

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
CHRYSODEIXIS INCLUDENS EM SOJA NO BRASIL**

TESE DE DOUTORADO

Janine Palma

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *CHRYSODEIXIS*
INCLUDENS EM SOJA NO BRASIL**

Janine Palma

Dissertação apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração Produção Vegetal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Agronomia.**

Orientador: Prof. Jerson Vanderlei Carús Guedes

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Palma, Janine
Caracterização molecular de *Chrysodeixis includens* em
soja no Brasil / Janine Palma.-2015.
84 p.; 30cm

Orientador: Jerson Vanderlei Carús Guedes
Coorientador: Guy Smagghe
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, RS, 2015

1. Diversidade genética 2. Estrutura molecular 3.
Lagarta-falsa-medideira I. Carús Guedes, Jerson
Vanderlei II. Smagghe, Guy III. Título.

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pela autora.

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Janine Palma. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua Dom Marcos Teixeira, n. 75, Bairro São José, Santa Maria, RS. CEP: 97095-430

Fone (055)55 96174814; E-mail: janine.palma@gmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Agronomia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Tese de Doutorado

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *CHRYSODEIXIS INCLUDENS*
EM SOJA NO BRASIL**

elaborada por
Janine Palma

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Jerson Vanderlei Carús Guedes, Dr.
(Presidente/Orientador)

Dr. Moisés João Zotti (UFSM)

Dr. Ervandil Corrêa Costa (UFSM)

Dr. Altemir José Mossi (UFFS)

Dr. Enrique Ariel Castiglioni (UDeLaR)

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2015.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, presente na hora de angustia, minha mãe Ivoni, ao meu pai Silvio, a quem rogo todas as noites a minha existência, e aos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

Venho expressar minha verdadeira gratidão a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a finalização deste trabalho. Agradeço em particular:

A CAPES pelo auxílio financeiro durante o doutorado, e sem ela seria impossível ter feito o doutorado sanduíche.

À minha família que me apoia com muito amor e consideração. Em especial aos meus pais Silvio Palma e Ivoni Ida Altermann Palma que sempre nos encorajaram aos estudos e ao futuro profissional e aos meus irmãos pelo carinho e por entenderem minha ausência.

Ao Alberto Röhrig pelo apoio, compreensão e por me dar a mão nessa caminhada.

Ao prof. Dr. Jerson Vanderlei Carús Guedes pela orientação e apoio na vida profissional.

Ao prof. Dr. Guy Smagghe pela oportunidade de realizar um trabalho conjunto e pelas considerações no trabalho.

Ao colega da UGent Kevin Maebe por ser meu braço direito na Bélgica, por me mostrar que otimismo e perseverança fazem parte da ciência e pela paciência com meu inglês.

Ao prof. Moisés João Zotti pela disposição em auxiliar no processo de doutorado sanduíche e na correção do artigo.

Ao colega Ivair Valmorbida que esteve comigo na grande viagem de coleta dos espécimes deste trabalho, demonstrando ser um paciente amigo.

A colega Deise Cagliari que me auxiliou em parte dos trabalhos laboratoriais.

Aos colegas do Laboratório de Manejo Integrado e do Laboratório (UFMS) de Agrozoologia (UGent) pela convivência e amizade.

Aos novos amigos Solimar Machado, Wagner Barbosa e Rodrigo Stange Tessinari por se tornarem a minha família no outro lado do oceano.

Aos funcionários do Departamento de Fitossanidade que sempre se mostraram amigos e solícitos, Fernando Saccol Gnocatto, Maria Nevis Deconto Weber, Marizete Rossato Pozzobon, Angelita Sangoi Martins e Jorge Antonio Silveira França.

EPÍGRAFE

*Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos de que as
grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.*

(Charles Chaplin)

RESUMO

Tese de Doutorado em Agronomia
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *CHRYSODEIXIS INCLUDENS* EM SOJA NO BRASIL

AUTORA: Janine Palma

ORIENTADOR: Jerson Vanderlei Carús Guedes

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2015.

A soja é uma das culturas de maior expressão no Brasil, tanto em área plantada como em volume comercializado, e tem como principais pragas desfolhadoras as lagartas. Dentre essas, se destaca *Chrysodeixis includens*, praga que passou de secundária na década de 90 para uma das principais lagartas desfolhadoras da soja. Estudos sobre variações genéticas entre populações e estruturação genética dessa espécie ainda não foram realizados, e podem auxiliar na indicação práticas de manejo. Marcadores moleculares são ferramentas indicadas para caracterizar geneticamente populações de insetos. Mas para utilizar ferramentas moleculares, primeiramente, se faz necessário a extração de DNA em quantidade e qualidade que possibilita a prática no laboratório. Dessa forma, os objetivos do trabalho foram comparar três métodos de extração de DNA para lagartas da soja visando a aplicação com técnicas que utilizem a PCR. E analisar a variabilidade molecular e a estruturação genética de populações de *C. includens* na cultura da soja. Espécimes de lagartas de *C. includens* e *Spodoptera eridania* foram coletados de diferentes sítios de coleta nas principais áreas produtoras de soja do Brasil, safra de 2011/12. A confirmação da espécie foi baseada em características morfológicas das lagartas de acordo com chaves de identificação. As amostras de *C. includens* e *S. eridania* procedentes de Goiás foram utilizadas para o teste de comparação de extração de DNA. Os métodos utilizados eram cada um baseados na lise celular por *Sarcosyl*, CTAB e SDS. Cada método foi comparado quanto à quantidade, qualidade, economia e desempenho na PCR. O melhor método de extração de DNA foi utilizado para a extração de todas as amostras de lagartas para

o trabalho de caracterização molecular. Trinta populações de *C. includens* de nove estados brasileiros foram submetidas a análise da variabilidade molecular e estrutura genética com marcadores ISSR. O método de extração de DNA que apresentou melhor desempenho nas variáveis observadas foi o método de extração de DNA por *Sarcosyl*. Os marcadores ISSR geraram 247 locos em 262 espécimes analisados. A diversidade genética estimada (H_E) nas populações variaram entre 0,072 e 0,120, enquanto a média foi 0,094. A análise da variância molecular indica que 94% da variabilidade foi expressa entre indivíduos dentro das populações e 6% entre populações ($F_{ST} = 0,056$, $p = 0,001$). O alto nível de fluxo gênico e baixa estrutura genética são indicativos de troca de informação genética entre as diferentes locais de amostra. A análise da estrutura genética sugere a presença de dois grupos maiores que não se correlacionam com seus locais de amostragem no Brasil. Esses resultados podem indicar a recente colonização de *C. includens* no Brasil ou o padrão de migração das mariposas seguindo o sistema de cultivo no Brasil. Além disso, a presença de dois grupos de *C. includens* sugere que estudos sobre o desenvolvimento de resistência precisa ser avaliado sob outros ângulos para ambos os grupos.

Palavras-chave: Lagarta-falsa-medideira. *Glycine max*. Fluxo gênico. Variabilidade molecular. Estrutura molecular. Extração de DNA

ABSTRACT

Dr. Thesis in Agronomy
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria

Molecular characterization of *Chrysodeixis includens* in soybean in Brazil

AUTHOR: Janine Palma

ADVISER: Jerson Vanderlei Carús Guedes

Soybeans are one of the crops with the highest expression in Brazil, both in area planted as in sales volume. The culture has as main pests defoliating caterpillars. Among these, stands out *Chrysodeixis includens*, pest that went from of secondary status in the 90s to a major defoliating caterpillar soybeans. Studies on genetic variation among populations and genetic structure of this species have not yet been carried out, and can help to indicate management practices. Molecular markers are tools indicated to genetically characterize insect populations. In order to use molecular tools, first, it is necessary a method for DNA extraction in quantity and quality that enables the practice in the laboratory. The goals of the study were to compare three DNA extraction methods for soybean caterpillars to applicate in PCR techniques, and analyze the molecular variability and the genetic structure of populations of *C. includens* in soybeans. Caterpillars of *C. includens* and *S. eridania* were collected from different sites in center soybean regions of Brazil, in 2011/12. The confirmation of the species was based on morphological characteristics of caterpillars according to identification keys. Samples of *C. includes* and *S. eridania* coming from Goiás were used for DNA extraction comparison test. The methods used were based on cell lysis by Sarcosyl, CTAB and SDS. Each method was compared for quantity, quality, economy and performance in PCR. The best DNA extraction method was chosen for extraction of all the caterpillars samples for molecular characterization work. Thirty populations of *C. includens* from nine Brazilian states were subjected to analysis of molecular variability and genetic structure with ISSR markers. The observed DNA extraction method with the best

performance in the variables o was the DNA extraction method by Sarcosyl. ISSR generated 247 loci in 262 specimens analyzed. The estimated genetic diversity (HE) in populations ranged between 0.072 and 0.120, while the average was 0.094. The analysis of molecular variance indicates that 94% of the variability between individuals was expressed in 6% of the population and among populations ($F_{ST} = 0.056$, $p = 0.001$). The high level of gene flow and low genetic structure are indicatives of genetic information exchange between different sampling locations. The analysis of the genetic structure suggests the presence of two major groups which are not correlated to their sampling locations in Brazil. These results may indicate the recent colonization of *C. includens* in Brazil or the pattern of migration of moths following the cropping system in Brazil. Furthermore, the presence of two groups of *C. includens* suggest that the studies of development of resistance need to be further assessed for them both.

Key words: Soybean looper. *Glycine*. Gene flow. Molecular variability. Molecular structure. DNA extraction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 1 - Mapa da distribuição global de *C. includens*.....21
- Figura 2 - Ciclo de desenvolvimento de *C. includens*.....23
- Figura 3 - Representação da região repetitiva que compõe o primer ISSR.28

ARTIGO 1

- Figura 1- Aspecto visual da pureza do DNA extraído de *C. includens* (A) e *S. eridania* (B) pelos diferentes métodos. A e B: 1, protocolo 1 (*Sarcosyl*); 2, protocolo 2 (CTAB); 3, protocolo 3 (SDS).36
- Figura 2 - Eletroforese do DNA extraído de *C. includens* (1-3) e *S. eridania* (4-6) pelos diferentes métodos. M, High DNA Mass ladder (Invitrogen); 1 e 4, método 1 (*Sarcosyl*); 2 e 5, método 2 (CTAB); 3 e 6, método 3 (SDS); Seta indica banda com 10 Kb.....37
- Figura 3 - Amplificação do DNA extraído de *C. includens* (A) e *S. eridania* (B) pelos diferentes métodos com *primers* para o gene COI. M: marcador de peso molecular de 1Kb; 1: método 1 (*Sarcosyl*); 2: método 2 (CTAB); 3: método 3 (SDS).....39

ARTIGO 2

- Figure 1. Principal coordinate analysis (PCA) of *C. includens*. The codes used here, correspond to the different populations described in Table 1.54
- Figure 2. ΔK calculated by the Evanno method. The test was performed with all *C. includens* individuals from K = 1 to K = 7.....55
- Figure 3. Distribution map of two *C. includens* groups identified with PCA and Structure. Pie charts are arranged on the geographical position of each sampled population. Each pie chart indicates the proportion of each group in the populations. Codes correspond to the populations described in Table 1.....56

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1- Reagentes/soluções de cada método de extração de DNA.	34
Tabela 2 - Quantificação e análise de pureza do DNA extraído de <i>C. includens</i> e <i>S. eridania</i> por diferentes métodos de extração de DNA.	37
Tabela 3 - Tempo de preparo e custo por amostra para cada método de extração de DNA.	38

ARTIGO 2

Table 1. Details of the 30 sampling locations of <i>C. includens</i> included in this study. ..	48
Table 2. List of ISSR primers used for characterization of <i>C. includens</i>	50
Table 3. Genetic diversity of different <i>C. includens</i> sampling sites.	52
Table 4. Analysis Summary of molecular variance (AMOVA) based on sampling sites of <i>C. includens</i>	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFLP – Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados
AMOVA- Análise da variância molecular
COI – Cytochrome oxidase I gene mitocondrial
CTAB – Cetyl trimethylammonium bromide
dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid
Fst – Coeficiente de diferenciação genética
HCl – Ácido clorídrico
He – Heterozigose esperada
I – Índice de fixação de Shannon
ISSR – Inter Simple Sequence Repeat
K – Número de populações que melhor interpreta os dados genéticos
MgCl₂ - Cloreto de magnésio
NaCl – Cloreto de sódio
Ne – Número efetivo de alelos
Nm – Fluxo gênico
P – Porcentagem de polimorfismo
PCA – Análise das coordenadas principais
PCR – Reação em cadeia da polimerase
RAPD – Polimorfismo de DNA amplificados ao acaso
SDS – Sodium dodecyl sulfate
Tris – Tris(hidroximetil)aminometano
UV – Ultra violeta

LISTA DE ANEXOS E APÊNDICES

Apêndice A – Valor dos reagentes de extração de DNA.....	76
Apêndice B – Padrão de amplificação dos <i>primers</i> ISSRs.....	77
Apêndice C – Matriz da distância genética de Nei por população.....	80
Apêndice D – Gráfico da relação genética com a geográfica.....	83
Apêndice E – Gráfico em barras representado o ΔK	84

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
Justificativa.....	17
Objetivo geral	19
Objetivos específicos	19
Revisão de literatura	19
Principais lagartas da soja.....	19
Distribuição geográfica e hospedeiros da lagarta-falsa-medideira e da lagarta-da-vagem	20
Biologia da lagarta-falsa-medideira e da lagarta-da-vagem	21
Variabilidade genética de populações.....	23
Marcadores moleculares ISSR.....	26
Extração de DNA.....	28
ARTIGO 1 – ANÁLISE COMPARATIVA DE TRÊS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA LAGARTAS DA SOJA.....	30
Resumo	30
Abstract.....	30
Introdução.....	31
Materiais e Métodos	32
<i>Insetos.....</i>	32
<i>Extração de DNA.....</i>	33
<i>Deteção da quantidade e qualidade do DNA.....</i>	35
<i>Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....</i>	35
<i>Análise dos resultados</i>	36
Resultados	36
<i>Quantidade e qualidade do DNA.....</i>	36
<i>Análise da PCR.....</i>	38
Discussão	39
Referências Bibliográficas	41

ARTIGO 2 - Molecular variability and genetic structure of	
<i>Chrysodeixis includens</i> (Lepidoptera: Noctuidae), an	
important soybean defoliator in Brazil	45
Abstract.....	45
Introduction	46
Materials and Methods.....	47
<i>Insect samples</i>	47
<i>DNA extraction</i>	49
<i>ISSR amplification</i>	49
<i>Data analysis</i>	50
Results	51
<i>Genetic variability</i>	51
<i>Population genetic structure</i>	53
Discussion	56
References	59
DISCUSSÃO FINAL.....	64
CONCLUSÕES	68

INTRODUÇÃO

Justificativa

A soja (*Glycine max* L.) é a oleaginosa mais cultivada no mundo e destaca-se pelos benefícios da sua produção para o agro negócio brasileiro. Nas últimas safras o Brasil tem revezado com os EUA o primeiro lugar como produtor de soja. Apenas na safra 2013/14 foi produzido 86,1 milhões de toneladas de soja no Brasil (CONAB, 2014).

A cultura da soja está sujeita ao ataque de insetos desde a germinação até a colheita. Entre os insetos-praga que atacam a cultura destacam-se os desfolhadores, principalmente as lagartas, cujo dano reduz a área foliar das plantas, ocasionando prejuízos na produção (MOSCARDI et al., 2012). A lagarta-falsa-medideira (*Chrysodeixis includens*) era considerada praga secundária, pois tinha baixa distribuição, inconstância de surgimento na lavoura e baixa população nas áreas de ocorrência (GAZZONI, 1999). Ao longo das décadas *C. includens* passou a ter um comportamento diverso nas décadas de 70, 80, com surgimento inconstante nas diferentes regiões brasileiras para uma estabilidade de ocorrência na última década (BUENO et al., 2012; CAMPOS; CAMPOS; LARA, 1997; DIDONET et al., 1998; MORAES; LOECK; BELARMINO, 1991; PRADO; CUNHA; SILVA, 1982). A importância como praga aumentou a partir do momento em que apresentou surtos de ocorrência, estando presente desde o início do estágio vegetativo até o reprodutivo (BUENO et al., 2007), apresentando picos populacionais mais elevados que *Anticarsia gemmatalis* (lagarta-da-soja), e mudando as estratégias de controle dos produtores como podemos ver no estudo de meados da década de 90 (CAMPOS; CAMPOS; LARA, 1997).

A cultura da soja e outros hospedeiros podem ser encontrados em todo o Brasil, sendo que, devido as diferentes épocas de plantio em cada região acompanhando as mudanças de clima, deixam disponíveis hospedeiros ao longo do ano em todo o território, formando “pontes-verdes”. As plantações de soja no Brasil iniciam pelo estado de Mato Grosso progredindo para outros estados, segue o período chuvoso no Sudeste, Centro Oeste, Nordeste e Norte, e o aumento da temperatura nos estados do Sul (CONAB, 2014). Esse panorama torna possível que

populações de lagartas polípagas, como *C. includens*, ocorram de forma sedentária ou possam se comportar de maneira intermediária, com parte da população sendo residente e parte migratória (BUENO et al., 2012).

O controle da lagarta-falsa-medideira passa por um período de transição no Brasil, ente o uso de inseticidas para o uso da soja transgênica que expressão a proteína Cry1Ac do *Bacillus thuringensis*, sem observação de resistência até o momento (BERNARDI et al., 2012). Entretanto no EUA altos níveis de resistência para piretróides têm sido relatadas em populações no campo (PORTILLO; PITRE, 1997; THOMAS et al., 1996). A determinação da estrutura genética de populações, assim como o fluxo gênico entre diferentes áreas geográficas tem aplicação prática em programas de controle de pragas. O manejo de populações resistentes a inseticidas ou a plantas que carregam genes inseticidas está relacionado ao conhecimento da estruturação genética, pois populações sedentárias ou com uma taxa reduzida de imigração tem alto potencial para se tornarem resistentes pelo aumento da pressão de seleção (SOSA-GÓMEZ; OMOTO, 2012).

Estudos sobre variações genéticas entre populações de *C. includens* ainda não foram realizados. Embora os adultos sejam exímios voadores, não é conhecida a existência de genótipos diferenciados nas diferentes regiões geográficas brasileiras. Para isso, o uso de marcadores moleculares é a ferramenta indicada para avaliar a similaridade genética, a migração gênica e a estruturação genética entre populações de insetos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; SLATKIN, 1987). E um método de extração de DNA adequado para o desenvolvimento do trabalho se faz necessário. Na última década vários estudos têm sido realizados para determinar a caracterização genética de populações de diferentes espécies de Noctuidae, utilizando diferentes marcadores moleculares (ALBERNAZ et al., 2012; CLARK et al., 2007; DOMINGUES et al., 2012; MARTINELLI et al., 2007; TAY et al., 2013)

Dessa forma, a caracterização genética de populações de insetos pode auxiliar na determinação de práticas de manejo a fim de atrasar a evolução da resistência a inseticidas ou plantas com genes inseticidas.

Objetivo geral

Caracterizar molecularmente populações de *C. includens*.

