para a análise anterior, apenas mudando a amplitude de variação de K , que foi de um a dez agrupamentos. Contudo através dessa análise não foi possível observar estruturação genética dentro de cada ano.

Por fim foi realizada a estimativa de θ , reunindo as populações de 2008 em um grupo e as populações de 2009 em outro. Foram estimados o θ dentro de cada grupo, e entre grupos. Os valores do parâmetro θ estimados dentro de cada grupo foram de: 0,010, com IC 95% de -0,001 a 0,026, para o grupo um, composto pelas populações BA-2, BA-3, GO-1, MS-1 e MT-2 (Safra 2008); e 0,024, com IC 95% de 0,005 a 0,044 para o grupo dois, formado pelas populações BA-4, GO-2, MS-2, MT-2, MT-3 e PB-1 (Safra 2009). Já o valor obtido entre grupos foi de 0,039, e IC 95% de 0,003 a 0,090, sendo essas estimativas diferentes de zero, evidenciando haver, apesar de baixa, certo grau de diferenciação entre safras.

Os resultados mostram que não existe estruturação genética significativa entre as populações das diferentes regiões geográficas. Contudo, foi possível observar certa diferenciação entre populações coletadas em anos diferentes. As mudanças na variabilidade genética observadas na safra de 2009 em relação à de 2008, podem estar ligadas a eventos estocásticos que alteram a aleatoriamente, ou a eventos determinísticos, como a seleção natural. Entretanto, apenas podemos inferir sobre ocorrência de mudanças aleatórias, uma vez que não é possível saber sobre a ocorrência de seleção natural nos locos estudados, pois a princípio os locos microssatélites neutros, ou seja, pois não é possível saber a ligação deles com genes funcionais.

A espécie se trata de um inseto herbívoro com alta capacidade de dispersão. Através de estudos com marcação e recaptura, e monitoramento da ocorrência da espécie na cultura do algodão, realizados anteriormente, foi possível determinar o estágio fenológico da planta que inicia a infestação da praga e em que época do ano essas infestações ocorrem. No Brasil, *A. argillacea* inicia sua dispersão na região nordeste, e segue sentido Sul, para a região Centro-Oeste, passando pelos estados de Mato-Grosso, Mato-Grosso do Sul, Goiás, até atingir o estado de São Paulo e Minas

gerais. Por fim, retorna, seguindo o plantio de algodão, a região de onde se iniciou a sua dispersão. Podemos inferir que esse comportamento esteja por si só, influenciando as mudanças nas frequências e na diversidade de alelos encontradas nos locos estudados, uma vez que a cada evento de dispersão um número reduzido de migrantes partem para colonizar outra região, determinando dessa forma, eventos de gargalho de garrafa, seguido de eventos de colonização com rápido crescimento populacional. Além disso, pelo fato de a cultura do algodão não ocorrer o ano todo, o período em que a planta não é cultivada, determina uma drástica redução populacional que conseqüentemente altera a variabilidade genética através de eventos de deriva. Dessa forma, a estruturação da variabilidade genética temporal pode ocorrer.

Todavia, não se pode descartar a possibilidade das práticas de manejo estar influenciando a diversidade genética de *A. argillacea*, uma vez que a mortalidade causada pelo uso de inseticidas, ou outra forma de controle que seja capaz de reduzir drasticamente a densidade populacional da praga, pode estar determinando também eventos de gargalho de garrafa.

Recentemente, muitos estudos examinando a diferenciação genética entre populações de lepidópteros - pragas, que são alvos do controle de plantas GM, têm sido feitos, com o objetivo de avaliar e entender processos que estejam determinando possíveis diferenciações genéticas entre as suas populações e quais seriam as implicações dessa diferenciação no manejo da resistência a toxina expressa por essas plantas. Muitos desses estudos tem se concentrado nas espécies de lepidópteros que causam os maiores prejuízos na agricultura e que apresentam maior risco para evolução da resistência. Uma das espécies mais estudadas nos Estados Unidos e Europa é *Ostrinia nubilalis* (Hübner), que causa grandes prejuízos na cultura do milho e é a principal praga alvo do controle do milho transgênico. Estudos populacionais com essa espécie já foram realizados com marcadores alozimáticos até marcadores baseados em polimorfismo de DNA (BOURGUET et al., 2000; KRUM et al., 2008; COATES et al., 2004; 2005). Entretanto, todos esses trabalhos mostraram não haver estruturação da variabilidade genética mesmo entre populações isoladas geograficamente. Contudo, muitos desses trabalhos erram na escolha dos marcadores moleculares, que não foram suficientemente robustos em acessar o polimorfismo

existente entre as populações, levando assim a resultados errôneos (MARÇON et al., 1999; COATES et al., 2004). Já outros trabalhos, fora inconclusivos, pois os autores não tomaram o cuidado em separar nas análises, insetos de *O. nubilalis* pertencente a raça feromônio “Z” da “E”, e insetos que possuem padrão de voltinismo diferentes (univoltina, bivoltina etc), e assim os resultados obtidos levaram a conclusões erradas a cerca da diferenciação genética. Bourguet e colaboradores, estudando a estruturação da variabilidade genética dessa espécie na França, não encontraram estruturação significativa entre populações distantes, mas encontrou entre populações próximas. Já Krum et al. (2009) estudando a variabilidade genética de *O. nubilalis* nos Estados Unidos, utilizando marcador AFLP e RAPD, não identificou diferenciação genética significativas entre a maior parte das populações, entretanto identificou uma estruturação moderada entre as populações do Norte em relação as do Sul, devido aos padrões de voltinismo encontrados entre essas regiões. Já Kim e colaboradores, (2009), estudando *O. nubilalis* nos Estados Unidos, tomando os devidos cuidados em não amostrar populações de raças feromônio diferentes e de mesmo padrão de voltinismo, e amostrando um grande número de insetos, dentro de um transecto Norte – Sul de 270 Km, que cruzou com outro transecto Leste – Oeste também de 270 Km, também não identificaram estruturação genética espacial significativa. Através das análises de F_{ST} par – a – par, e estudando a taxa de migração entre cada população puderam concluir que a dimensão geográfica da espécie é grande, e que mesmo ter havido uma expansão geográfica seguindo a expansão da agricultura, essa não determinou eventos de gargalos significativos. Sendo assim, os autores corroboram com a realização do monitoramento da resistência em escala geográfica, e que da mesma forma que o fluxo gênico pode retardar a evolução da resistência ele pode espalhar os alelos que conferem resistência, quando a resistência já estiver desenvolvida.

Outra espécie de inseto que também causa grandes prejuízos na agricultura mundial e também é alvo de plantas transgênicas é *Helicoverpa armigera* (Hübner). Os trabalhos de genética de populações mais importantes realizados com essa espécie são provenientes da Austrália, nestes foram utilizados marcadores microssatélites (SCOTT et al., 2006; ENDERSBY et al., 2006). Scott e colaboradores, estudando

populações de *H. armigera* coletadas na região do Vale Murrumbidge, Austrália, durante três safras agrícolas, identificou uma variação nos níveis de estruturação da variabilidade genética entre as safras. Durante a safra de 2001/2002, não foram identificadas diferenciações significativas entre as populações. Na safra 2002/2003, foram identificadas diferenciação significativas entre as populações, e, além disso, foram identificados três principais “tipos” genéticos: os primeiros tipos foram constituídos das primeiras duas gerações da espécie naquele, de indivíduos já presentes nos locais que estavam saindo da diapausa, e a progênie desses indivíduos; o segundo tipo foi constituído da terceira geração, além dos imigrantes externos; e o terceiro tipo foi determinado por outros imigrantes de outras regiões. E por fim, foi identificada alta estruturação genética na safra de 2002/2003 por conta da expansão da agricultura do algodão e pelo uso mais intenso de inseticidas sintéticos, que determinaram mudanças na dinâmica populacional da espécie na região. Outro trabalho, entretanto, não identificou estruturação genética entre populações de *H. armigera*, próximas e distantes. Esse trabalho foi realizado em duas regiões, uma próxima do Vale Murrumbidge, Austrália, outra região mais distante, em Queensland, Austrália. Foram coletadas 14 populações dentro dessas duas regiões, e sobre diferentes plantas hospedeiras. Apesar de essas variáveis poderem atuar determinando a distribuição da variabilidade genética e a direção do fluxo gênico, nenhuma estruturação foi evidenciada (ENDERSBY et al., 2006).