Objetivos específicos

1. Analisar comparativamente três protocolos de extração de DNA, buscando o mais eficiente para lagartas da soja.
2. Analisar a variabilidade genética de populações de *C. includens*;
3. Analisar a estrutura genética de populações de *C. includens*.

Revisão de literatura

Principais lagartas da soja

Várias espécies de lagartas alimentam-se das folhas da soja ou das vagens. A soja tem como principal lagarta desfolhadora a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* (Hubner, 1818). (Lepidoptera: Erebididae), por ter ampla distribuição no país e em grande abundância. No entanto, nos últimos anos outras lagartas tem demonstrado importância nas principais regiões produtoras do país, como as lagartas-falsas-medideiras, *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858), *Rachiplusia nu* (Gueneé, 1852) e *Trichoplusia ni* (Hübner, 1803) (Lepidoptera: Noctuidae, Plusiinae) (GUEDES et al., 2010; MARSARO JÚNIOR et al., 2010; MOSCARDI et al., 2012). Destacando-se a *C. includens* pela alta capacidade de reinfestação nas lavouras de soja nas fases vegetativa e reprodutiva (CZEPAK; ALBERNAZ, 2014). Lagartas pertencentes ao gênero *Spodoptera* como as lagartas-pretas *S. eridania* (Stoll, 1782) e *S. cosmioides* (Walker, 1858), e a lagarta-do-cartucho-do-milho, *S. frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) estão presentes como pragas da soja em surtos, tanto na fase vegetativa como reprodutiva, apesar de serem conhecidas também como lagartas-da-vagem (GUEDES et al., 2010; MARSARO JÚNIOR et al., 2010; MOSCARDI et al., 2012; PANIZZI; BUENO; SILVA, 2012). Lagartas da família Heliothinae como *Heliothis virescens* e *Helicoverpa* sp. eram esporadicamente identificadas alimentando-se de soja (MOSCARDI et al., 2012; PANIZZI; BUENO; SILVA, 2012) entretanto, a identificação da espécie *Helicoverpa armigera* no Brasil na safra 2012/2013 (CZEPAK et al., 2013; SPECHT et al., 2013), ampliou as

espécies de lagartas da soja, por causar danos durante todo o ciclo da cultura, principalmente nas vagens (GUEDES et al., 2013).

Distribuição geográfica e hospedeiros da lagarta-falsa-medideira e da lagarta-da-vagem

A lagarta-falsa-medideira, *C. includens*, tem sua distribuição principalmente no hemisfério ocidental, ocorrendo desde Canadá e EUA até o sul da América do Sul. Também apresenta ocorrência na Austrália (Figura 1) (CAB INTERNATIONAL, 2014). A origem da espécie não é clara. Entretanto, em maior parte dos EUA *C. includens* é conhecida como migrante, com movimentação anual das mariposas para os estados do norte, sendo que a Florida, a América Central e do Sul e as Ilhas do Caribe são consideradas reserva da praga durante o inverno (HERZOG, 1980; TINGLE; MITCHEL, 1977). Essa lagarta apresenta um grande número de hospedeiros dentro de 28 famílias diferentes, podendo chegar a 73 espécies de plantas (CAB INTERNATIONAL, 2014). No Brasil é considerada praga de importantes culturas de verão como soja, algodão, feijão e tomate, mas também apresenta diversos outros hospedeiros (MOSCARDI et al., 2012).

A lagarta-da-vagem, *S. eridania*, assim como *C. includens*, ocorre apenas no hemisfério ocidental, desde os Estados Unidos das Américas até o sul da América do Sul. *S. eridania* apresenta até 53 espécies de plantas hospedeiras, destacando-se a soja, o algodão, o milho, o feijão, algumas frutíferas e hortaliças (CAB INTERNATIONAL, 2014). No Brasil é considerada praga secundária na cultura da soja, entretanto tem sido observada em surtos na soja em diferentes regiões produtoras (GUEDES et al., 2010; MARSARO JÚNIOR et al., 2010; PAPA; CELOTO, 2007).

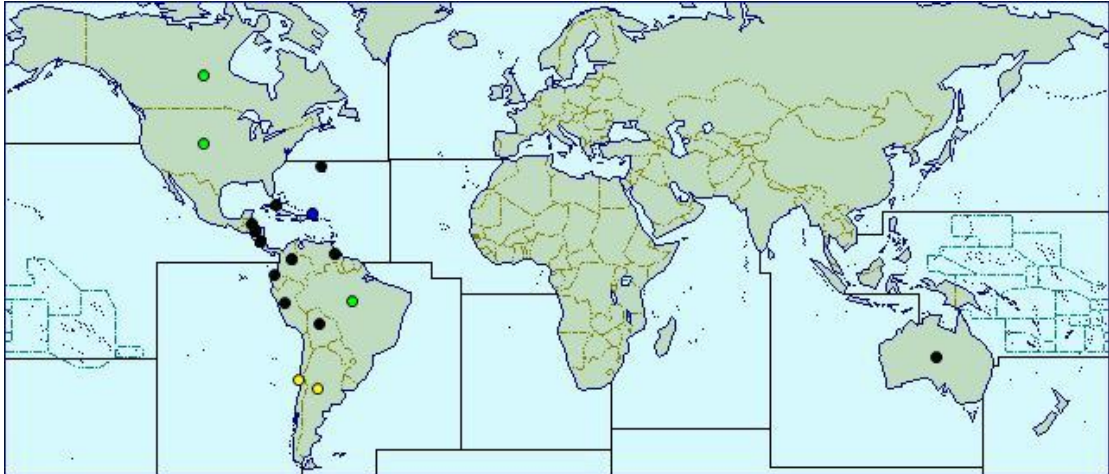


Figura 1 - Mapa da distribuição global de *C. includens*. Fonte: Cab International, 2014.

Biologia da lagarta-falsa-medideira e da lagarta-da-vagem

As lagartas da subfamília Plusiinae se distinguem facilmente de outras lagartas que atacam a soja, por apresentarem apenas dois pares de pernas abdominais, que a obriga a ter um movimento característico durante todo o desenvolvimento, formando um arco com o corpo ao se locomover, recebendo por essa característica o nome popular de lagarta-falsa-medideira (MOSCARDI et al., 2012). A diferenciação entre as espécies de Plusiinae é realizada através das características morfológicas das asas das mariposas ou por estruturas morfológicas das lagartas, tais como desenho das mandíbulas, presença de estruturas vestigiais e disposição das cerdas (ANGULO; WEIGERT, 1975; EICHLIN, 1975; EICHLIN; CUNNINGHAM, 1978).

Os adultos de *C. includens* apresentam envergadura de 30 a 35 mm, asas anteriores de coloração geral acinzentada, com reflexos dourados, duas manchas prateadas separadas, e asas posteriores de coloração marrom-claro. A oviposição ocorre no período da noite e os ovos são depositados individualmente, a maioria na face inferior das folhas. As lagartas apresentam coloração verde com faixas longitudinais esbranquiçadas e dois pares de falsas pernas, além de um par anal, e medem até 35 mm de comprimento no fim do desenvolvimento. Quando estão em fase pré-pupa tecem um casulo de seda sobre as folhas da soja, dobrando-as, onde passam a fase pupa, de cor verde-claro com manchas marrom (MOSCARDI et al., 2012).

Cada fêmea pode depositar até 600 ovos de coloração esverdeada. A duração do estágio de ovo dura de 3 a 5 dias. A espécie passa por 5 a 6 instares com duração do período larval de 23,3 dias, medindo até 35 mm de comprimento no fim do desenvolvimento. O ciclo biológico completo do inseto é de 43 dias em temperatura de 27 °C (Figura 2) (BARRIONUEVO et al., 2012), com potencial para gerar 3 ciclos sobre a cultura da soja.

Os adultos de *S. eridania* apresentam 40 mm de envergadura, possuem nas asas anteriores uma mancha preta na parte central e asas posteriores de cor branca. As posturas são colocadas em forma de massa de ovos recobertos por escamas, na face central da folha, sendo que cada fêmea pode colocar 800 ovos, inicialmente de coloração verde, tornando-se marrons antes da eclosão. O período larval é de 18 dias, sendo que as lagartas jovens são verdes e apresentam quatro pontos escuros sobre o dorso na parte mediana do corpo. As lagartas desenvolvidas medem de 35 a 50 mm de comprimento, apresentam tonalidade esverdeada e listras amarelas sobre o dorso, e cerca de 20 triângulos pretos, na parte dorsal do corpo. A pupação ocorre no solo e são de coloração marrom-escuro (SANTOS, SANTOS, SANTOS, 2003) O ciclo biológico do inseto é de 28 dias em temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ (SANTOS; .MANEGUIM; NEVES, 2005).

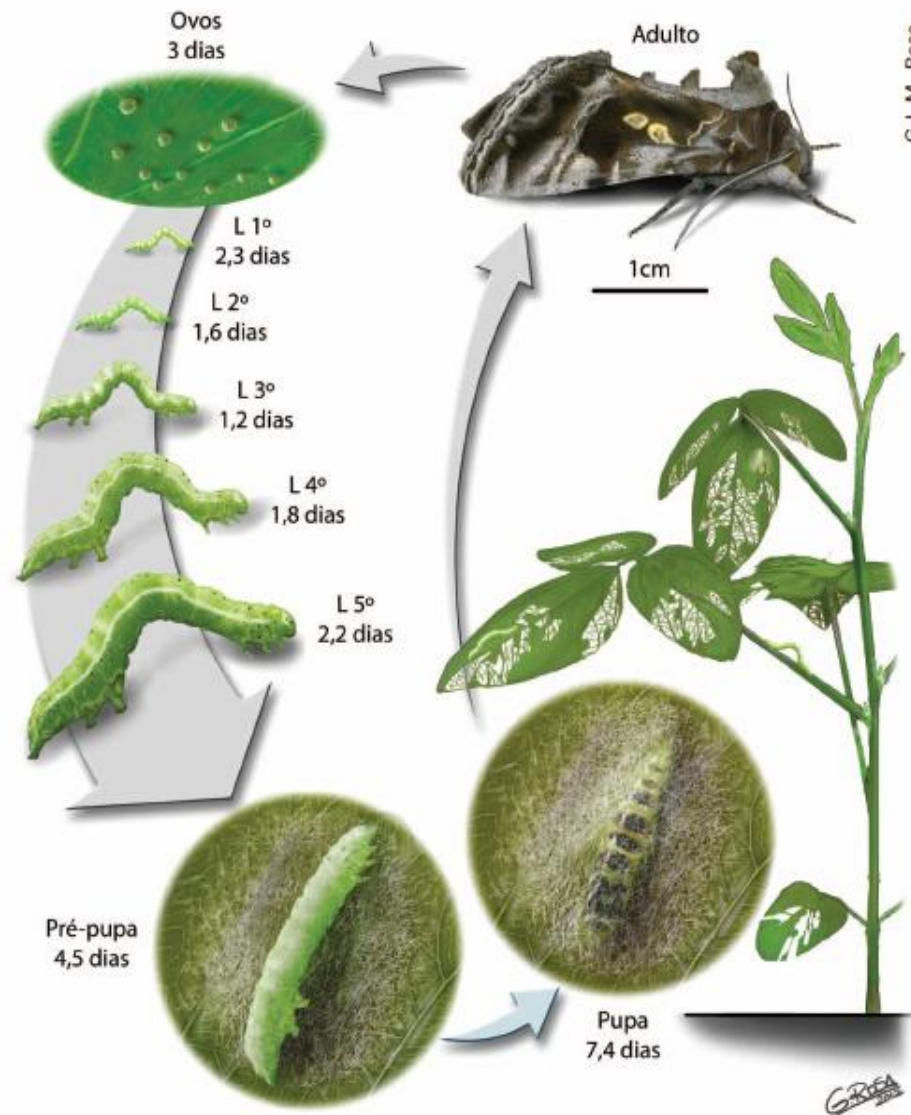


Figura 2 - Ciclo de desenvolvimento de *C. includens*. Fonte: Moscardi, 2012.

Variabilidade genética de populações

A variabilidade genética mede a frequência da variação de um gene em uma dada população a partir de variantes genéticas, os seus alelos, sendo que alelos são formas alternativas de um gene ou região do DNA codificante ou não codificante, pertencente a um indivíduo (TEMPLETON, 2011). A fonte primária de variabilidade genética é a mutação, que é um processo aleatório que dá origem as variações alélicas de uma região gênica. Entretanto, há outros processos que influenciam na

variabilidade genética, como a seleção natural, migração, deriva genética e recombinação gênica.

Mutação: são alterações que ocorrem ao acaso no material genético de um indivíduo e que são transmitidas aos descendentes, podendo ou não provocar alterações fenotípicas (SALMAN, 2007). O efeito das mutações nas frequências gênicas depende da frequência com que ela ocorre na natureza e da adaptabilidade para a sobrevivência e para a reprodução no meio ambiente da espécie. Isto é, se a mutação causar uma mudança fenotípica, esta mudança só persistirá no ambiente se o indivíduo que a possui conseguir se adaptar ao ambiente em que vive (vantagem seletiva significativa no indivíduo portador), se reproduzir, passando para uma nova geração essa mudança. Entretanto, se a mutação for neutra pode persistir durante muitas gerações, pois se a mutação não interferir no fenótipo e o indivíduo que a possui não precisar se adaptar ao ambiente, ele se reproduzirá normalmente e passará a mutação para as novas gerações (ROCHA, 2013; SALMAN, 2007).

Seleção natural: refere-se à influência do ambiente sobre a probabilidade de sobrevivência e reprodução de um determinado genótipo, que define seu valor adaptativo. A seleção natural é o principal fator evolutivo que atua sobre a variabilidade genética da população. A seleção natural seleciona os genótipos mais bem adaptados a uma determinada condição ecológica, eliminando aqueles desvantajosos para essa mesma condição (SALMAN, 2007). Os indivíduos mais bem adaptados a um ambiente têm chance maior de sobreviver e de deixar descendentes. Sendo assim, a seleção natural tende a diminuir a variabilidade genética, pois a seleção natural sobre uma determinada população selecionará alguns genótipos que se reproduzirão e deixarão descendentes diminuindo a variabilidade que apresentava as gerações anteriores. A seleção natural atua permanentemente sobre todas as populações (ROCHA, 2013).

Migração: é a mudança de indivíduos de uma população que está se reproduzindo para outra população (SALMAN, 2007). Os processos migratórios (fluxo gênico) introduzem novos genes em uma população. Indivíduos migrantes de uma mesma espécie, que conseguem se introduzir em populações isoladas, se sobreviverem e conseguirem se reproduzir, os cruzamentos entre estas resultarão em aumento da variabilidade pela mistura dos diferentes genes. Porém, com o tempo se as imigrações e emigrações se mantiverem em uma taxa alta será estabelecido um fluxo gênico que no futuro tenderá a diminuir as diferenças

genéticas entre as populações da mesma espécie, não se distinguindo claramente as populações, ou seja, as populações tendem a convergir a uma só (ROCHA, 2013).

Deriva genética: consiste na variação da frequência alélica de uma população ao longo do tempo devido ao acaso. A frequência alélica varia mais quando o tamanho populacional é menor num curto espaço de tempo. Entretanto, se dado tempo suficiente também ocorrem mudanças por deriva em populações grandes. Sendo assim, a deriva genética causa mudanças evolutivas nas frequências alélicas que se acumulam com o tempo. Quando o alelo for fixado, ou totalmente perdido, a deriva genética deixa de existir, pois ela opera apenas enquanto existir variabilidade genética. Portanto, a deriva genética causa a perda da variação genética em uma população (ROCHA, 2013; TEMPLETON, 2011).

Um caso particular de oscilação genética é o efeito fundador, que se refere ao estabelecimento de uma nova população a partir da deriva de poucos indivíduos que emigram da população original. Esses indivíduos serão portadores de pequena fração da variação genética da população de origem e seus descendentes apresentarão apenas essa variabilidade, até que genes novos ocorram por mutação (ROCHA, 2013; TEMPLETON, 2011).

Recombinação gênica: o acasalamento entre indivíduos em uma população é responsável pelos genótipos da próxima geração. Assim, a frequência genotípica de uma geração depende das recombinações entre os genótipos dos indivíduos que se acasalaram na geração anterior. Se a mutação é a fonte primária da variabilidade, a recombinação gênica é que efetivamente realiza a “mistura” entre os genes diferentes dos seres vivos (SALMAN, 2007).

A extensão da variação genética de uma espécie depende do fluxo de genes entre as populações e do tempo para diferenciar subpopulações onde há barreiras efetivas que limitam a reprodução entre populações. Se não há formação de subpopulações o fluxo gênico irá homogeneizar a composição genética, pois as populações irão convergir para a mesma frequência alélica. Por outro lado, se a seleção natural favorece genótipos diferentes em populações diferentes, onde há barreiras efetivas como influencia do clima ou região geográfica, a frequência gênica em cada uma alcançará um equilíbrio determinado pela força relativa da seleção natural e do fluxo gênico (FUTUYMA, 2002). As principais relações inferidas com a estrutura genética da população e/ou entre populações são a separação por culturas

(preferência alimentar) (MARTINELLI et al., 2007; SALDAMANDO; VÉLEZ-ARANGO, 2010), localidade geográfica, ano agrícola (safra) (DOMINGUES et al., 2012; MARTINS et al., 2005) e a história demográfica (história da expansão da população) (ALBERNAZ et al., 2012). Dois espécimes de *S. frugiperda*, indistinguíveis morfologicamente, um associado ao milho e outro ao arroz, têm sido identificados nos EUA (MEAGHER et al., 2004), no Brasil (BUSATO et al., 2002; BUSATO et al., 2004) e na Colômbia (SALDAMANDO; VÉLEZ-ARANGO, 2010). Entretanto, não foram identificados espécimes de *S. frugiperda* associados a outros hospedeiros, como no estudo entre estirpes de milho e algodão no Brasil (MARTINELLI et al., 2006; MARTINELLI et al., 2007) e milho e sorgo na Argentina (VIRLA et al., 2008).

As populações de Noctuidae aparentemente são compostas, na sua maioria, por genótipos migratórios (CLARK et al., 2007; MARTINELLI et al., 2006; NAGOSHI et al., 2007; NAGOSHI; MEAGHER, 2008). Populações que são recolonizadas por indivíduos retirados de diversas populações têm alta taxa de fluxo gênico tendo como consequência menor variância nas frequências alélicas entre populações. O efeito disso é reduzir o nível da diversidade genética na espécie como um todo, porque o fluxo gênico age contrariamente, neste caso, à tendência da deriva genética de aumentar a diversidade genética total de uma espécie, pela fixação de diferentes alelos em diferentes populações (FUTUYMA, 2002). Populações de *A. gemmatilis* foram observadas com maior similaridade entre lagartas coletadas em Planaltina/Brasil e Florida/EUA (SOSA-GÓMEZ, 2004). Similarmente, altos valores de similaridade genética foram encontrados entre populações do Brasil e da Florida/USA para *S. frugiperda* (MARTINELLI et al., 2007). Outro estudo constatou que a biologia e o comportamento das populações de *S. frugiperda* do Brasil são semelhantes aos encontrados na América do Norte, com migrações entre culturas e áreas geográficas (NAGOSHI et al., 2007). Por outro lado, estudos têm constatado alta variabilidade genética dentro de populações de Noctuidae (MARTINELLI et al., 2007; SOSA-GÓMEZ, 2004).

Marcadores moleculares ISSR

Os marcadores moleculares podem ser utilizados como ferramenta para estudos de diversidade genética entre indivíduos, dentro e entre populações ou

espécies relacionadas, definindo o grau de relação entre genótipos, caracterizando genótipos e delineando a distância genética entre populações geográficas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Os marcadores moleculares podem ser divididos em dois grupos, os dominantes e co-dominantes. Marcadores dominantes revelam alelos de um mesmo loco pela presença ou ausência de uma banda que, por sua vez, resulta da amplificação de um fragmento de determinado tamanho no gel. Através desses marcadores é possível identificar o polimorfismo do loco presente contra o ausente, sem separar entre homocigoto e heterocigoto (LOPES et al., 2002). Marcadores co-dominantes permitem a distinção entre genótipos homocigotos e heterocigotos, por se ter um conhecimento prévio do loco do DNA que se revela (LOPES et al., 2002).

Marcadores ISSR (“Inter Simple Sequence Repeat”) são marcadores dominantes, estão presentes ao acaso no DNA, o qual permite a detecção por PCR do polimorfismo em locos entre microssatélites, utilizando *primers* desenhados com sequências repetitivas com dois, três ou quatro nucleotídeos (Figura 3). Os *primers* tem comprimento entre 16 a 25 pb e amplificam fragmentos de diferentes tamanhos (ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994). Estes podem ser não ancorados ou ancorados na extremidade 3’ ou 5’ com 1 a 4 bases degeneradas (BORNET; BRANCHARD, 2001; ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994). Marcadores ISSR tem a vantagem de não requerer informação prévia sobre o DNA alvo, como os marcadores microssatélites, e produzir fragmentos com alta reprodutibilidade quando comparados a outros marcadores baseados na PCR como o RAPD (Random Amplified Polymorphic) (BEROIZ et al., 2012; BORNET; BRANCHARD, 2001).

Marcadores ISSR foram amplamente usados com sucesso para caracterizar plantas (PRADEEP REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002). E mais recentemente tem sido utilizado com insetos para distinguir populações de Lepidoptera (HUNDSDOERFERA; WINKA, 2005; LUQUE et al., 2002; ROUX et al., 2007; ZHU et al., 2012), Coleoptera (SOUZA et al., 2008), Diptera (ABBOT, 2001; BEROIZ et al., 2012; MENDKI et al., 2011), Hymenoptera (SHOUHANI et al., 2014), Hemiptera (ABBOT, 2001) e Neuroptera (BARBOSA; FREITAS; MORALES, 2014).



Figura 3 - Representação da região repetitiva que compõe o primer ISSR.

Extração de DNA

Marcadores baseados na PCR permitem a análise de uma grande quantidade de amostras de DNA por dia após a extração do DNA. Para isso, é desejável um DNA não desnaturado, com algum grau de pureza e em quantidade suficiente. Existem na literatura várias técnicas descritas de extração de DNA para diferentes alvos e para aplicação em diferentes técnicas moleculares (CHEN; RONALD, 1999; CHEN et al., 2008; CHEUNG; HUBERT; LANDRY, 1993; RAMPELOTTI et al., 2008). Para *Holcocerrus hippophaecolus* (Lepidoptera: Cossidae) foi desenvolvido um protocolo baseado na extração com SDS para análise AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) (CHEN et al., 2008). Visando a análise por RAPD de *A. gemmatalis* um protocolo de extração de DNA baseado na lise celular com *Sarcosyl* foi utilizado (SOSA-GÓMEZ, 2004). Martinelli et al. (2007) utilizou protocolo baseado no método CTAB para extração de DNA de *S. frugiperda* visando a análise por AFLP. Em outro estudo, um protocolo de extração de DNA baseado no método SDS foi utilizado para Lepidoptera: Noctuidae analisada pela técnica ISSR (LUQUE et al., 2002).

A extração de DNA segue, de maneira geral, quatro etapas: a lise celular, a eliminação de contaminantes, a precipitação do DNA e a lavagem do DNA. Em cada etapa é empregado reagentes e/ou soluções específicos para cada função. O tampão de extração é uma solução com reagentes visando o tamponamento, antioxidação e a solubilização de membranas lipoproteicas, e desnaturação de proteínas. Os reagentes comuns na solução do tampão são o Tris-HCl, EDTA e NaCl. O Tris-HCl é o reagente que dá a condição tamponante, ou seja, a estabilidade do pH da solução. Com o pH em 8,0 evita-se a ação das DNases, enzimas que degradam o DNA em pH próximo a 7,0. O EDTA é um agente quelante que se liga a íons requeridos por DNases, evitando assim a ação destas sobre o

DNA (HOY, 2003). E o NaCl é um sal adicionado para aumentar a concentração de solutos da solução (ROMANO; BRASILEIRO, 1999). O L-loril *sarcosyl* o CTAB e o SDS são diferentes reagentes detergentes, que são adicionados ao tampão de extração, que rompem as células e desnaturam proteínas (ANTONINI; MENECHIN; URASHIMA, 2004). Outros reagentes que podem ser utilizados no tampão de extração são o metabissulfito de sódio, utilizado como antioxidante e o beta-mercaptoetanol, também um antioxidante que age sobre polifenóis (ROMANO; BRASILEIRO, 1999).

Para a eliminação de contaminantes utiliza-se a Proteinase K, enzima capaz de desnaturar as proteínas, e a solução clorofórmio/álcool isoamil, na qual o clorofórmio desnatura proteínas e remove lipídios. O clorofórmio separa a solução de extração em duas fases, orgânica e aquosa, e os contaminantes formam uma camada na interface das fases, separando-se do DNA que se mantém na fase aquosa (HOY, 2003). O álcool isoamil previne a formação de espuma quando a mistura é agitada, o que torna mais fácil a separação da fase orgânica da fase aquosa (OLIVEIRA et al., 2007). Ainda pode-se aplicar o tratamento por RNase que elimina o RNA extraído junto com o DNA, considerado contaminante na extração de DNA (ROMANO; BRASILEIRO, 1999).

O reagente mais comum utilizado para a precipitação do DNA é o isopropanol 100% gelado (ROMANO; BRASILEIRO, 1999). Entretanto, também pode ser usado o acetato de amônio, que além de precipitar o DNA ajuda na purificação eliminando do precipitado polissacarídeos, e outros contaminantes orgânicos (ROMANO; BRASILEIRO, 1999). O etanol 70% é o responsável pela limpeza final do DNA, eliminando o isopropanol que é menos volátil, e lavando o DNA de demais contaminantes que foram precipitados e não foram eliminados na fase orgânica.

O trabalho foi desenvolvido na forma de artigos, na qual o primeiro artigo trata-se da comparação de protocolos de extração de DNA para Lepidópteros na busca de um protocolo para ser utilizado nas extrações e que possa ser usado como padrão no Laboratório de Manejo Integrado. O segundo artigo realiza a caracterização molecular de populações de *C. includens* coletadas nas principais regiões produtoras de soja do Brasil.

ARTIGO 1 – ANÁLISE COMPARATIVA DE TRÊS PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA LAGARTAS DA SOJA

Resumo

A extração de DNA genômico permite a realização de estudos moleculares de diferentes alvos para diagnóstico ou caracterização genômica. O principal objetivo deste trabalho foi analisar comparativamente três protocolos de extração de DNA, baseados na lise celular por *Sarcosyl*, CTAB e SDS, buscando o mais eficiente para lagartas da soja. Lagartas das espécies *Chrysodeixis includens* e *Spodoptera eridania* foram submetidas a extração do DNA por três métodos diferentes. A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria e utilizando o marcador molecular High DNA Mass Ladder. A pureza do DNA extraído foi observada pela razão A260/A280. O custo e tempo para cada extração de DNA foi determinado e analisado estatisticamente. A quantidade de DNA extraído pelos três métodos foi suficiente para a amplificação por PCR. O método *Sarcosyl* demonstrou ao final da extração de DNA maior pureza, pois gerou *pellet* claro, sem viscosidade e gerou DNA que amplificou com os *primers* para o gene COI I. O método *Sarcosyl* apresentou menor custo por extração e não diferiu estatisticamente dos demais para o tempo de preparo. O método baseado na lise celular por *Sarcosyl* é o que melhor reverte em quantidade, qualidade e economia.

Palavras-chave: *Chrysodeixis includens*; *Spodoptera eridania*; *Sarcosyl*; PCR

Abstract

Genomic DNA extraction make possible molecular researches of different organisms to diagnostic or genomic characterization. The goal of this study was to analyze comparatively protocols of DNA extraction, based on cell lysis by *Sarcosyl*, CTAB and SDS, searching the most efficient for soybean caterpillars. Specimens of *Chrysodeixis includens* and *Spodoptera eridania* were subjected to DNA extraction by three methods. DNA quantification was performed using spectrophotometry and High DNA Mass ladder. The purity of the extracted DNA was observed by the ratio

A260 / A280. Cost and time for each DNA extraction method was measured and analyzed statistically. The amount of DNA extracted by these three methods was sufficient for PCR amplification. Sarcosyl method resulted in higher purity of DNA, because it generated clear pellet without viscosity, and the DNA amplified with the primers for the COI gene I. Sarcosyl method showed lower cost per extraction and did not differ for the preparation time from the others methods. The method based on cell lysis by Sarcosyl is what best reverses in quantity, quality and economy.

Key words: *Chrysodeixis includens*; *Spodoptera eridania*; Sarcosyl; PCR

Introdução

Diversos estudos moleculares utilizam marcadores moleculares baseados na PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para a caracterização da variabilidade molecular e estrutura genética de insetos de Noctuidae (BARBOSA; FREITAS; MORALES, 2014; LUQUE et al., 2002; MARTINELLI et al., 2006). Para tal primeiramente é necessário a extração do DNA. Entretanto, os estudos utilizam distintos métodos de extração de DNA. A principal diferença entre os protocolos de extração de DNA está na composição do tampão de extração que, normalmente integra um agente tamponante, um sal para dissociar as proteínas do DNA, e um detergente para solubilizar as membranas e auxiliar na inativação de algumas enzimas, como dodecil sulfato de sódio (SDS), o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e o Sarcosyl (BLACK; DUTEAU, 1997; CHEUNG; HUBERT; LANDRY, 1993; SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

A extração de DNA puro e de boa qualidade é pré-requisito para qualquer análise molecular. Os problemas frequentemente ligados à extração de DNA são as contaminações do DNA por proteínas, polifenóis, polissacarídeos e lipídios (DEMEKE; JENKINS, 2010; HOY, 2003; ROMANO; BRASILEIRO, 1999), que podem interferir em alguns processos moleculares como a PCR (DEMEKE; ADAMS, 1992; FANG et al., 1992; PANDEY et al., 1996). Várias técnicas de extração de DNA descritas na literatura são utilizadas em diferentes alvos (LUQUE et al., 2002; MARTINELLI et al., 2007; SCHROEDER; DEGEN, 2008; SOSA-GÓMEZ, 2004). Entretanto, não há muitos estudos sobre a comparação de técnicas buscando a

mais adequada a cada espécie ou família (CHEN et al., 2008; RAMPELOTTI et al., 2008), ou que compare a eficiência das técnicas.

A lagarta-falsa-medideira, *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae, Plusiinae) é uma importante praga da soja, amplamente distribuída no Brasil, que tradicionalmente causam danos nas folhas da soja, mas também pode ser encontrada causando danos nas vagens (CZEPAK; ALBERNAZ, 2014; MOSCARDI et al., 2012). A lagarta-da-vagem, *Spodoptera eridania* (Stoll, 1782) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada praga secundária (GAZZONI, 1999), mas têm ocasionado surtos em vários estados, e pode alimentar-se tanto da folha quanto das vagens da soja (GUEDES et al., 2010; MARSARO JÚNIOR et al., 2010; PAPA; CELOTO, 2007).

Neste estudo nós avaliamos três protocolos de extração de DNA utilizados em Lepidoptera com o tegumento de lagartas de *C. includens* e *S. eridania*, e discutimos os fatores que afetam a pureza, a qualidade do DNA, a quantidade e a economia do método de extração, para determinar o método de extração de DNA mais eficiente para as espécies.

Materiais e Métodos

Insetos

Lagartas utilizadas no trabalho da espécie *C. includens* são procedentes de Rio Verde/GO, e as de *S. eridania* são procedentes de Americana do Brasil/GO, ambas coletadas na safra 2011/2012. As lagartas foram mantidas em álcool 96% para o transporte até o Laboratório de Manejo Integrado de Pragas (LabMIP), no Departamento de Defesa Fitossanitária (DFS), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), onde foram lavadas em água destilada estéril, secas em papel toalha e armazenadas separadamente em microtubos (1,5 ml) à -20°C

A identificação de *C. includens* foi confirmada pela análise morfológica das estruturas vestigiais, mandíbula e fiandeira (ANGULO; WEIGERT, 1975; EICHLIN, 1975; EICHLIN; CUNNINGHAM, 1978). Para identificação das *S. eridania* foram consideradas as diferenças nas linhas médio-dorsal e latero-dorsal, listra sub-espericular, formato e posição das manchas segmentais no mesotórax, e manchas segmentais triangulares (HEPPNER, 1998; PASSOA, 1991).

Extração de DNA

Larvas de *C. includens* e *S. eridania* foram dissecadas e o tegumento foi lavado com água destilada estéril. Cada tegumento foi pesado e aproximadamente 150 mg foram utilizados para a extração do DNA genômico na Clínica Fitossanitária, (DFS, UFSM). Três protocolos empregados para extração de DNA de Lepidoptera foram utilizados no experimento. A extração de DNA procedeu conforme os procedimentos descritos nos métodos abaixo, e foi realizada em duplicata. Ao término de cada extração o *pellet* foi ressuscitado em 50 µl de água ultra-pura estéril e armazenado à -20°C.

Método 1: método baseado na lise celular por *Sarcosyl* modificado (CHEUNG; HUBERT; LANDRY, 1993; SOSA-GÓMEZ, 2004). O tecido foi homogeneizado em 600 µL tampão de extração (200 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 70 mM de EDTA, 2M NaCl, 20 mM de metabisulfito de sódio) em microtubo, 150 µL de L-loril *sarcosyl* 5% foi adicionado e incubado a 65 °C/ 5 min. Após, adicionou-se 7,5 µL de Proteinase K 10 mg mL⁻¹, incubado por 65 °C/ 60 min., e centrifugado a 13.000 rpm/ 15 min. A fase superior foi transferida para novo microtubo e adicionado igual volume de clorofórmio/ álcool isoamil (24:1) e centrifugada a 13.000 rpm/ 15 min. A fase aquosa foi transferida para novo microtubo e repetida a etapa clorofórmio/ álcool isoamil. RNase 10 µg mL⁻¹ foi adicionada e incubada a 37°C/ 30 min. O DNA foi precipitado com adição de 600 µL de isopropanol 100% e 405 µL de acetato de amônia 5 M, mantida durante a noite a 4 °C e centrifugada a 13.000 rpm/ 15 min. O pellet de DNA foi lavado com 400 µL de etanol 70%, centrifugado a 13.000 rpm/ 5 min. e seco ao ar (Tabela 1).

Método 2: método baseado na lise celular por CTAB (BLACK; DUTEAU, 1997; MARTINELLI et al., 2007). O tecido foi macerado em 500 µL de tampão de extração (100 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 1,4 m de NaCl, 0,02 mM de EDTA, CTAB 2% e beta-mercaptoetanol 0,2%), adicionado 10 µL proteinase K 10 mg mL⁻¹, e incubado a 65°C/ 2h. Logo, foi adicionado RNase 10 mg mL⁻¹ e homogeneizado a 37°C/ 3h. Após centrifugou-se a 13.000 rpm/ 5 min. Ao homogeneizado foi adicionado 500 µL de clorofórmio/ álcool isoamil (24:1) e centrifugado a 13.000 rpm/ 20 min. A fase aquosa foi transferida para novo microtubo e a etapa clorofórmio/ álcool isoamil foi repetida. O DNA foi precipitado com 400 µL de isopropanol 100% gelado e incubado

a 4°C/ 8h. Após, o precipitado foi centrifugado a 13.000 rpm/ 30 min. O *pellet* de DNA foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 100%, centrifugado a 13.000 rpm/ 5 min. O *pellet* de DNA foi seco ao ar (Tabela 1).

Método 3: método baseado na lise celular por SDS (LUQUE et al., 2002; SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). O tecido foi macerado com 700 µL tampão de extração (10 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 75 mM de NaCl e 25 mM de EDTA), adicionado 10,5 µL de proteinase K 10 mg mL⁻¹ K, 35 µL de SDS 20%, 70 µL de beta-mercaptoetanol 1%, e incubado a 65°C durante a noite. Logo, adicionou-se 500 µL de clorofórmio/ álcool isoamil (24:1) e centrifugou-se a 14.000 rpm/ 50 min. A fase aquosa foi transferida para novo microtubo e a etapa clorofórmio/ álcool isoamil foi repetida. O DNA foi precipitado com 800 µL de isopropanol 100%, deixado descansar por 5 min. a temperatura ambiente, e centrifugado a 14.000 rpm/ 15 min. O *pellet* foi lavado com 500 µL de etanol 70%, centrifugado a 1300 rpm/ 5 min. e seco ao ar (Tabela 1).

Tabela 1- Reagentes/soluções de cada método de extração de DNA.

Reagente/solução	Métodos*		
	(1)	(2)	(3)
Tampão de extração			
Tris-HCl	x	x	x
EDTA	x	x	x
NaCl	x	x	x
Metabisulfito de sódio	x		
β-mercaptoetanol		x	x
<i>Sarcosyl</i>	x		
CTAB		x	
SDS			x
Descontaminação			
Proteinase K	x	x	x
RNase	x	x	
Clorofórmio/isoamil	x	x	x
Precipitação			
Isopropanol	x	x	x
Acetato de amônio	x		
Lavagem			
Etanol	x	x	x

*Métodos baseados na lise celular por (1) *Sarcosyl*; (2) CTAB; e (3) SDS.