No Brasil, os trabalhos de variabilidade genética tem se concentrado em espécies pragas que são controladas pelas principais variedades de plantas transgênicas plantadas no país. Dentre essas espécies, *Spodoptera frugiperda* se destaca como sendo a de maior importância para o manejo da resistência, pois além de atacar plantas de milho, essa espécie também se alimenta de algodão, estando portanto exposta continuamente a toxinas do tipo Cry. Sendo assim, Martinelli et al. (2006) realizaram um estudo de variabilidade genética dessa praga visando responder se existe diferenciação genética entre populações de *S. frugiperda* na cultura do milho e na cultura do algodão, e se essa diferenciação está relacionada com a planta hospedeira, ou com a proximidade geográfica. Para tanto, foram utilizados marcadores RAPD, que apesar de ser um marcador dominante, em desuso atualmente, foi capaz de

responder essa pergunta. As populações de *S. frugiperda* estudadas formam grupos devido a proximidade espacial, ao invés da preferência pela planta hospedeira. Para confirmar esses resultados, foram utilizados em outro estudo, marcadores AFLP, que confirmaram os resultados anteriores (MARTINELLI et al., 2007)

Dentro do contexto do manejo da resistência de insetos a plantas GM, pode – se perceber a importância de estudos que buscam avaliar a variabilidade genética e entender quais processos determina a estruturação espacial dessa variabilidade. Sendo assim, os conhecimentos da área de genética de populações, cada vez mais estão conseguindo responder questões e auxiliar o direcionamento de pesquisas e a tomada de decisões para se delinear melhores práticas de manejo da resistência de insetos à táticas de controle populacional de pragas.

No presente estudo foi possível observar variabilidade na resposta das populações naturais de *A. argillacea* a toxina Cry1Ac. Entretanto essa variabilidade não está ligada a mudanças na suscetibilidade das populações.

Já o estudo de genética de populações, conseguiu identificar que não existem unidades evolutivas que da espécie, que possam estar passando por processos de diferenciação genética isoladamente, uma vez que não foi identificada estruturação da variabilidade genética da espécie no Brasil. Contudo foi identificada indícios de estruturação genética temporal, uma vez que as populações coletadas em duas safras apresentaram certa diferenciação genética.

Sendo assim, práticas de manejo da resistência de *A. argillacea* à toxina Cry1Ac necessitam ser realizadas uma vez que a espécie possui variabilidade natural na resposta à toxina, dessa forma a espécie mostrou ter potencial para a evolução da resistência. Além disso, práticas de manejo da resistência não devem ser decididas localmente ou regionalmente, mas em escala nacional, uma vez que não existe diferenciação genética entre as populações da espécie. Outro aspecto importante a ser considerado é o alto fluxo gênico encontrado entre as populações de *A. argillacea* no Brasil, e os eventos de gargalo genéticos seguidos de eventos fundadores. A alta coesão genética entre as populações, determinada pelo intenso fluxo gênico influencia dois aspectos importantes para a evolução da resistência: se por um lado, para os alelos que conferem resistência poderem se fixar em uma determinada população

demorará mais tempo, por outro, quando a resistência se tornar problema em um local, a dispersão desse alelo através do fluxo gênico, será rápida, atingindo rapidamente todas as populações da espécie no Brasil. Já os eventos de gargalo podem determinar a rápida fixação de alelos que conferem resistência de um ano para outro.