Detecção da quantidade e qualidade do DNA

O DNA obtido nos protocolos de extração (1µl) foi corado com Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia, São Paulo, BR), e observado pela performance em eletroforese em gel de agarose 1% a 90V, em tampão de corrida TBE 1X (90 mM de Tris base, 90 mM de ácido bórico e 2 mM EDTA (pH 8,0), visualizado em transluminador com lâmpada ultravioleta (UV), e as imagens foram digitalizadas em sistema de captura de imagens (Kodak). No gel foi observada a quantidade de DNA, a qualidade do DNA extraído e a presença ou ausência de moléculas degradadas. A quantidade de DNA das amostras foi comparada com o marcador molecular High DNA Mass Ladder (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) utilizando conforme o fabricante, através do programa Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software (Eastman Kodak), e a concentração medida em espectrofotômetro (FEMTO Cirrus 80 ST) no comprimento de onda de 260nm. A relação 260/280 foi utilizada para caracterizar a pureza do material. Todo o DNA foi armazenado a -20°C para a utilização na PCR.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada com o 1µL do DNA extraído pelos três protocolos para *C. includens* e *S. eridania*, utilizando os *primers* LCO1490 (GGTCAACAAATAAAGATATTGG) e HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) que amplificam uma sequência de 709 pb do gene COI I (*mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I*) (FOLMER et al., 1994). A reação continha 1x do tampão de reação (500 mM de Tris-HCl (pH8,5), 150 mM de sulfato de amônio (pH 9,3), 25 mM de MgCl₂ e Tween 20 1%), 0,2 µM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 2,5 U da Taq DNA polimerase (Sigma-Aldrich) num volume final de 25µL. As condições de reação seguiram de desnaturação inicial de 94°C/4 min.; seguida de 25 ciclos de 94°C/ 1 min., 50°C/1 min., 72°C/ 1:30 min., com extensão final a 72°C/ 5 min. em termociclador PTC-100TM (MJ Research). Os fragmentos da PCR foram corados com Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia), e submetidos a eletroforese com gel de agarose 1% à 90V. O tamanho do fragmento amplificado foi estimado por comparação com marcador molecular de 1 Kb (Sigma-Aldrich). A PCR foi repetida para cada amostra de DNA.

Análise dos resultados

Os protocolos foram comparados quanto à quantidade e qualidade de DNA extraído, ao custo por reação, ao tempo de cada procedimento para extração de DNA de uma amostra, e quanto ao desempenho na PCR. Os dados de tempo de preparo e custo de extração de DNA foram submetidos à análise estatística pelo teste t a nível de 5% de probabilidade de erro, pelo programa Assisat 7.7 beta (SILVA, AZEVEDO, 2009).

Resultados

Quantidade e qualidade do DNA

Os três métodos geraram *pellet* de DNA ao final da extração, entretanto os métodos 2 e 3 geraram *pellet* escurecido para extração do DNA de *C. includens*, e muito escuro para *S. eridania*, enquanto o método 1 gerou *pellet* claro para ambas as espécies (Figura 1). A ressuspensão do DNA nos métodos 2 e 3 apresentou viscosidade para *C. includens* e *S. eridania*.

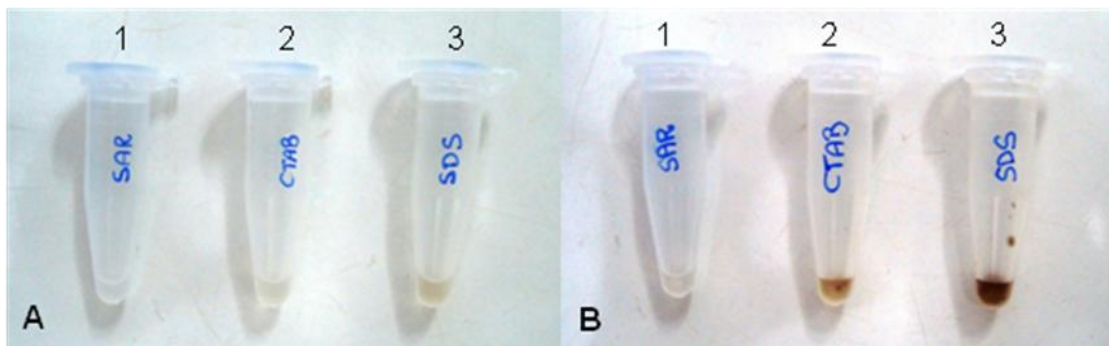


Figura 1- Aspecto visual da pureza do DNA extraído de *C. includens* (A) e *S. eridania* (B) pelos diferentes métodos. A e B: 1, protocolo 1 (*Sarcosyl*); 2, protocolo 2 (CTAB); 3, protocolo 3 (SDS).

O DNA extraído pelos métodos testados para as duas espécies apresentou uma banda completa, de aproximadamente 13 Kb quando comparado com o marcador molecular High DNA Mass Ladder. E todas as amostras estavam livres de RNA, pois não foram observadas bandas com menor massa molecular no gel (Figura 2). As concentrações determinadas por espectrofotometria variaram entre 1730 a 1830 ng μL^{-1} para *C. includens* e 1680 a 1800 ng μL^{-1} para *S. eridania*.

(Tabela 2). A concentração observada no gel de agarose foi de 1096 ng μL^{-1} pelo método 3 e 849 ng μL^{-1} pelo método 1 para *C. includens*, e 602 ng μL^{-1} pelo método 2 e 355 ng μL^{-1} pelo método 3 para *S. eridania* (Tabela 2). As taxas A260/A280 variaram entre 1,125 no método 1 e 1,094 no método 3, para *C. includens*, e 1,137 no método 1 e 1,089 no método 2, para *S. eridania* (Tabela 2).

Tabela 2 - Quantificação e análise de pureza do DNA extraído de *C. includens* e *S. eridania* por diferentes métodos de extração de DNA.

Método ¹	A260	A280	A260/A280	Concentração ² (ng μL^{-1})	Concentração com marcador ³ (ng μL^{-1})
<i>C. includens</i>					
1	0,354	0,314	1,125	1770	849
2	0,366	0,331	1,107	1830	785
3	0,347	0,317	1,094	1730	1096
<i>S. eridania</i>					
1	0,336	0,295	1,137	1680	493
2	0,341	0,313	1,089	1700	602
3	0,361	0,328	1,100	1800	355

¹ Método 1 (*Sarcosyl*); 2 (CTAB); e 3 (SDS)

² Concentração = A260x100x0.05 ng μL^{-1}

³ Comparação com marcador molecular High DNA Mass Ladder (Invitrogen)

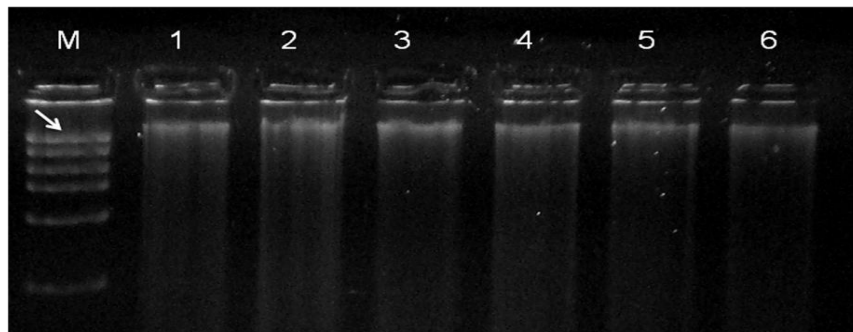


Figura 2 - Eletroforese do DNA extraído de *C. includens* (1-3) e *S. eridania* (4-6) pelos diferentes métodos. M, High DNA Mass ladder (Invitrogen); 1 e 4, método 1 (*Sarcosyl*); 2 e 5, método 2 (CTAB); 3 e 6, método 3 (SDS); Seta indica banda com 10 Kb.

O método 1 apresentou menor custo por extração, R\$ 4,50, diferindo estatisticamente dos demais métodos. O método 3 apresentou o menor tempo de preparo, diferindo estatisticamente do método 2. Entretanto o método 3 não diferiu estatisticamente do método 1, dispendendo 12 horas e 13 horas para a extração do DNA, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Tempo de preparo e custo por amostra para cada método de extração de DNA.

Método	Tempo de preparo (horas)	Custo por amostra* (R\$)
1	13 ab	4,30 c
2	17 a	8,55 a
3	12 b	5,88 b

Teste t ao nível de 5% de probabilidade.

* Valores de 2012

Análise da PCR

A comparação da amplificação por PCR entre os métodos testados é mostrada na Figura 3. O DNA extraído de *C. includens* pelos três métodos foi amplificado pelos *primers* para o gene COI I, gerando uma banda clara, de aproximadamente 709 pb. As amostras obtidas pelos métodos 1 e 2 para *S. eridania* também amplificaram, gerando um fragmento de similar tamanho. A amostra obtida de *S. eridania* pelo método 3 não amplificou.

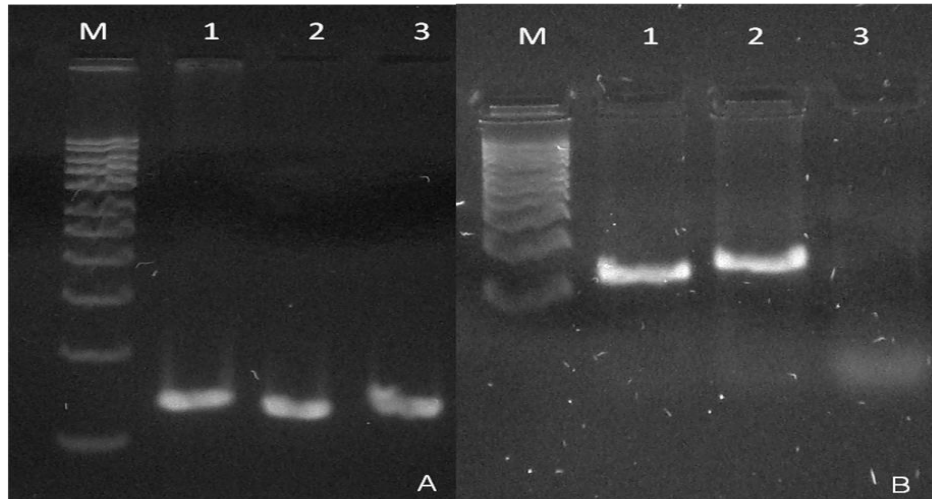


Figura 3 - Amplificação do DNA extraído de *C. includens* (A) e *S. eridania* (B) pelos diferentes métodos com *primers* para o gene COI. M: marcador de peso molecular de 1Kb; 1: método 1 (*Sarcosyl*); 2: método 2 (CTAB); 3: método 3 (SDS).

Discussão

No presente estudo, foram avaliados três métodos de extração de DNA, baseados na lise celular por *Sarcosyl*, CTAB e SDS para duas espécies de lagartas da soja, *C. includens* e *S. eridania*. Comparando-se os métodos, o DNA extraído pelo método *Sarcosyl* apresentou melhores resultados. O método 1 (*Sarcosyl*) gerou ao final da extração pellet claro, sem viscosidade, e gerou DNA que amplificou com os *primers* para o gene COI I, também apresentou menor custo e baixo tempo de preparo. Entretanto, o valor de pureza foi inferior ao esperado, o que seria indicativo da presença de fatores inibidores da PCR, resultado semelhante para todos os métodos.

O escurecimento do pellet, gerado pelos métodos 2 e 3 para ambas as espécies, demonstra a presença de contaminantes, como polifenóis, que não foram eliminados por esses métodos ao fim da extração do DNA, apesar de apresentarem adição de β -mercaptoetanol, reagente que elimina os polifenóis, inibindo o efeito oxidativo sobre o DNA (ROMANO; BRASILEIRO, 1999). Outro fator que indica a presença de contaminantes é a análise visual da viscosidade da ressuspensão. Os métodos 2 e 3 apresentaram viscosidade para *C. includens* e *S. eridania*, indicando a presença de polissacarídeos. Esse contaminante pode inibir a PCR (CHIARI; VALLE; RESENDE, 2009; DEMEKE; JENKINS, 2010).

A razão A260/A280 menor que 1,8 indica contaminação por proteínas e/ou polissacarídeos remanescentes dos tecidos do inseto (DEMEKE; JENKINS, 2010; PANDEY; ADAMS; FLOURNOY, 1996). Por um lado, a contaminação por polissacarídeos parece ser mais provável, visto que os protocolos contêm duas etapas de purificação com clorofórmio e adição de proteinase K, enzima que degrada proteína. O clorofórmio é responsável pela desnaturação e remoção de proteínas e lipídios (HOY, 2003). Ainda, a viscosidade do DNA ressuspenso indica maior contaminação por polissacarídeos no DNA extraído pelos métodos 2 e 3, dado que corrobora com a menor taxa A260/A280 observada para estes métodos. Entretanto, as bandas não apresentaram forma cônica em direção ao polo positivo ou muito DNA retido no poço do gel (Figura 2), outro indicativo de contaminação por polissacarídeos (ROMANO; BRASILEIRO, 1999). No método 1 ocorreu a precipitação com acetato de amônio, reagente que ajuda a eliminar polissacarídeos (ROMANO; BRASILEIRO, 1999).

Uma hipótese para o baixo valor encontrado para a razão A260/A280 é a influência do tempo de armazenamento do DNA para a quantificação. O DNA extraído foi armazenado por 6 meses até ser quantificado por espectrofotometria. Quanto menor o tempo de armazenagem para a quantificação por espectrofotometria melhor a observação de pureza pela razão A260/A280. Portanto o valor da razão A260/A280 não deve ser considerado conclusivo para a comparação entre os métodos (CALDART et al., 2011).

Todos os métodos demonstraram extrair DNA suficiente para a utilização na PCR. As análises moleculares baseadas na PCR utilizam a partir de 20 ng de DNA para cada reação (BARBOSA; FREITAS; MORALES, 2014; LUQUE et al., 2002; MARTINELLI et al., 2006). Sendo que, quando submetido a PCR, o DNA extraído de *C. includens* pelos três métodos amplificou, indicando quantidade suficiente de DNA, boa condição do DNA e baixa presença de contaminantes. Contudo, o DNA de *S. eridania* obtido pelo método 3 não amplificou. Este método para essa amostra foi o que mais apresentou contaminantes após a extração, como polifenóis, polissacarídeos e proteínas (DEMEKE; JENKINS, 2010; PANDEY; ADAMS; FLOURNOY, 1996; ROMANO; BRASILEIRO, 1999).

Mesmo que os três métodos foram utilizados anteriormente para extração de DNA de Noctuides e aplicados com marcadores moleculares baseados na PCR (LUQUE et al., 2002; MARTINELLI et al., 2007; SOSA-GÓMEZ, 2004), a

comparação foi positiva na busca de um protocolo que melhor se adeque a demanda de extração laboratorial. Dentre os protocolos estudados o método baseado na lise celular por *Sarcosyl* é o que melhor reverte em quantidade, qualidade e economia, gerando DNA consistente para ser utilizado em trabalhos moleculares baseados na PCR.

Referências Bibliográficas

ANGULO, A. O.; WEIGERT, T. G. **Estados inmaduros de lepidópteros nóctuidos de importancia económica en Chile y claves para su determinación (Lepidoptera: Noctuidae)**. Concepción: Sociedad de Biología de Concepción, 1975.

BARBOSA, N. C. C. P.; FREITAS, S.; MORALES, A. C. Distinct genetic structure in populations of *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera, Chrysopidae) shown by genetic markers ISSR and COI gene. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 58, n. 2, p. 203-211, 2014.

BLACK, W. C.; DUTEAU, N. M. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. In: CRAMPTON, J.M.; BEARD, C.B.; LOUIS, C. **The molecular biology of insect disease vectors: a methods manual**. London: Chapman & Hall, 1997. p. 361-373.

CALDART, E. T. et al. Análise comparativa de métodos de extração de DNA genômico de células do sangue e do leite de pequenos ruminantes e do leite de pequenos ruminantes. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, n.1, 2011. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/actavet/39-1/PUB%20945.pdf>

CHEN, M. et al. Methodological comparison of DNA extraction from *Holcocerrus hippophaecolus* (Lepidoptera: Cossidae) for AFLP analysis. **Forestry Studies in China**, Beijing, v. 10, n. 3, p. 189-192, 2008.

CHEUNG, W. Y.; HUBERT, N.; LANDRY, B. S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **Technical Tips**, v. 3, n. 497, p. 500-1993.

CHIARI, L.; VALLE, J. V. R.; RESENDE, R. M. S. Comparação de três métodos de extração de DNA genômico para análises moleculares em *Stylosanthes guianensis*.

Embrapa.Circular Técnica, Campo Grande, n.36, 2009. Disponível em: <http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/ct/ct36/CT36.pdf>

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C. **Manejo avançado**. Pelotas, 1 Mar. 2014. Disponível em: Cultivar Grandes Culturas. Acesso em:

DEMEKE, T.; JENKINS, R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, n. 396, p. 1977-1990, 2010.

EICHLIN, T. D. **A guide to the adult and larval Plusiinae of California (Lepidoptera: Noctuidae)**. California: California Department of Food and Agriculture, 1975.

EICHLIN, T. D.; CUNNINGHAM, H. B. **The Plusiinae (Lepidoptera:Noctuidae) of America north of Mexico, emphasizing genitalic and larval morphology**. Washington: United States Department of Agriculture, 1978.

FOLMER, O. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 294-299, 1994.

GAZZONI, D. L. Palmo a palmo contra a soja. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, v. 11, p. 12-13, 1999.

GUEDES, J. V. C. et al. Nova dinâmica. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, v. 139, p. 24-26, Dec.2010.

HEPPNER, J. B. *Spodoptera* Armyworms in Florida (Lepidoptera: Noctuidae). **Entomology Circular**, Florida, n. 390, 1998.

HOY, M. A. **Insect molecular genetics. An introduction to principles and applications**. 2. ed. San Diego, CA: Academic Press/Elsevier, 2003.

LUQUE, C. et al. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepidoptera). **Hereditas**, Lund, v. 136, p. 251-253, 2002.

MARSARO JÚNIOR, A. L. et al. Flutuação populacional de insetos-praga na cultura da soja no Estado de Roraima. **Revista Acadêmica : Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 71-76, 2010.

MARTINELLI, S. et al. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, n. 2, p. 519-526, Apr.2006.

MARTINELLI, S. et al. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 97, p. 225-231, 2007.

MOSCARDI, F. et al. Artrópodes que atacam as folhas de soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. **Soja. Manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 214-334.

PANDEY, R. N.; ADAMS, R. P.; FLOURNOY, L. E. Inhibition of Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 14, n. 1, p. 17-22, 1996.

PAPA, G.; CELOTO, F. J. **Lagartas na soja**. São Paulo, 6 Sept. 2007. Disponível em:

<http://www.ilhasolteira.com.br/colunas/index.php?acao=verartigo&idartigo=1189090532>. Acesso em: 16 May. 2011

PASSOA, S. Color identification of economically important *Spodoptera* larvae in Honduras (Lepidoptera: Noctuidae). **Insecta Mundi**, Gainesville, v. 5, n. 3-4, p. 185-196, 1991.

RAMPELOTTI, F. T. et al. Diversidade genética de *Tibraca limbativentris* Stål (Hemiptera: Pentatomidae) de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, usando marcadores RAPD. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, n. 1, p. 20-29, 2008.

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.2, 1999. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio09/extracao.pdf> Acesso em: 1 June. 2013.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SCHROEDER, H.; DEGEN, B. Spatial genetic structure in populations of the green oak leaf roller, *Tortrix viridana* L. (Lepidoptera, Tortricidae). **European Journal of Forest Research**, Berlin, v. 127, p. 447-453, 2008.

SILVA, F. A. S., AZEVEDO, C. A. V. Principal components analysis in the software Assistat-Statistical Attendance. **Anais...**Reno-Nv-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SOSA-GÓMEZ, D. R. Intraspecific variation and population structure of the Velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 3, p. 378-384, 2004.