3 CONCLUSÕES

- Há variabilidade natural na resposta das populações de *A. argillacea* à toxina Cry1Ac;
- Os locos microssatélites foram eficientes para detectar variabilidade genética dentro e entre as populações de *A. argillacea* no Brasil;
- Existe pequena estruturação da variabilidade genética entre as populações nas diferentes safras, porém não existe estruturação entre populações de diferentes regiões;
- Ocorre alta taxa de migração entre as populações de *A. argillacea* no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.
- ALI, M.I.; LUTTRELL, R.G.; YOUNG, S.I. III. Susceptibilities of *Helicoverpa zea* e *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations to Cry1Ac insecticidal protein. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, p. 164-175, 2006.
- ALSTAD, D.; ANDOW, D.A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plantas. **Science**, Washington, v. 268, p. 1894-1896, 1995.
- ANDOW, D.A.; HUTCHINSON, W.D. *Bt* – corn resistance management. In: MELLON, M.; RISSLER, J. (Ed.). **Now or never: serious new plants to save a natural pest control**. Washington: Union of Concerned Scientist, 1998. p. 19-66.
- AZEVEDO, F.R.; MATTOS, K.O.; VIEIRA, F.V. Comportamento alimentar de *Alabama argillacea* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) em algodoeiro. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 33, p. 5-9, 2002.
- 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.
- 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.
- BILLOTTE, N.; LAGODA, P.J.L.; RISTERUCCI, A.; BAURENS, F. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, Paris, v. 54, p. 277-287, 1999.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Viçosa: UFV, 2006. 374 p.
- BOTELHO, P.S.M.; SILVEIRA NETO, S.; LARA, F.M. Flutuação populacional de curuquerê - do – algodoeiro (*Alabama argillacea* Hübner), em 4 municípios do Estado de São Paulo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 5, p. 181-193, 1976.

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 of London B**, London, v. 267, p. 117-122, 1999.

BROOKES, A.J. The essence of SNPs. **Gene**, Amsterdam, v. 234, n. 2, p. 177-186, 1999.

CALCAGNOLO, C. Principais pragas do algodoeiro. In: NEVES, O.S.; CAVALERI, P.A.; VERDADE, F.C.; JUNQUEIRA, A.A.B.; GRIDI-PAPP, I.L.; ORTOLANI, A.A.; SILVA, N.M. da; RIGHI, N.R.; FERRAZ, C.A.M.; CORRÊA, D.M.; CALCAGNOLO, G.; SILVEIRA, A.P.; COSTA, A.S.; CARVALHO, A.M.B.; MENDES, H.C.; FUZATTO, M.G.; CORRÊA, F.; BERZAGHI, M.N. (Ed.). **Cultura e adubação do algodoeiro**. São Paulo: Instituto Brasileiro de Potassa, 1965. p. 319-389.

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

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.

COATES, B.S.; HELLMICH, R.L.; LEWIS, L.C. Polymorphic CA/GT and GA/CT microsatellite loci for *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Molecular Ecology Notes**, London, 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. Disponível em: <<http://www.insectscience.org/4.35>>. Acesso em: 10 set. 2008.

CREST, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 19, p. 299-306, 2001.

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

DENNEHEY, T.J. Decision-making for managing pest resistance to pesticides. In FORD, M.G.; HOLLOMAN, D.W.; KHANBAY, B.P.S.; SAWICKI, R.M. (Ed.). **Combating resistance to xenobiotics: biological and chemical approaches**. Chichester: EllisHorwood, 1987. p. 118-126.

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

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13-15, 1990.

ENDERSBY, N.M.; HOFFMAN, A.A.; McKECHNIE, S.W.; WEEKS, A.R. Is there genetic structure in populations of *Helicoverpa armigera* from Australia? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 122: p. 253-263, 2007.

ESTADOS UNIDOS. Environmental Protection Agency. **Biopesticides registration action document: *Bacillus thuringiensis* plant incorporated protectants**. 2001. Disponível em: <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/reds/brad_bt_pip2.htm>. Acesso em 18 dez. 2009.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, London, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. New York: Longman Scientific & Technicals, 1989. 438 p.