ARTIGO 2 - MOLECULAR VARIABILITY AND GENETIC STRUCTURE OF *CHRYSODEIXIS INCLUDENS* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE), AN IMPORTANT SOYBEAN DEFOLIATOR IN BRAZIL

Janine Palma^{1,2,*}, Kevin Maebe², Jerson Vanderlei Carús Guedes¹, Guy Smagghe²

¹ Laboratory of Integrated Pest Management, Department of Crop Protection, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

² Laboratory of Agrozoology, Department of Crop Protection, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Ghent, Belgium

Abstract

This study provides the first genetic characterization of the soybean looper, *Chrysodeixis includens* (Walker, 1857), an important defoliating pest species of soybean crops in Brazil. Population genetic variability and the genetic structure of *C. includens* populations were evaluated by using ISSR markers with samples from the major soybean producing regions in Brazil in the growing seasons 2011/2012. Seven different primers were applied for population characterization of the molecular variability and genetic structure of 30 soybean looper populations from 9 states of Brazil. The 247 polymorphic loci across the 262 specimens revealed a very high genetic variability between the individuals. The genetic diversity (H_E) in the populations varied between 0.072 and 0.120, while the overall H_E was 0.094. The analysis of molecular variance indicated that 94% of the variability was expressed among individuals within populations ($F_{ST} = 0.056$, $p = 0.001$). The low level of polymorphism over all populations, the high levels of gene flow, and the low genetic structure are indicative of the exchange of genetic information between the different sampled regions. Population structuring suggests the presence of two major groups which do not correlate with their geographic sampling location in Brazil. These results may indicate recent colonization of *C. includens* in Brazil or migration patterns following source-sink dynamics. Furthermore, the presence of two groups within *C. includens* suggests that a study on development of resistance needs to be evaluated

on both groups, and pest management in soybean fields should be aware that differences may come to the control strategies they use.

Introduction

The distribution of the soybean looper, *Chrysodeixis includens*, is restricted to the Western Hemisphere, from the USA to southern South America. In most parts of the USA, *C. includens* is known to migrate, while Florida, Central and South America are reservoirs for overwintering populations [1, 2]. The caterpillar has a broad host range, including 73 plants from 28 different families [3]. In Brazil, this species is considered to be a pest species of important summer crops like soybean, cotton, beans and tomato. Hence, the caterpillars are also found in crops of mild weather such as some Brassicaceae: e.g. broccoli, cabbage and watercress [4]. In the South of Brazil, *C. includens* was even found feeding on radish during the winter (own observations).

C. includens has caused significant damage to soybean, especially in the producing regions of Brazil [5-7]. Until the 90s the soybean looper was considered to be a secondary pest with: a low distribution, an isolated appearances, and small populations when present in the crop cycle [8]. Indeed, the importance increased due to surges of the caterpillar in several states over the years, occurring isolated or in association with another defoliating caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in the soybean vegetative phase [6, 8]. In 2014, the soybean looper has received more and close attention as a pest species in Brazil, due to a reinfestation event in soybean fields, with an increase in population numbers at the end of the culture cycle [9]. Before designing strategies for controlling this pest species in soybean, we need information about the population structure and gene flow of this species.

The control of the soybean looper in Brazil is currently in a transition period, between the use of insecticides and the use of genetic modified soybean that expresses the insecticidal protein Cry1Ac of *Bacillus thuringensis*, with currently no resistance observed [10]. However, in the USA high levels of resistance to pyrethroid insecticides has been reported in field populations [11, 12]. The determination of the population genetic structure, as well as the gene flow among different geographic areas have a practical application in pest control programs. As they will help in

designing appropriate resistant management strategies, preventing the rapid dispersion of resistance when it is detected in field populations [13].

In general, DNA methodologies are contributing to our knowledge of genetic diversity and population structure [14]. Molecular markers are used to estimate gene flow and genetic variation [15]. Over the last decade several studies have attempted to determine the genetic characterization of populations from different species of the Noctuidae family using different molecular markers [16-21]. However, until now there was no study which molecularly characterized populations of the soybean looper.

Here in this study, we performed the first molecular characterization of *C. includens* with the use of Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. ISSR markers were widely used to characterize plants [22], and are more recently used also in insects to study the populations of Lepidoptera [23-26], Coleoptera [27], Diptera [13, 28], Hymenoptera [29], and Neuroptera [30]. ISSR markers are arbitrary markers produced by PCR, which permit the detection of polymorphisms in inter-microsatellite loci regions using specific primers designed from di-, tri- or tetra-nucleotide sequence repeats. ISSR markers have the advantage of: requiring no prior information of DNA sequence of the target species, and producing fragments with higher reproducibility, in contrast to microsatellites and RAPD (Random Amplified Polymorphic) markers, respectively [13].

The aim of the present study was to detect patterns of genetic variation in populations of *C. includens*, and to get information about the population structure and gene flow of this pest species. This information could become essential in designing strategies for controlling this pest species in soybean, and provide more insights useful in the decision-making for resistance management.

Materials and Methods

Insect samples

Caterpillars were collected from several soybean production regions in Brazil (Table 1 and Figure 3) (collection permit emitted by Brazilian Institute of Environment - IBAMA/SISBIO # 32627-2), and were kept in 96% ethanol for transport to the Integrated Pest Management Laboratory (LabMIP) in the Plant Health Protection Department of the Federal University of Santa Maria (UFSM) where they were stored and frozen in microcentrifuge tubes at -20°C. The immatures of *C. includens* were

identified in LabMIP by morphologic characterization [31-33]. Each sampling location was considered as a separate population.

Table 1. Details of the 30 sampling locations of *C. includes* included in this study.

Location (city, state)	Code	Sample size	Latitude (S)	Longitude (O)	Collection date
Currais, PI	PI01	5	08°59'56,2"	44°41'03,6"	Jan/2012
Alvorada, TO	TO01	10	12°26'48,2"	49°07'14,7"	Jan/2012
Porto Nacional, TO	TO02	10	10°34'49,5"	48°22'16,8"	Jan/2012
Correntina, BA	BA01	11	13°20'20,8"	46°02'11,3"	Jan/2012
Barreiras, BA	BA02	10	11°41'31,6"	46°08'21,2"	Jan/2012
São Desidério, BA	BA03	10	13°07'11,3"	46°02'9,9"	Jan/2012
Formosa do Rio Preto, BA	BA04	8	11°29'23,2"	45°36'53,7"	Jan/2012
Formosa, GO	GO01	4	15°32'54,3"	47°10'11,1"	Fev/2012
Americano do Brasil, GO	GO02	10	16°17'51,7"	49°54'48"	Jan/2012
Edéia, GO	GO03	10	17°19'39,1"	49°55'19,1"	Jan/2012
Rio verde, GO	GO04	10	17°31'17,3"	51°00'10,3"	Jan/2012
Sorriso, MT	MT01	4	12°14'9,4"	55°33'21,1"	Jan/2012
Rondonópolis, MT	MT02	4	17°06'3,7"	54°50'54,9"	Jan/2012
Nova Mutum, MT	MT03	7	13°04'5,1"	55°55'23,9"	Jan/2012
Itiquira, MT	MT04	10	17°12'58,9"	54°08'57,8"	Jan/2012
Naviraí, MS	MS01	10	23°00'41,1"	54°07'26,2"	Fev/2012
Chapadão do Sul, MS	MS02	6	18°46'48,4"	52°38'43,1"	Jan/2012
Dourados, MS	MS03	10	22°14'29,5"	54°35'16,2"	Fev/2012
Maracaju, MS	MS04	10	21°37'25,5"	55°08'10,7"	Fev/2012
Unaí, MG	MG01	9	16°22'19,44"	47°07'19,22"	Jan/2012
Paracatu, MG	MG02	10	16°50'13"	47°03'30"	Jan/2012
Coromandel, MG	MG03	7	18°27'16,7"	47°12'29,4"	Jan/2012
Tibagi, PR	PR01	10	24°32'59,4"	50°27'8,1"	Fev/2012
Londrina, PR	PR02	11	23°14'94,3"	51°15'07"	Fev/2012
Campo Mourão, PR	PR03	9	24°08'5,7"	54°08'57,8"	Fev/2012
Cruzeiro do Oeste, PR	PR04	11	23°48'0,8"	53°09'62,5"	Fev/2012
São Vicente do Sul, RS	RS01	9	29°45'57,8"	54°42'27,7"	Fev/2012
Frederico Westphalen, RS	RS02	9	27°23'21,4"	53°22'31,2"	Fev/2012
Palmeira das Missões, RS	RS03	11	27°56'28,7"	53°17'52,4"	Fev/2012
Santa Maria, RS	RS04	7	29°42'48,5"	53°44'01,3"	Fev/2012
Total		262			

DNA extraction

The caterpillars were dissected, and the integument was used for DNA extraction. The cell lysis based protocol of Sarkosyl [18] was first tested (data not shown) and then performed with some small modifications. After the separation of the organic phase with chloroform/isoamyl alcohol, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ of RNase was added, and then incubated at 37°C for 30 min. Then, the DNA was precipitated by the addition of 2 times the amount of the final volume of cold 100% isopropanol and 45% of the final volume of 5 M ammonium acetate. At the end of each extraction the pellet was resuspended in $25 \mu\text{l}$ of Milli-Q water, and stored at -20°C . A total of 50-200 ng of genomic DNA was observed by electrophoresis on 1% agarose gel using 1X TBE buffer (Tris/Acid Boric/EDTA) at 80 V.

ISSR amplification

Molecular analysis was performed using seven ISSR primers (Table 2). The primers, which consist out of $(\text{CA})_n + \text{base}$, are repeated sequences that appear most frequently in the genome of Lepidoptera [23, 34]. The other primers were tested to different species of Noctuidae, Pyralidae, Sphingidae and Pieridae [23, 24].

Two hundred sixty two individuals were used for the ISSR polymerase chain reaction (PCR) according to Liu *et al.* (2006), with $1 \mu\text{l}$ genomic DNA, and $0.5 \mu\text{M}$ of primer. In the amplification reaction samples were initially denatured at 94°C for 2 min, followed by 37 cycles at 94°C for 30 s, annealing at their respective temperature for 45 s (Table 2), and extension at 72°C for 1.5 min. The PCR protocol ended with a final extension step at 72°C for 20 min [35]. A negative control PCR tube was run with each primer to check for contamination.

ISSR products were visualized by electrophoresis using 1.5% agarose gel at 100V for 40 min in 0.5X TAE buffer (Tris/Acetate/EDTA). After staining with ethidium bromide buffer, the banding patterns were visualized under U.V.-light and photographed. The MassRuler™ DNA Ladder Mix molecular weight marker (Thermo Scientific, Pittsburg PA, USA) was ran as a standard with each primer. To ensure PCR quality, we repeated the PCR for all primers on some samples. Each primer was capable of producing a reproducible banding pattern.

Table 2. List of ISSR primers used for characterization of *C. includens*.

Code	Sequence (5'-3')	Annealing temp (°C)	Size range (pb)	Number of multiple bands
CI 01	CACACACACACACACACACAA	56	260-4800	34
CI 02	CACACACACACACACACACAT	56	280-4200	32
CI 03	CACACACACACACACACACAG	57	210-3700	35
CI 04	ACACACACACACACACACACC	54	180-4000	42
CI 05	GACAGACAGACAGACA	54	230-2700	29
CI 06	GGATGGATGGATGGAT	55	180-4000	38
CI 07	CTCTCTCTCACACACACA	55	260-4200	37
Total				247

Data analysis

The ISSR band profiles from each DNA sample were analyzed using the Bionumerics software (Applied Maths, Belgium), and scored for the presence (1) or absence (0) of bands for each primer, excluding weak and/or smeared bands. Thus, a binary matrix (1/0) was generated, with 247 multiple bands from 262 individuals.

Genetic diversity for each population was estimated through the percentage of polymorphic loci (P), the mean effective number of alleles (N_e), the mean expected heterozygosity (H_E), and the mean Shannon's Information Index (I), assuming Hardy-Weinberg Equilibrium by using the GenAlEx 6.5 software [36, 37].

Analysis of Molecular Variance (AMOVA) was conducted to calculate the variance among and within populations [38]. Genetic differentiation coefficients between populations were calculated as F_{ST} by using the GenAlEx 6.5 software [36, 37]. The significance was established by 999 permutations. Gene flow (Nm) was calculated as $Nm = (1 - F_{ST}) / 2F_{ST}$ [39].

The population structure of *C. includens* was determined by performing a Mantel test, Principal Coordinate Analysis (PCA) and Bayesian approach. The Mantel test, which assumes a linear correlation between geographic distance and genetic distance matrices, was done by using the GenAlEx 6.5 software with 9,999 permutations [36, 37]. The PCA was executed with the pairwise genetic distance matrix in GenAlEx 6.5, while the Bayesian approach was performed by using the

STRUCTURE v. 2.3.3 software [40]. The latter approach assumes a model with admixture of populations, starting from a single random-mating population and determines the number of populations that are more appropriate for interpreting the data. The number of populations (K) was estimated from 1 to 7 for each value with 50,000 burn-in iterations and 100,000 data collecting steps. The ΔK of the Evanno method [41] was performed to estimate the value of K that best fitted the data, by using the Structure Harvester v. 0.6.93 software [42]. The graphical visualization of the population structure was produced with the Distruct v. 1.1 software [43].

Results

Genetic variability

The seven ISSR primers provided clear, consistent and reproducible band patterns. With these primers, we scored a total of 247 ISSR bands, varying from 180 to 4800 pb, for 262 individuals of *C. includens* sampled from 30 geographic locations over 9 states in Brazil. All the produced bands were 100% polymorphic. The ISSR primer which amplified the highest number of bands was CI04 with 42 bands, and the lowest number of bands was, with 29, produced by primer CI05 (mean number of bands = 35.28) (Table 2).

The population with the highest percentage of polymorphism (P) was in Londrina (PR 02, 61.94%), while the lowest percentage occurred in Currais (PI 01, 27.13%) with a mean within population polymorphism rate of 47.26%. The overall populations mean expected heterozygosity (H_E) and Shannon's information index (I), both parameters of genetic diversity, were 0.094 and 0.160, respectively. The population in Londrina (PR 02) showed the highest genetic diversity with $H_E = 0.120$ and $I = 0.207$. While Currais (PI 01) showed the lowest genetic diversity with $H_E = 0.072$ and $I = 0.117$. The mean effective number of alleles (N_e) within the populations was 1.130 (Table 3).

Table 3. Genetic diversity of different *C. includens* sampling sites.

Population	P^a (%)	Ne^b	I^c	H_E^d
PI 01	27.13	1.108	0.117	0.072
TO 01	55.47	1.130	0.172	0.097
TO 02	48.58	1.139	0.168	0.099
BA 01	55.06	1.122	0.163	0.092
BA 02	50.61	1.126	0.161	0.093
BA 03	52.63	1.115	0.158	0.089
BA 04	43.72	1.123	0.152	0.089
GO 01	30.36	1.139	0.143	0.091
GO 02	57.09	1.136	0.178	0.102
GO 03	57.49	1.147	0.186	0.107
GO 04	53.44	1.132	0.171	0.098
MT 01	28.74	1.132	0.135	0.086
MT 02	30.77	1.134	0.142	0.089
MT 03	42.51	1.136	0.161	0.097
MT 04	47.37	1.121	0.154	0.089
MS 01	55.06	1.138	0.178	0.103
MS 02	39.27	1.124	0.149	0.089
MS 03	49.80	1.123	0.157	0.090
MS 04	47.77	1.111	0.148	0.084
MG 01	49.80	1.132	0.165	0.096
MG 02	48.18	1.134	0.163	0.096
MG 03	44.94	1.125	0.156	0.091
PR 01	47.77	1.124	0.158	0.091
PR 02	61.94	1.164	0.207	0.120
PR 03	50.61	1.134	0.170	0.099
PR 04	57.09	1.129	0.174	0.098
RS 01	44.13	1.128	0.153	0.090
RS 02	50.61	1.131	0.165	0.095
RS 03	55.06	1.124	0.167	0.094
RS 04	34.82	1.138	0.143	0.089
Mean	47.26	1.130	0.160	0.094

^a P = percentage of polymorphic loci; ^b Ne = mean effective number of alleles; ^c I = mean Shannon's information index; ^d H_E = mean expected heterozygosity.

Population genetic structure

The analysis of the genetic structure of the *C. includens* populations (AMOVA) indicated a low but significant genetic differentiation among populations ($F_{ST} = 0.056$; $p = 0.001$), with 94% of the overall genetic variability occurring within populations and only 6% of the variation occurring among populations (Table 4). Furthermore, the Mantel test detected structuring with a low but significant correlation between genetic and geographic distances ($r = 0.238$; $p = 0.030$). The estimated amount of gene flow between the populations, indirectly calculated from F_{ST} , was high ($Nm = 9.89$), indicating median to high migration among sampling localities.

Table 4. Analysis summary of molecular variance (AMOVA) based on sampling sites of *C. includens*.

Source of variation	D.F.	Sum of Squares (SS)	Variance components	% of variation
Among sampling sites	29	899.569	1.210	6
Within sampling sites	232	4749.359	20.471	94
Total	261	5648.927	21.682	100

* $p < 0.0001$

The PCA of all individuals from the 30 sampling locations revealed two groups. The first Principal Component (PC1, Component X) explained with 23.47% most part of the variance, while the second Principal Component (PC2, component Y) explained 17.37% of the total variance. No clear geographical pattern between both groups was observed (Figure 1).

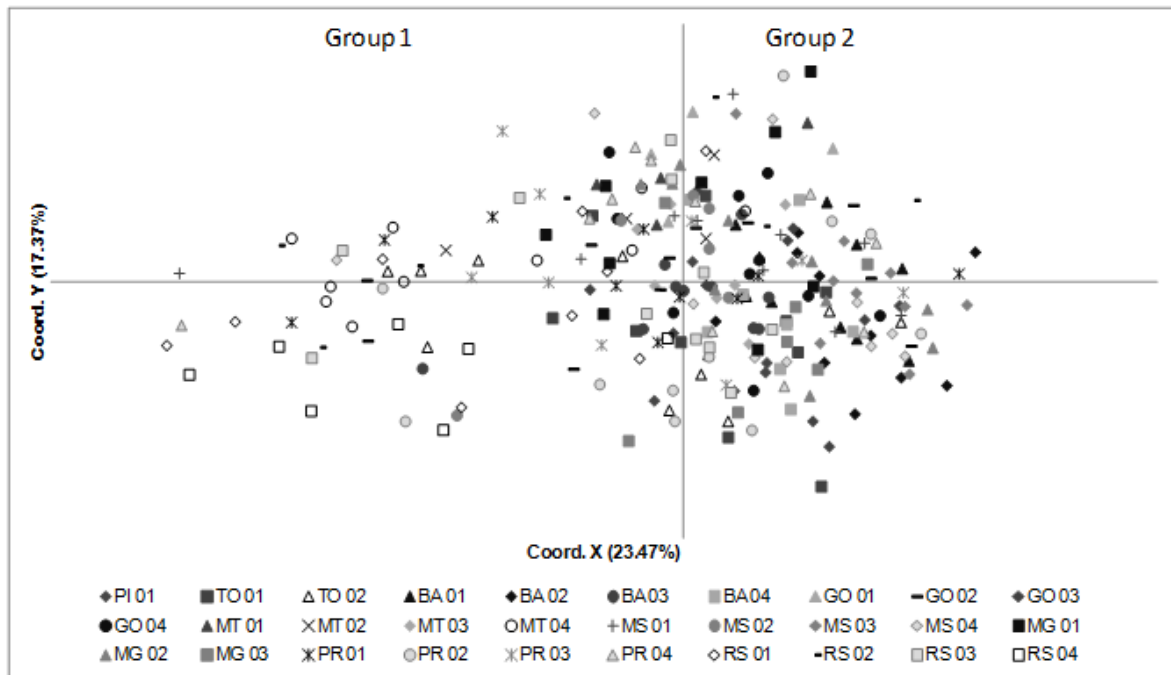


Figure 1. Principal coordinate analysis (PCA) of *C. includens*. The codes used here, correspond to the different populations described in Table 1.