FENGXIA, M.; SHEN, J.; ZHOU, W.; CEN, H. Long-term selection for resistance to transgenic cotton expressing *Bacillus thuringiensis* toxin *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 60, p. 167-172, 2003.

FERRÉ, J.; VAN RIE J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 47, p. 501-533, 2002.

FERREIRA, M.E., GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. Brasília: EMBRAPA, CENARGEN, 1998. 220 p.

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

FIELD, D.; WILLS, C. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. **Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 263, n. 1367, p. 209-215, 1996.

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

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P. PARRA; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 10).

GILL, S.S.; COWLES, E.A.; PIETRANTONIO, P.V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 37, p. 615–636, 1992.

GONZALEZ-NUNEZ, M.; ORTEGO, F.; CASTANERA, P. Susceptibility of Spanish populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to a *Bacillus thuringiensis* endotoxin. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, p. 459–463, 2000.

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.

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

GRAVENA, S.; CUNHA, H.F. **Artrópodes predadores na cultura Algodoeira**. Jaboticabal: FUNEP, 1991. 120 p.

HALLIDAY, W.R.; BURNHAM; K.P. Choosing the optimal diagnostic dose for monitoring insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 83, p. 1151-1159, 1990.

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

HELENTJARIS, T.; SLOCUM, M.; WRIGHT, S.; SCHAEFER, A.; NIENHUIS, J. Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 72, p. 761-769, 1986.

HENDRICKS, D.E.; LINGREN, P.D.; HOLLINGSWORTH, J.P. Number of bollworms, tobacco budworms and cotton leafworms caught in traps equipped with fluorescent lamps of five colours. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 68, p. 645-649, 1975.

HOFFMANN, C.; VANDERBRUGGEN, H.; HOFTE, H.; VAN RIE, J.; JANSSENS, S.; VAN MELLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassica*). **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 173, p. 85–91, 1988.

HUANG, F.; LEONARD, R.; MOORE, S., YUE, B.; PARKER, R.; REAGAN, T.; STOUT, M.; COOK, D.; AKBAR, W.; CHILCUTT, C.; WHITE, W.; LEE, D.; BILES, S. Geographical susceptibility of Louisiana and Texas populations of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab protein. **Crop Protection**, Guildford, v.27, p. 799-806, 2008.

INTERNATIONAL SERVICE FOR THE ACQUISITION OF AGRI-BIOTECH APPLICATIONS. Disponível em: <<http://www.isaaa.org>>. Acesso em: 15 dez. 2009.

JÁCOME, A.G.; SOARES, J.J.; OLIVEIRA, R.H.; CORDÃO SOBRINHO, F.P. Efeito da remoção das folhas no desenvolvimento vegetativo e na produção do algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 751-755, 2001.

JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution**, Cambridge, v. 11, p. 424–429, 1996.

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.

JI, Y-J.; ZHANG, D.X. Characteristic of microsatellite DNA in lepidopteran genomes and implications for their isolation. **Acta Zoologica Sinica**, Beijing, v. 50, p. 608-614, 2004.

KEYGENE NV (Nederland). Marc Zabeau; Pieter Vos. **Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting EP 0534858**. 24 set, 1992. 24 abr. 2005.

KINSINGER, R.A.; McGAUGHEY, W.H. Susceptibility of populations of Indianmeal moth and almond moth to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 72, p. 347-349, 1979.

KNOWLES, B.H.; ELLAR, D.J. Colloid-osmotic lysis is a general feature of the mechanism of action of delta-endotoxin with different insect specificity. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 924, p. 509–518, 1987.

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**, Madison, v. 8, p. 1-12, 2008. Disponível em: <<http://www.insectscience.org/8.72>>. Acesso em: 19 jan. 2009.

KWOK, P.Y. Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Palo Alto, v. 2, p. 235-258, 2001.

LADEIRA, J.S. O aparecimento de curuquerê nos algodoads. **Boletim de Agricultura**, Belo Horizonte, v. 6, p. 57-59, 1957.