The Evanno method identified $\Delta K = 2$ (Figure 2), this is the best value of K (or number of populations) that fitted our data. The suggestion of two groups was similar to the division obtained by the PCA, with no indication of structuring of the samples by location (Figure 3). Furthermore, the clusters in figure 3 suggest an exchange of genetic information between both groups.

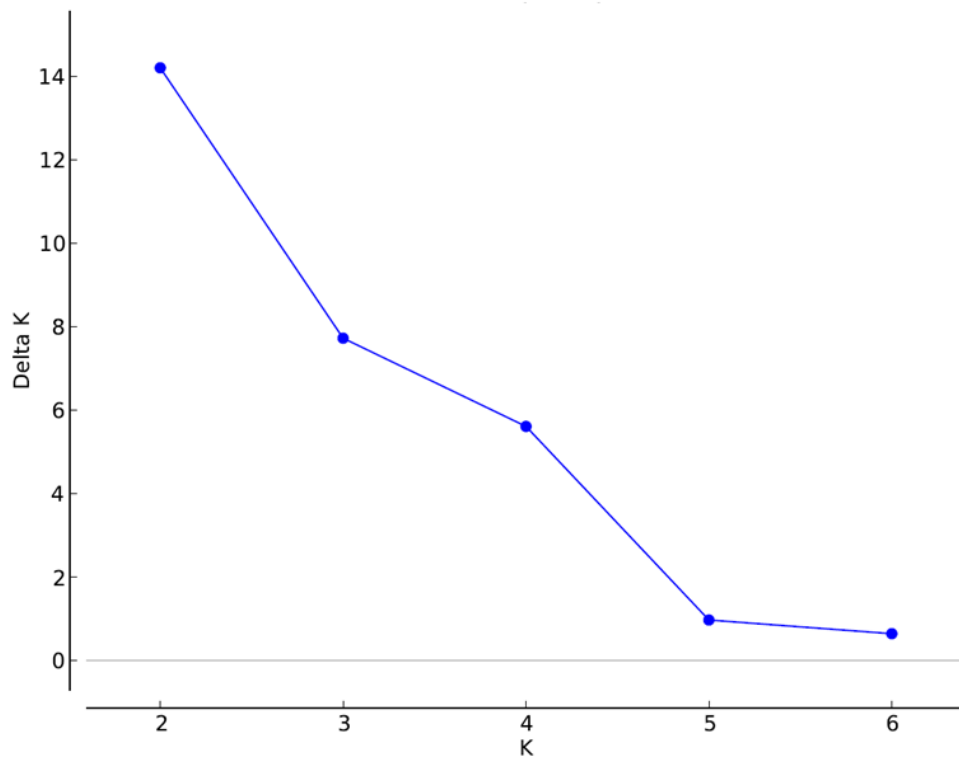


Figure 2. ΔK calculated by the Evanno method. The test was performed with all C. includes individuals from $K = 1$ to $K = 7$.

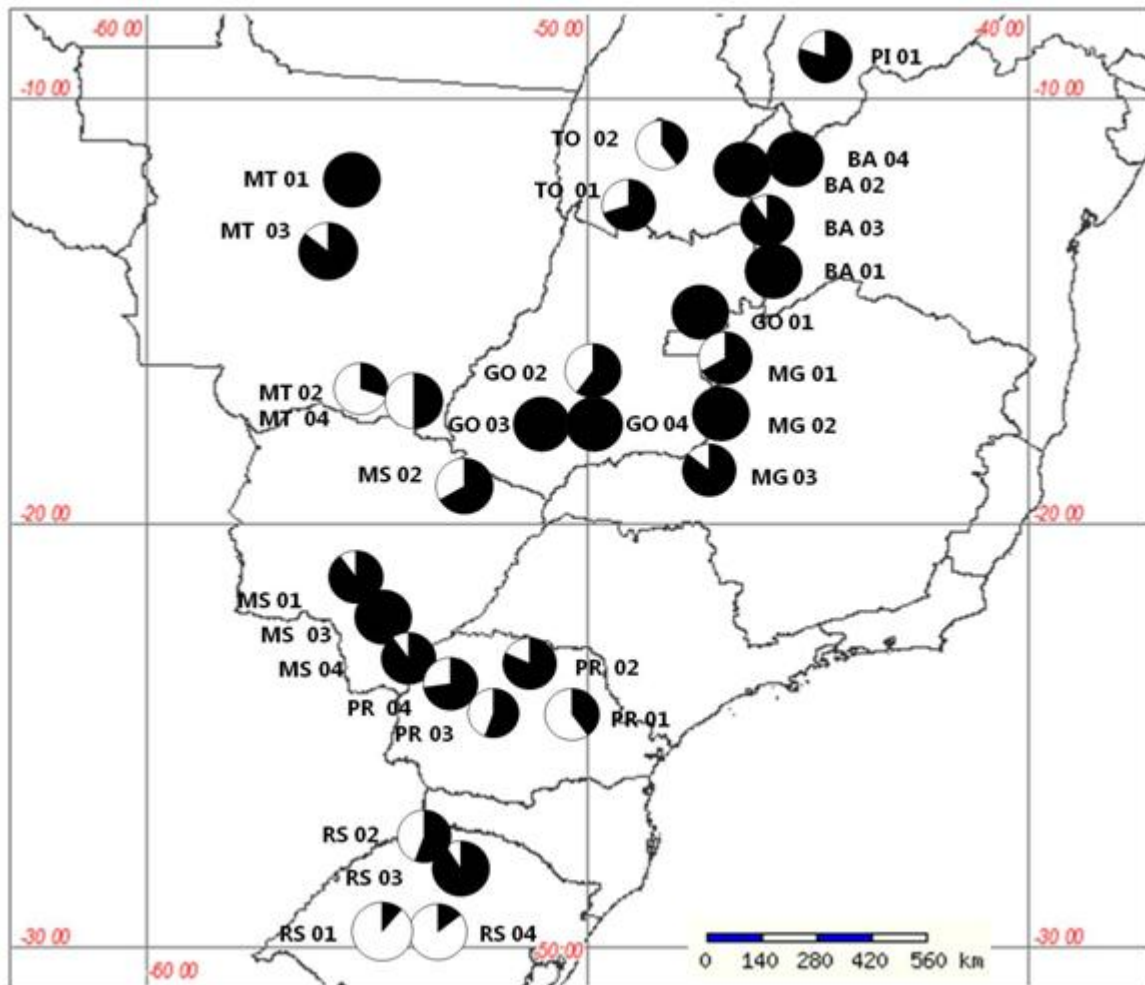


Figure 3. Distribution map of two *C. includens* groups identified with PCA and Structure. Pie charts are arranged on the geographical position of each sampled population. Each pie chart indicates the proportion of each group in the populations. Codes correspond to the populations described in Table 1.

Discussion

Here in this study, we performed the first molecular characterization of *C. includens* with the use of ISSR markers. To determine the genetic characterization of the soybean looper in Brazil, we conducted an analysis of the genetic diversity and population structure across 30 populations, utilizing seven ISSR molecular markers. We have chosen in this project to work with ISSR markers because they allowed us to detect a high level of polymorphic bands (100%). This is comparable with the polymorphism levels detected with ISSR markers in other species. For example, in *Lymantria dispar*, *Ceratitis capitata* and *Plutella xylostela*, the polymorphism levels

were 100%, 85% and 100%, respectively [13, 25, 44]. These high levels could be due to the high mutation rate, and/or insertion or deletion events within the microsatellite sequences and/or within the amplified region [45]. In general, the latter studies have proven that ISSR markers were efficient in the detection of the genetic variability in the studied populations.

In our study, the mean level of polymorphism over all populations was low (47.26%). Furthermore, the gene flow over all populations, estimated from the F_{ST} value, was high (9.89). The Mantel test detected a low correlation between genetic and geographic distances. Despite this low genetic differentiation between the *C. includens* populations, the PCA and Bayesian approach test divided all individuals in two major groups which were not correlated with the geographical origin of these samples. This low differentiation in two groups could be due to directional gene flow among the populations of *C. includes*. Together, these results clearly show the connectivity or exchange of genetic information between the different studied *C. includens* populations.

The high level of gene flow of *C. includens* in Brazil suggests a movement between host plants along the cultivated areas in Brazil. Soybean plantations in Brazil occur in the Mato Grosso state progressing to other states, following the rainfall in the Southeast, Midwest and Northeast, and the increase of the temperature in the Southern region. These temporal climatic changes could encourage the migration of moths to new areas with soybean, considering that moths of *C. includens* have preference to oviposit on soybean leaves [46]. Indeed, it is known that caterpillars have a food preference for soybean plants [47], and young larvae prefer to feed on young plants with low-fiber-containing leaf tissues of high digestibility [48]. However, this result cannot determine how the migration occurs every year and/or through of the time.

The results of this study may also be indicatives of a recent colonization of *C. includens* in Brazil. Indeed, the soybean looper is able to migrate long distances as (i) is seen in the USA where *C. includens* is recognized as a migration species, (ii) by the absence of overwintering and recolonization of *C. includens* in some states [49], and (iii) the permanent presence of *C. includens* in Florida where it can survive at average temperatures of 16°C [1]. The states of Florida and Texas as well as the Caribbean islands, Central or South America are considered to harbor the source

population of *C. includens* [2]. Therefore, the origin of *C. includens* in Brazil may be the Caribbean islands or Central America.

Although these results indicate migration between distant populations, remnant soybean plants and other host plants can function as reservoir or source population of soybean loopers during and after the winter [50]. In this context, poliphagous pest species such as the soybean looper, could show also resident individuals, once oviposition sites and food sources are available [19].

In this study we estimated that the gene flow over all populations was high (9.89). Values greater than nine migrants per generation were sufficient to homogenize populations [51]. Although natural selection tends to adapt populations to local environmental conditions, immigrants from other populations will introduce genes adapted to other conditions and will homogenize these populations [15]. Homogenous populations under high insecticide pressure, as occurs in Brazil, may exhibit insecticide resistance development under high level of gene flow, even when the initial frequency of resistant allele is low [52]. In Brazil, insecticide resistance is not yet reported but in the USA high levels of resistance against pyrethroids are known since 1990 [12]. However, year by year the soybean looper is more difficult to control in Brazil, in part due to the indiscriminate use of insecticides. The use of insecticides that kill both pest and their natural enemies could lead to an increase of the population of the surviving pest species because the natural enemies decrease in number and so the biological control potential. This in turn allows the resistance evolution of the pest [53].

In conclusion, we present here the first molecular study on the populations of the soybean looper, *C. includes*. Our results showed high levels of gene flow and low genetic differentiation between the different populations, which may indicate recent colonization of *C. includes* in Brazil and/or migration patterns following source-sink dynamics. Further research is needed to identify the migration patterns of *C. includes* in Brazil. Furthermore, the presence of two groups within *C. includes* suggests that a study on the effect of insecticides and the development of resistance needs to be evaluated on both groups. Taking this into consideration, pest management in soybean fields should be aware that differences may come to the control strategies they use.

References

1. Tingle FC, Mitchel ER (1977) Seasonal populations of armyworms and loopers at hastings, Florida. Fla Entomol 60: 115-122.
2. Herzog DC (1980) Sampling Soybean Looper on soybean. In: KOGAN M, HERZOG D editors. Sampling methods in soybean entomology. New York: Springer New York. pp. 141-168.
3. CAB International (2014). Crop Protection Compendium. Available: <http://www.cabicompendium.org/cpc/home.asp>. Accessed 21 March 2014.
4. Moscardi F et al. (2012) Artrópodes que atacam as folhas de soja. In: HOFFMANN-CAMPO CB, CORRÊA-FERREIRA BS, MOSCARDI F editors. Soja. Manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Brasília, DF: Embrapa. pp. 214-334.
5. Embrapa (2003). Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil. Available: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Soja/SojaCentralBRasil2003/index.htm>. Accessed 18 May 2011.
6. Guedes JVC, Stecca CS, Rodrigues RB, Bigolin M (1 Dec. 2010). Nova dinâmica. Available: Cultivar Grandes Culturas.
7. Marsaro Júnior AL, Pereira PRVS, Silva WR, Griffel SCP (2010) Flutuação populacional de insetos-praga na cultura da soja no Estado de Roraima. Rev Acad, Ciênc Agrá Ambient 8: 71-76.
8. Papa G, Celoto FJ (6 Sept. 2007). Lagartas na soja. Available: <http://www.ilhasolteira.com.br/colunas/index.php?acao=verartigo&idartigo=1189090532>. Accessed 16 May 2011.
9. Czepak C, Albernaz KC (1 Mar. 2014). Manejo avançado. Available: Cultivar Grandes Culturas.
10. Bernardi O et al. (2012) Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 x MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. Pest Manag Sci 68: 1083-1091. doi: 10.1002/ps.3271.
11. Thomas JD, Ottea JA, Boethel DJ, Ibrahim S (1996) Factors influencing pyrethroid resistance in a permethrin-selected strain of the Soybean Looper, *Pseudoplusia includens* (Walker). Pestic Biochem and Physiol 55: 1-9.
12. Portillo HE, Pitre HN (1997) Pyrethroid resistance levels in two generations of Soybean Looper (Lepidoptera: Noctuidae) on soybean in Mississippi. J Agr Entomol 14: 9-15.
13. Beroiz B et al. (2012) Genetic structure of Spanish populations of *Ceratitidis capitata* revealed by RAPD and ISSR markers: implications for resistance

- management. Span J Agric Res 10: 815-825. doi: 10.5424/sjar/2012103-694-11.
14. Ferreira ME, Grattapaglia D (1998) Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília: Embrapa-Cernagem. 220 p.
 15. Slatkin M (1987) Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science 236: 787-792.
 16. Clark PL et al. (2007) Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in the Western Hemisphere. J Insect Sci 7: 1-10. doi: 10.1673/031.007.0501.
 17. Martinelli S et al. (2006) Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. Journal of Economic Entomology 99: 519-526. doi: 10.1603/0022-0493-99.2.519.
 18. Sosa-Gómez DR (2004) Intraspecific variation and population structure of the Velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). Genet and Mol Biol 27: 378-384. doi: 10.1590/S1415-47572004000300012.
 19. Domingues FA et al. (2012) Genetic structure and gene flow among brazilian populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). J Econ Entomol 105: 2136-2146. doi: 10.1603/EC12123.
 20. Albernaz KC et al. (2012) Genetic variability and demographic history of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Brazil inferred by mtDNA sequences. Bull Entomol Res 102: 333-343. doi: 10.1017/S0007485311000678.
 21. Tay WT et al. (2013) A brave New World for an Old World pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. PLoS ONE 8:80134-80134. Available: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0080134>
 22. Pradeep Reddy M, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica 128: 9-17. doi: 10.1023/A:1020691618797.
 23. Luque C et al. (2002) ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepdoptera). Hereditas 136: 251-253. doi: 10.1034/j.1601-5223.2002.1360312x.
 24. Hundsdoerfer AK, Winka M (2005) New source of genetic polymorphisms in Lepidoptera? Z.Naturforsch 60: 618-624.
 25. Roux O et al. (2007) ISSR-PCR: Tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. Mol Phylogenet Evol 43: 240-250. doi: 10.1016/j.ympev.2006.09.017.

26. Zhu X et al. (2012) Genetic diversity of different geographical populations of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from China based on ISSR analysis. *Acta Entomol Sin* 55: 981-987.
27. Souza GA et al. (2008) Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. *Pesq Agropec Bras* 43: 843-849. doi: 10.1590/S0100-204x2008000700008.
28. Mendki MJ et al. (2011) Population genetic structure of *Culex quinquefasciatus* in India by ISSR marker. *Asian Pac J Trop Med* 4: 357-362. doi: 10.1016/S1995-7645(11)60103-X.
29. Shouhani H, Doiusti A, Radjabi R, Zarei M (2014) Application of ISSR to study the genetic diversity of honeybee (*Apis mellifera* L.) populations in some areas of Iran. *J Biosc Biotech* 3: 127-131.
30. Barbosa NCCP, Freitas S, Morales AC (2014) Distinct genetic structure in populations of *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera, Chrysopidae) shown by genetic markers ISSR and COI gene. *Rev Bras Entomol* 58: 203-211. doi: 10.1590/S0085-56262014000200012.
31. Angulo AO, Weigert TG (1975) Estados inmaduros de lepidópteros nóctuidos de importancia económica en Chile y claves para su determinación (Lepidoptera: Noctuidae). Concepción: Sociedad de Biología de Concepción. 153 p.
32. Eichlin TD (1975) A guide to the adult and larval Plusiinae of California (Lepdoptera: Noctuidae). California: California Department of Food and Agriculture. 73 p.
33. Eichlin TD, Cunningham HB (1978) The Plusiinae (Lepidoptera:Noctuidae) of America north of Mexico, emphasizing genitalic and larval morphology. Washington: United States Department of Agriculture. 122 p.
34. Arias RS et al. (2011) First microsatellites from *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and their potential use for population genetics. *Ann Entomol Soc Am* 104: 576-587. doi: 10.1603/AN10135.
35. Liu D, Trumble JT, Stouthamae R (2006) Genetic differentiation between eastern populations and recent introductions of potato psyllid (*Bactericera cockerelli*) into western North America. *Entomol Exp Appl* 118: 177-183. doi: 10.1111/j.1570-7458.2006.00383.x.
36. Peakall R, Smouse PE (2006) GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol* 6: 288-295. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
37. Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460.

38. Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
39. McDermott JM, McDonald BA (1993) Gene Flow in plant pathosystems. *Annu Rev Phytopathol* 31: 353-373. doi: 10.1146/annurev.py.31.090193.002033.
40. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
41. Evanno G, Regnauts S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol Ecol* 14: 2611-2620. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
42. Earl DA, vonHoldt BM (2012) Structure haverster: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4: 359-361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7.
43. Rosenberg NA (2004) Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 137-138. doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x.
44. Chen F et al. (2013) Genetic characterization of the Gypsy Moth from China (Lepidoptera, Lymantriidae) using Inter Simple Sequence Repeats markers. *PLoS ONE* 8:e73017. Available: <http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0073017&representation=PDF>
45. Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17. doi: 10.1023/A:1020691618797.
46. Jost DJ, Pitre HN (2002) Soybean Looper (Lepidoptera: Noctuidae) oviposition on cotton and soybean of different growth stages: influence of olfactory stimuli. *J Econ Entomol* 95: 286-293. doi: 10.1603/0022-0493-95.2.286.
47. Martin PB, Lingren PD, Greene GL (1976) Relative abundance and host preferences of Cabbage Looper, Soybean Looper, Tobacco Budworm, and Corn Earworm on crops grown in Northern Florida. *Environ Entomol* 5: 878-882.
48. Kogan M, Cope D (1974) Feeding and nutrition of insects associated with soybeans. 3. Food intake, utilization, and growth in the Soybean Looper, *Pseudoplusia includens*. *Ann Entomol Soc Am* 67: 66-72.
49. Burleigh JG (1972) Population dynamics and biotic controls of the Soybean Looper in Louisiana. *Environ Entomol* 1: 290-294.
50. Specht A, Silva EJE, Link D (2004) Owlet moth (Lepdoptera, Noctuidae) of Museu Entomológico Ceslau Biezanko, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. *Rev Bras Agric* 10: 389-409.

51. Wright SEWA (1949) The genetical structure of populations. *Ann Eugen* 15: 323-354.
52. Caprio M, Tabashnik BE (1992) Gene flow accelerates local adaptation among finite populations: simulating the evolution of insecticide resistance. *J Econ Entomol* 85: 611-620.
53. Mallet J (1989) The evolution of insecticide resistance: have the insects won? *Tree* 4: 336-340.

DISCUSSÃO FINAL

O presente estudo foi proposto diante da demanda por informações sobre variabilidade molecular e estruturação genética de lagartas da soja, principalmente *C. includens* que vem demonstrando dificuldade de controle. Com o cultivo recente no Brasil de variedades de soja Intacta, tais informações são importantes na busca de medidas de manejo para evitar a aquisição de resistência por parte das lagartas alvo.

Primeiramente, num trabalho de análise molecular é necessário a extração do DNA do inseto ser estudado, sendo que diversos protocolos são utilizados para a extração de DNA das mais diversas pragas agrícolas, utilizando diferentes reagentes (BLACK; DUTEAU, 1997; CHEUNG; HUBERT; LANDRY, 1993; SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). No presente estudo, foram avaliados três métodos de extração de DNA, baseados na lise celular por *Sarcosyl*, CTAB e SDS para duas espécies de lagartas da soja, *C. includens* e *S. eridania*. Os protocolos foram avaliados quanto à qualidade, quantidade do DNA e economia de tempo e custo para o processamento de cada amostra. Ainda, foi avaliada a performance do DNA na PCR, visando a utilização posterior com marcadores moleculares baseados na PCR.

O método 1 (*Sarcosyl*) gerou ao final da extração pellet claro, sem viscosidade, e gerou DNA que amplificou com os *primers* para o gene COI I, também apresentou menor custo e baixo tempo de preparo. Entretanto, o valor de pureza obtido pela razão A260/A280 foi inferior ao esperado, o que seria indicativo da presença de fatores inibidores da PCR, resultado semelhante para todos os métodos. A pureza é importante para se eliminar dúvidas caso o DNA não amplifique na PCR. Polissacarídeos, polifenóis e proteínas são componentes celulares que se permanecerem presentes ao final da extração do DNA tornam-se contaminantes, e podem inibir a PCR demonstrando um falso resultado negativo para ampliações (CHIARI; VALLE; RESENDE, 2009; DEMEKE; JENKINS, 2010; PANDEY; ADAMS; FLOURNOY, 1996; ROMANO; BRASILEIRO, 1999). Entretanto, a pureza e a confiabilidade do DNA extraído pode ser verificada por outros meios. O método 1 obteve pellet claro e sem viscosidade, fatores que indicam a ausência de polifenóis e polissacarídeos, respectivamente (CHIARI; VALLE; RESENDE, 2009; DEMEKE;

JENKINS, 2010; ROMANO; BRASILEIRO, 1999). Diferentemente, os métodos 2 e 3 apresentaram escurecimento do pellet e viscosidade. Ainda, o método 1 apresenta etapas na extração do DNA com clorofórmio e proteinase K, reagentes que ajudam a eliminar proteínas (HOY, 2003). E contaminantes na DNA extraído de amostras de *S. eridania* pelo método 3 interferiu na PCR, não amplificando o DNA com os *primers* para o gene COI I. Diante do melhor desempenho do método 1 para as variáveis observadas, este foi selecionado para a extração do DNA de todas as amostras de lagartas de *C. includens*.

O estudo de variabilidade molecular e estruturação genética é o primeiro realizado com a lagarta-falsa-medideira. Para esse trabalho foram utilizados sete marcadores moleculares ISSR aplicados em 30 populações da espécie coletadas na cultura da soja no Brasil. Os *primers* ISSR utilizados nos permitiram detectar alto nível de bandas polimórficas (100%). Outros estudos utilizando marcadores ISSR também obtiveram resultados parecidos, como para as espécies *Lymantria dispar*, *Ceratitis capitata* e *Plutella xylostela*, os níveis de polimorfismo foram 100%, 85% e 100%, respectivamente [13, 25, 44]. De maneira geral, todos estes trabalhos comprovam a eficiência dos marcadores ISSR em detectar a variabilidade genética nas populações estudadas.

Alguns resultados quando analisados conjuntamente indicam a conectividade ou troca de informação genética entre as diferentes populações estudadas. O fluxo gênico entre todas as populações, estimado por F_{ST} , foi alto (9.89). O teste Mantel detectou baixa correlação entre as distâncias genéticas e geográficas, demonstrando ausência de isolamento genético. E os métodos de estruturação genética de PCA e Structure dividiram todos os indivíduos em dois grupos maiores, com baixo nível de diferenciação, e sem correlacionar geograficamente com a origem de cada amostra. O alto número de migrantes entre populações de *C. includens* pode ser responsável pela baixa diferenciação observada. Embora não exista atualmente nenhuma informação disponível sobre a direção e taxa de migração de *C. includens* no Brasil, o padrão de cultivo associado a característica polífaga da espécie concorda com o hábito de migratório facultativo (MOSCARDI et al., 2012; TINGLE; MITCHEL, 1977). Além disso, na maior parte do EUA, *C. includes* é conhecida como migrante (HERZOG, 1980).

O alto nível de fluxo gênico de *C. includes* no Brasil também sugere o movimento da espécie entre plantas hospedeiras entre áreas cultivadas. A

semeadura do soja no Brasil é realizada inicialmente pelo estado de Mato Grosso e progride para outros estados do Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste seguindo o começo da estação chuvosa, na região Sul os primeiros plantios iniciam em função ao aumento da temperatura, e mais tardiamente que na região Centro-Oeste. Essas mudanças climáticas poderiam encorajar a migração de mariposas para novas áreas com soja, seguindo o fluxo diferencial de plantio, considerando que as mariposas tem preferência por ovipositar em folhas de soja (JOST; PITRE, 2002). As lagartas tem preferência alimentar por plantas de soja (MARTIN; LINGREN; GREENE, 1976), e larvas jovens preferem plantas jovens com folhas de baixo teor de fibras por apresentarem alta digestibilidade (KOGAN; COPE, 1974). Entretanto, estes resultados não podem determinar se a migração ocorre a cada estação climática e/ou o quanto as mariposas migram em cada estação. Embora estes resultados indiquem migração entre populações distantes, plantas de soja remanescentes e outros hospedeiros podem também funcionar como reserva ou fonte de populações da lagarta-falsa-medideira durante e após o inverno (SPECHT; SILVA; LINK, 2004). Neste contexto, espécies de pragas polífagas como *C. includens* podem mostrar também indivíduos residentes, uma vez que sítios para oviposição e fontes de comida estão disponíveis (DOMINGUES et al., 2012).

Os resultados do estudo também podem indicar a recente colonização de *C. includens* no Brasil. É fato que *C. includens* é capaz de migrar a longas distâncias como é reconhecido nos EUA pela ausência da espécie em alguns estados com a recolonização a cada ano (KOGAN; COPE, 1974), e a presença permanente da espécie na Florida onde pode sobreviver a médias de 16°C de temperatura (TINGLE; MITCHEL, 1977). Os estados da Florida e Texas, assim como Ilhas do Caribe, e Américas Central e do Sul são consideradas fontes de populações de *C. includens* para outros estados do EUA (HERZOG, 1980). Portanto, a origem de *C. includens* no Brasil pode ser Ilhas do Caribe ou América Central. Contudo, para investigar a origem das populações brasileiras de *C. includens*, novas análises incluindo amostras de diferentes países da América Central, do Norte, e Ilhas do Caribe seriam necessárias.

Neste estudo foi estimado que os níveis de fluxo gênico entre populações é alto. Valores maiores que nove migrantes por geração são suficientes para homogeneizar populações (WRIGHT, 1949). Embora a seleção natural tenda a adaptar as populações as condições ambientais locais, imigrantes vindos de outras

populações irão introduzir genes adaptados a outras condições e o resultado é a homogeneização das populações como um todo (SLATKIN, 1987). Populações homogêneas que sofrem pressão de inseticidas, como ocorre com as populações de *C. includens* estudadas aqui, podem desenvolver resistência a inseticidas sobre alto nível de fluxo gênico, quando a frequência inicial de alelos resistentes é baixa (CAPRIO; TABASHNIK, 1992). No Brasil, a resistência a inseticidas ainda não foi reportada, mas nos EUA altos níveis de resistência para piretróides são conhecidos desde 1990 (PORTILLO; PITRE, 1997). Entretanto, a cada ano é cada vez mais difícil o controle da lagarta-falsa-medideira no Brasil, em parte pelo uso indiscriminado de inseticidas. O uso de inseticidas que matam tanto pragas quanto inimigos naturais pode levar ao aumento da população da praga pela diminuição das populações de inimigos naturais. Este fato permite a evolução da resistência da praga (MALLET, 1989).

Este estudo apresenta o primeiro estudo molecular sobre populações de *C. includens*. Os resultados mostraram alto nível de fluxo gênico e baixa diferenciação genética entre diferentes populações, o que pode indicar recente colonização de *C. includens* no Brasil e/ou padrão de migração seguindo a dinâmica de hospedeiros. Além disso, a presença de dois grupos dentro de *C. includens* sugere que estudos sobre o efeito de inseticidas e o desenvolvimento de resistência precisam ser avaliados em ambos os grupos. E diferentes estratégias de manejo da praga precisam ser consideradas no sistema agrícola brasileiro.

CONCLUSÕES

- O método baseado na lise celular por *Sarcosyl* é o melhor na extração de DNA de *C. includens* e *S. eridania* entre os protocolos estudados.
- As populações de *C. includens* estudadas tem baixa variabilidade genética.
- As populações de *C. includens* demonstram estruturação genética fraca, e esta é formada por dois grupos principais.
- As populações de *C. includens* apresentam alta taxa de fluxo gênico.

Referências bibliográficas

- ABBOT, P. Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple Sequence Repeats (ISSRs). **Journal of Insect Science**, Oxford, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC355892/pdf/i1536-2442-001-08-0001.pdf> Acesso em: 28 May. 2011.
- ALBERNAZ, K. C. et al. Genetic variability and demographic history of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Brazil inferred by mtDNA sequences. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 102, n. 03, p. 333-343, 2012.
- ANGULO, A. O.; WEIGERT, T. G. **Estados imaduros de lepidópteros noctuidos de importancia económica en Chile y claves para su determinación (Lepidoptera: Noctuidae)**. Concepción: Sociedad de Biología de Concepción, 1975.
- ANTONINI, S. R. C.; MENEGHIN, S. P.; URASHIMA, A. S. **Técnicas básicas de biología molecular**. 2004. Disponível em: http://blog.cca.ufscar.br/lamam/files/2010/07/apostilacurso_molecular.pdf. Acesso em: 22 Aug.. 2011
- BARBOSA, N. C. C. P.; FREITAS, S.; MORALES, A. C. Distinct genetic structure in populations of *Chrysoperla externa* (Hagen) (Neuroptera, Chrysopidae) shown by genetic markers ISSR and COI gene. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 58, n. 2, p. 203-211, 2014.
- BARRIONUEVO, M. J. et al. Life table studies of *Rachiplusia nu* (Guenée) and *Chrysodeixis* (= *Pseudoplusia*) *includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) on artificial diet. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 95, n. 4, p. 944-951, 2012.
- BERNARDI, O. et al. Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701 x MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, Sussex, v. 68, p. 1083-1091, 2012.
- BEROIZ, B. et al. Genetic structure of Spanish populations of *Ceratitis capitata* revealed by RAPD and ISSR markers: implications for resistance management. **Spanish Journal of Agricultural Research**, Madri, v. 10, n. 3, p. 815-825, June 2012.
- BLACK, W. C.; DUTEAU, N. M. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. In: CRAMPTON, J.M.; BEARD, C.B.; LOUIS, C. **The molecular biology of insect disease vectors: a methods manual**. London: Chapman & Hall, 1997. p. 361-373.
- BORNET, B.; BRANCHARD, M. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 19, n. 3, p. 209-215, Sept. 2001.
- BUENO, A. F. et al. Histórico e evolução do manejo integrado de pragas da soja no Brasil. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F.

Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 38-74.

BUENO, R. C. O. F. et al. Sem barreira. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, p. 12-15, 2007.

BUSATO, G. R. et al. Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, das culturas do milho e do arroz irrigado. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 525-529, 2002.

BUSATO, G. R. et al. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 709-716, 2004.

CAB INTERNATIONAL. **Crop Protection Compendium**. 2014. Disponível em: <http://www.cabicompendium.org/cpc/home.asp>. Acesso em: 21 Mar.. 2014

CAMPOS, O. R.; CAMPOS, A. R.; LARA, F. M. Ocorrência sazonal de insetos pragas e predadores entomófagos em duas variedades de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], na região de Ilha Solteira - SP. **Cultura Agrônômica**, Ilha Solteira, v. 6, n. 1, p. 1-11, 1997.

CAPRIO, M.; TABASHNIK, B. E. Gene flow accelerates local adaptation among finite populations: simulating the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, n. 3, p. 611-620, June 1992.

CHEN, D. H.; RONALD, P. C. A Rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 17, n. 1, p. 53-57, 1999.

CHEN, M. et al. Methodological comparison of DNA extraction from *Holcocerrus hippophaecolus* (Lepidoptera: Cossidae) for AFLP analysis. **Forestry Studies in China**, Beijing, v. 10, n. 3, p. 189-192, 2008.

CHEUNG, W. Y.; HUBERT, N.; LANDRY, B. S. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **Technical Tips**, v. 3, n. 497, p. 500-1993.

CHIARI, L.; VALLE, J. V. R.; RESENDE, R. M. S. Comparação de três métodos de extração de DNA genômico para análises moleculares em *Stylosanthes guianensis*. **Embrapa.Circular Técnica**, Campo Grande, n.36, 2009. Disponível em: <http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/ct/ct36/CT36.pdf>

CLARK, P. L. et al. Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in the Western Hemisphere. **Journal of Insect Science**, Oxford, v. 7, p. 1-10, 2007.

CONAB. **Levantamentos de safras**. Brasília, 2014. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=>. Acesso em: 30 Dec.. 2014

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K. C. **Manejo avançado**. Pelotas, 1 Mar. 2014. Disponível em: Cultivar Grandes Culturas. Acesso em:

CZEPAK, C. et al. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 1, p. 110-113, 2013.

DEMEKE, T.; JENKINS, R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, n. 396, p. 1977-1990, 2010.

DIDONET, J. et al. Flutuação populacional de pragas e seus inimigos naturais em soja no projeto rio formoso - Formoso do Araguaia - TO, Brasil. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 28, n. 1, p. 67-74, 1998.

DOMINGUES, F. A. et al. Genetic structure and gene flow among brazilian populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 105, n. 6, p. 2136-2146, 2012.

EICHLIN, T. D. **A guide to the adult and larval Plusiinae of California (Lepdoptera: Noctuidae)**. California: California Department of Food and Agriculture, 1975.

EICHLIN, T. D.; CUNNINGHAM, H. B. **The Plusiinae (Lepidoptera:Noctuidae) of America north of Mexico, emphasizing genitalic and larval morphology**. Washington: United States Department of Agriculture, 1978.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cernagem, 1998.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC-RP, 2002.

GAZZONI, D. L. Palmo a palmo contra a soja. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, v. 11, p. 12-13, 1999.

GUEDES, J. V. C. et al. *Helicoverpa armigera*: da invasão ao manejo na soja. **Plantio Direto**, Passo Fundo, n. 137/138, p. 24-35, 2013.

GUEDES, J. V. C. et al. Nova dinâmica. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, v. 139, p. 24-26, Dec.2010.

HERZOG, D. C. Sampling Soybean Looper on soybean. In: KOGAN, M.; HERZOG, D. **Sampling methods in soybean entomology**. New York: Springer New York, 1980. p. 141-168.

HOY, M. A. **Insect molecular genetics. An introduction to principles and applications**. 2. ed. San Diego, CA: Academic Press/Elsevier, 2003.

HUNDSDOERFERA, A. K.; WINKA, M. New source of genetic polymorphisms in Lepidoptera? **Z.Naturforsch**, v. 60, p. 618-624, 2005.

JOST, D. J.; PITRE, H. N. Soybean Looper (Lepidoptera: Noctuidae) oviposition on cotton and soybean of different growth stages: influence of olfactory stimuli. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 95, n. 2, p. 286-293, Apr.2002.

KOGAN, M.; COPE, D. Feeding and nutrition of insects associated with soybeans. 3. Food intake, utilization, and growth in the Soybean Looper, *Pseudoplusia includens*. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 67, n. 1, p. 66-72, Jan.1974.

LOPES, R. et al. Marcadores Moleculares Dominantes (Rapid e Aflp). **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n.29, 2002. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/marcadores.pdf>

LUQUE, C. et al. ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) as genetic markers in Noctuids (Lepdoptera). **Hereditas**, Lund, v. 136, p. 251-253, 2002.

MALLET, J. The evolution of insecticide resistance: have the insects won? **Tree**, v. 4, n. 11, p. 336-340, 1989.

MARSARO JÚNIOR, A. L. et al. Flutuação populacional de insetos-praga na cultura da soja no Estado de Roraima. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, Curitiba, v. 8, n. 1, p. 71-76, 2010.

MARTIN, P. B.; LINGREN, P. D.; GREENE, G. L. Relative abundance and host preferences of Cabbage Looper, Soybean Looper, Tobacco Budworm, and Corn Earworm on crops grown in Northern Florida. **Environmental Entomology**, College Park, v. 5, n. 5, p. 878-882, Oct.1976.

MARTINELLI, S. et al. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, n. 2, p. 519-526, Apr.2006.

MARTINELLI, S. et al. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 97, p. 225-231, 2007.

MARTINS, E. S. et al. Análise da variabilidade genética de uma população de *Anticarsia gemmatalis* (Lepdoptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares RAPD. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

MEAGHER, R. L. et al. Larval development of fall armyworm (Lepdoptera: Noctuidae) on diferent cover crop plants. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 87, n. 4, p. 454-460, 2004.