LEORA SOFTWARE. **PoloPLUS**: a user's guide to Probit or Logit analysis. Berkeley, 2002. 20 p.

LEWIS, P.; ZAYKIN, D. **Genetic data analysis**: computer program for the analysis of allelic data. Disponível em: <<http://alleyn.eeb.uconn.edu/gda/>>. Acesso em: 15 mar. 2009.

LU, M.-G.; RUI, C.-H.; ZHAO, J.-Z.; JIAN, G.-L.; FAN, X.-L.; GAO, X.-W. Selection and heritability of resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* and transgenic cotton in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, Sussex, v. 60, p. 887-893, 2003.

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

MARCHINI, L.C. Avaliação de dano do curuquerê - do – algodoeiro, *Alabama argillacea* (Hübner, 1818) em condições simuladas e redução de sua população através de isca tóxica. 1976. 72 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1976.

- MARÇON, P.C.R.G.; YOUNG, L.J. STEFFEY, K.L.; SIEGFRIED, B.D. Baseline susceptibility of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, p. 279-285, 1999.
- MARÇON. P.C.R.G.; SIEGFRIED, B.D.; SPENCER, T.; HUTCHINSON, W.D.. Development of diagnostic concentrations for monitoring *Bacillus thuringiensis* resistance in European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, p. 925-930, 2000.
- MARTINELLI, S.; MONTRAZI, R.B.; ZUCHI, 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.
- MARTINS, G.L.M.; MARUYAMA, L.C.T.; MARUYAMA, W.I. Agentes microbianos no controle de *Alabama argillacea* (Hübner, 1918) (Lepidoptera: Noctuidae) em algodoeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 74, p. 23-27, 2007.
- MILLER, M. TOOLS FOR POPULATION GENETIC ANALYSIS. Disponível em: <<http://herb.bio.nau.edu/~miller/tfpga>>. Acesso em: 20 fev. 2009.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 55, p. 335-350, 1987.
- NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided population. **Annals of Human Genetics**, London, v. 41, p. 225-33, 1977.
- _____. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Bethesda, v. 89, n. 3, p.583-590, 1978.
- NÈVE, G.; MEGLÉCZ, E. Microsatellite frequencies in different taxa. **Trends in Evolution and Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 376-377, 2000.
- O'CONNELL, M.; WRIGHT, J.M. Microsatellite DNA in fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, Dordrecht, v. 7, p. 331-363, 1997.
- OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 294-307, 2006.

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

QUIRINO, E.S.; SOARES, J.J. Efeito do ataque de *Alabama argillacea* no crescimento vegetativo e sua relação com a fenologia do algodoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 1005-1010, 2001.

RAMALHO, F.S. Cotton pest management: Part 4. A Brazilian perspective. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 39, p. 463-578, 1994.

REED, J.P.; HALLIDAY, W.R. Establishment of Cry9C susceptibility baselines for European corn borer and southwestern corn borer (Lepidoptera:Crambidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 94, p. 397-402, 2001.

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

ROHLF, J. **NTSYSpc 2.1**. New York: Applied Biostatistics, 2000. 1 CD-ROM.

ROSENBERG, N.A. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. **Molecular Ecology Notes**, London, v. 4, p. 137-138, 2004.

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

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

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

SAEGLITZ, S.; BARTSCH, D.; EBER, S.; GATHMANN, A.; PRIESNITZ, K.U.; SCHUPHAN, I. Monitoring the Cry1Ab susceptibility of European corn borer in Germany. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, p. 1768-1773, 2006.

SANTOS, T.M.; BOIÇA JUNIOR, A.L. Resistência de genótipos de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) a *Alabama argillacea* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, p. 297-303, 2001.

SANTOS, W.J. Manejo das pragas do algodão no Estado do Paraná. **Revista Agropecuária**, São Paulo, v. 21, p. 22-27, 1980.

SCHLÖTTERER, C. The evolution of molecular markers – Just a matter of fashion? **Nature Reviews: Genetics**, London, v. 5, p. 63-69, 2004.

SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 20, p. 211-215, 1992.

SCHLÖTTERER, C.; RITTER, R.; HARR, B.; BREM, G. High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. **Molecular and Biology Evolution**, Oxford, v. 15, n. 10, p. 1269-1274, 1998.

SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZEIGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiology and Molecular Biology Review**, Washington, v. 62, p. 775–806, 1998.

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.

SEÁRA, H.S. Perdas causadas pelo curuquerê, *Alabama argillacea* (Hübner, 1818) e pelo “Ácaro Bronzeado”, *Heterotergum gossupii* Kieffer, na cultura do algodão Mocó. **Pesquisa Agropecuária Nordestina**, Recife, v. 2, p. 5-11, 1970.

SIA, E.A.; BUTLER, C.A.; DOMINSKA, M.; GREENWELL, P.; FOX, T.D.; PETES, T.D. Analyses of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 97, p. 250-255, 2000.

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

SIEGFRIED, B.D.; VAUGHN, T.T.; SPENCER, T. Baseline susceptibility of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) to Cry3Bb1 *Bacillus thuringiensis* toxin. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 98, p. 1320–1324, 2005.

SILVA, A.L.; NETO PRADO, P.C.; CUNHA, H.F. **Avaliação da produtividade, segundo efeito da desfolha e eliminação de estruturas frutíferas nos diferentes estágios do algodoeiro**. Goiânia: Embrapa, 1980. 125 p. Relatório Técnico da Embrapa-GO.

SILVEIRA NETO, S. **Levantamento de insetos e flutuação da população de pragas da ordem Lepidoptera, com o uso de armadilhas luminosas, em diversas regiões do Estado de São Paulo**. 1972. 183 p. Tese (Livre Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1972.

SIMS, S.R.; BERBERICH, S.A. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Protein levels in raw and processed seed of transgenic cotton determination using insect bioassay and ELISA. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 89, p. 247–251, 1996.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Bethesda, v.130, p.457-462, 1995.

SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S. **Isozymes in plant biology**. Portland: Dioscorides, 1989. 268 p.

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 de plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 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 racts 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 Reviews of Entomology**, Palo Alto, v. 39, p. 47-79, 1994.

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

TAUTZ, D.; TRICK, M.; DOVER, G.A. Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. **Nature**, London, v. 322, p. 652-656, 1986.

TOTH, G.; GASPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome Research**, New York, v. 10, p. 967-981, 2000.

- 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.
- VAN RIE, J.; JANSENS, S.; HOFTE, H.; DEGHEELE, D.; VAN MALLAERT, H. Specificity of *Bacillus thuringiensis* β -endotoxin: importance of specific receptors on the brush border membrane of the midgut of target insects. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 186, p. 239–247, 1989.
- VANTOAL, T. T.; PENG, J.; MARTINS, S. S. Using AFLP markers to determinate the contribution of parental genomes during recurrent selection. **Soybean Genetics Newsletter**, Iowa, v. 23, p. 214-216, 1996.
- VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; VAN DE LEE, T.; HORNES, M.; FRITERS, A.; POT, J.; PALEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v. 23, p. 4407-4414. 1995.
- 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, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, L.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, p. 6531-6535, 1990.
- WRIGHT, J.M.; BENTZEN, P. Microsatellites: Genetic markers of the future. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, Dordrecht, v. 4, p. 384-388, 1994.
- WU, K.; GUO, Y.; LV., N.; GREENPLATE, J. T.; DEATON, R. Resistance Monitoring of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Protein in China. **Journal of Economic Entomology**, Lanham v. 95, p. 826-831, 2002.
- ZANE, L.; BARGRLLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellites isolation: a review. **Molecular Ecology**, London, v. 11, p. 1-6, 2002.
- ZHANG, D.X. Isolation, characterization and cross-species amplification of eight microsatellite DNA loci in the migratory locust (*Locusta migratoria*). **Molecular Ecology Notes**, London, v. 3, p. 483-486, 2003.
- _____. Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 19, p. 507-509, 2004.