MENDKI, M. J. et al. Population genetic structure of *Culex quinquefasciatus* in India by ISSR marker. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Hainan, v. 4, n. 5, p. 357-362, May2011.

MORAES, J. R.; LOECK, A. E.; BELARMINO, L. C. Flutuação populacional de Pusiinae e *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepdoptera: Noctuidae) em soja no

Rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 51-56, 1991.

MOSCARDI, F. et al. Artrópodes que atacam as folhas de soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. **Soja. Manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 214-334.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L. Review of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) genetic complexity and migration. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 91, n. 4, p. 546-554, Dec.2008.

NAGOSHI, R. N. et al. Identification and comparison of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in Brazil, Texas, and Florida. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 100, n. 3, p. 394-402, 2007.

OLIVEIRA, M. C. S. et al. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

PANDEY, R. N.; ADAMS, R. P.; FLOURNOY, L. E. Inhibition of Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, Athens, v. 14, n. 1, p. 17-22, 1996.

PANIZZI, A. R.; BUENO, A. F.; SILVA, F. A. C. Insetos que atacam vagens e grãos. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. **Soja. Manejo integrado da soja e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 337-420.

PAPA, G.; CELOTO, F. J. **Lagartas na soja**. São Paulo, 6 Sept. 2007. Disponível em:

<http://www.ilhasolteira.com.br/colunas/index.php?acao=verartigo&idartigo=1189090532>. Acesso em: 16 May. 2011

PORTILLO, H. E.; PITRE, H. N. Pyrethroid resistance levels in two generations of Soybean Looper (Lepidoptera: Noctuidae) on soybean in Mississippi. **Journal of Agricultural Entomology**, Clemson, v. 14, n. 1, p. 9-15, 1997.

PRADEEP REDDY, M.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 128, p. 9-17, 2002.

PRADO, P. C. N.; CUNHA, H. F.; SILVA, A. L. Ocorrência dos principais insetos-praga da soja e seus inimigos naturais em Santa Helena de Goiás. **Anais da Escola de Agronomia e Veterinária**, Goiânia, v. 12, p. 31-44, 1982.

RAMPELOTTI, F. T. et al. Diversidade genética de *Tibraca limbativentris* Stål (Hemiptera: Pentatomidae) de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul, usando marcadores RAPD. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 37, n. 1, p. 20-29, 2008.

ROCHA, S. **Genética de populações**. 2013. Disponível em: <http://simbiotica.org/genpop.htm>. Acesso em: 19 Aug.. 2013

ROMANO, E.; BRASILEIRO, A. C. M. Extração de DNA de plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.2, 1999. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio09/extracao.pdf> Acesso em: 1 June. 2013.

ROUX, O. et al. ISSR-PCR: Tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 43, n. 1, p. 240-250, Apr.2007.

SALDAMANDO, C. I.; VÉLEZ-ARANGO, A. M. Host plant association and genetic differentiation of corn and rice strains of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in Colombia. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 6, p. 921-929, 2010.

SALMAN, A. K. D. **Conceitos básicos de genética de populações**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning. A laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANTOS, K.; MANEGUIM, A. M.; NEVES, P. M. O. J. Biologia de *Spodoptera eridania* (Cramer) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 903-910, 2005.

SANTOS, W. J., SANTOS, K. B., SANTOS, R. B. Ocorrência, descrição e hábitos de *Spodoptera* spp. em algodoeiro no Brasil. In: Congresso Brasileiro do Algodão, 2003, Goiânia. **Anais...**Campina Grande: Embrapa CNPA, 2003.On-line Disponível em: http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba4/index.html

SHOUHANI, H. et al. Application of ISSR to study the genetic diversity of honeybee (*Apis mellifera* L.) populations in some areas of Iran. **Journal of Bioscience and Biotechnology**, Plovdiv, v. 3, n. 2, p. 127-131, 2014.

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, New York, v. 236, n. 4803, p. 787-792, May1987.

SOSA-GÓMEZ, D. R. Intraspecific variation and population structure of the Velvetbean Caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 3, p. 378-384, 2004.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; OMOTO, C. Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; MOSCARDI, F. **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa, 2012. p. 673-723.

SOUZA, G. A. et al. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 7, p. 843-849, 2008.

SPECHT, A.; SILVA, E. J. E.; LINK, D. Owllet moth (Lepidoptera, Noctuidae) of Museu Entomológico Ceslau Biezanko, Departamento de Fitossanidade, Faculdade

de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 10, n. 4, p. 389-409, 2004.

SPECHT, A. et al. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. **Pesquisa Agropacuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 6, p. 689-692, 2013.

TAY, W. T. et al. A brave New World for an Old World pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **PLoS ONE**, n.11, 2013. Disponível em: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0080134>

TEMPLETON, A. R. **Genética de populações e teoria microevolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2011.

THOMAS, J. D. et al. Factors influencing pyrethroid resistance in a permethrin-selected strain of the Soybean Looper, *Pseudoplusia includens* (Walker). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 55, n. 1, p. 1-9, May1996.

TINGLE, F. C.; MITCHEL, E. R. Seasonal populations of armyworms and loopers at Hastings, Florida. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 60, n. 2, p. 115-122, 1977.

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

VIRLA, E. G. et al. Fall armyworm strains (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina, their associate host plants and response to different mortality factors in laboratory. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 91, n. 1, p. 63-69, 2008.

WRIGHT, S. E. W. A. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, London, v. 15, n. 1, p. 323-354, Jan.1949.

ZHU, X. et al. Genetic diversity of different geographical populations of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from China based on ISSR analysis. **Acta Entomologica Sinica**, Peking, v. 55, n. 8, p. 981-987, 2012.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, San Diego, v. 20, n. 2, p. 176-183, 1994.

Apêndice A – Valor dos reagentes de extração de DNA

Quadro 1 – Valor de cada reagente e custo por extração de DNA para cada protocolo testado no Artigo 1.

REAGENTES	QUANTIDADE (g/ml)	CUSTO/EXTRAÇÃO (R\$)			
		CUSTO (R\$)	SARCOSYL*	CTAB*	SDS*
<i>Sarcosyl</i>	100	120	0,036	0	0
CTAB	500	282	0	0,00564	0
SDS	500	45	0	0	0,00063
					0,00018654
Tris-Hcl	500	110	0,00319792	0,001332467	5
EDTA	500	42	0,001312416	0,00031248	0,00054684
NaCl	1000	15	0,00105225	0,000657656	4,60359E-05
Metabissulfito de Na	500	25	0,00011406	0	0
B-mercaptoetanol	250	143	1,144E-08	0,000000572	8,008E-07
Proteinase K	0,1	439	4,115625	5,4875	5,761875
Rnase	0,01	120	0,12	3,06	0,12
Clorofórmio	1000	25	0,0000264	0,000012	0,000024
Álcool isoamil	1000	28	0,000001232	0,00000056	0,00000112
Isopropanol	1000	18	0,0000108	0,0000072	0,0000144
Acetato de amônio	250	24	0,029968704	0	0
Etanol	1000	15	0,0000042	0,0000105	0,00000525
Total			4,307	8,555	5,883

* Reagente utilizados no protocolo baseado na lise celular por *Sarcosyl*, CTAB e SDS.

Apêndice B – Padrão de amplificação dos *primers* ISSRs

Padrão de amplificação dos *primers* ISSRs utilizados na caracterização molecular das amostras de *C. includens* para Alvorada/TO. Para tal foi utilizado o marcador de peso molecular MassRuler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific) como comparativo do peso molecular de cada banda.

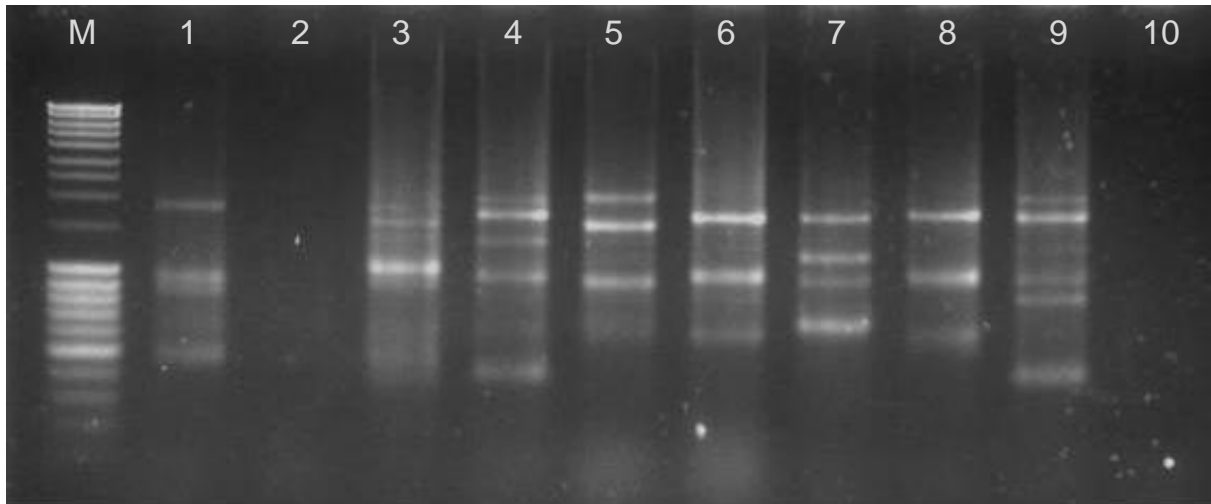


Figura 1. Padrão de amplificação do primer CI 01.

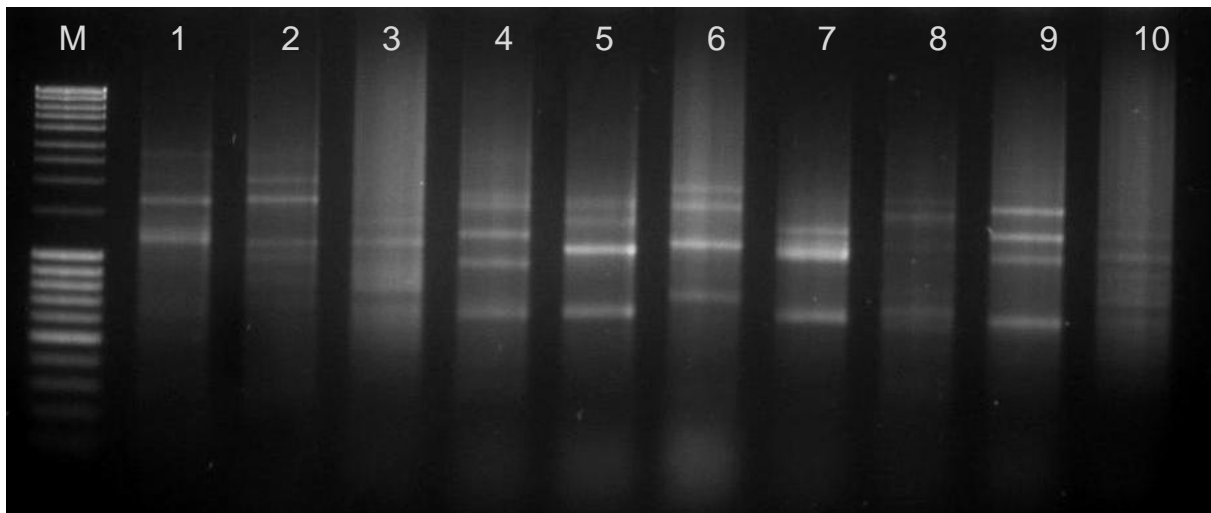


Figura 2. Padrão de amplificação do primer CI 02.

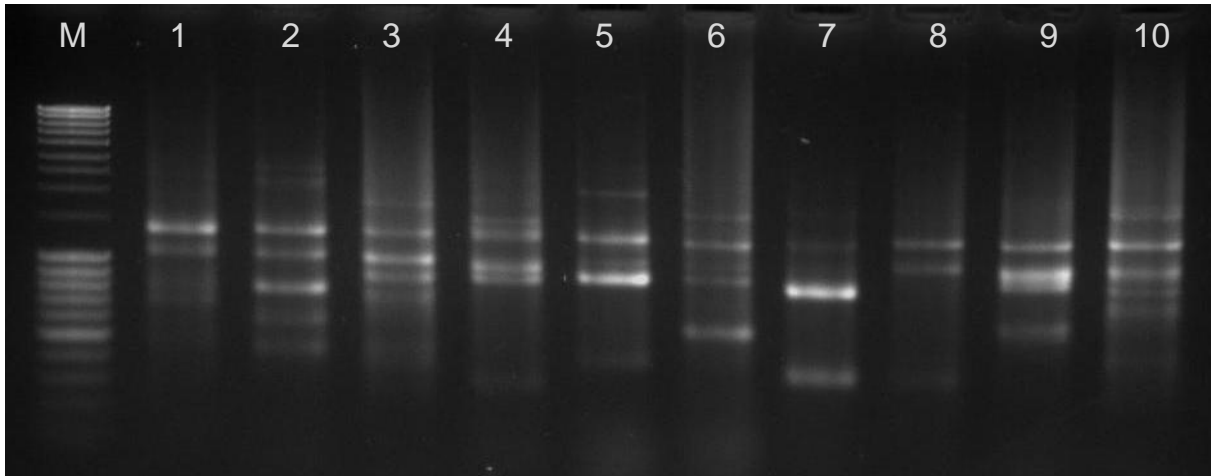


Figura 3. Padrão de amplificação do primer CI 03.

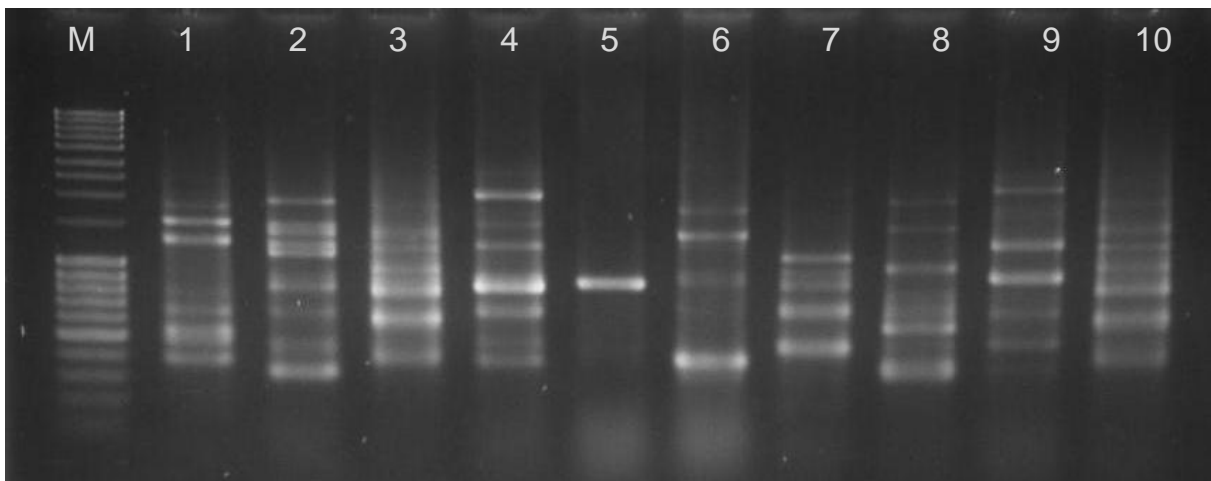


Figura 4. Padrão de amplificação do primer CI 04.

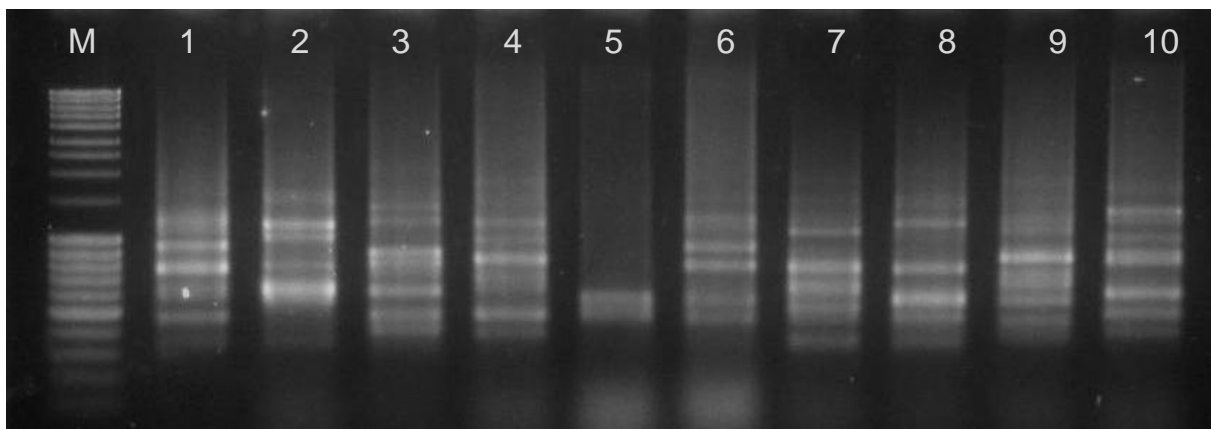


Figura 5. Padrão de amplificação do primer CI 05.

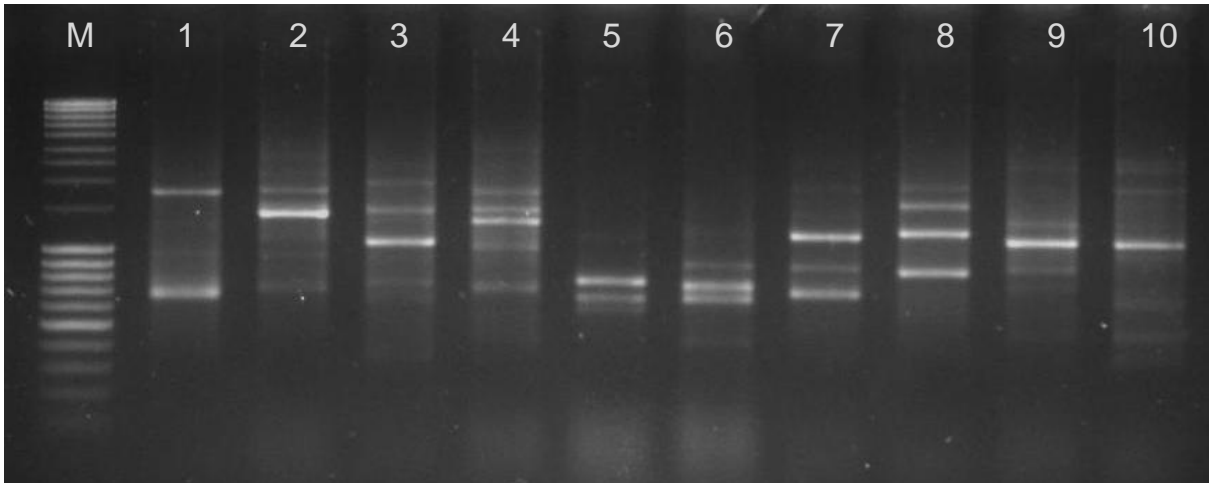


Figura 6. Padrão de amplificação do primer CI 06.

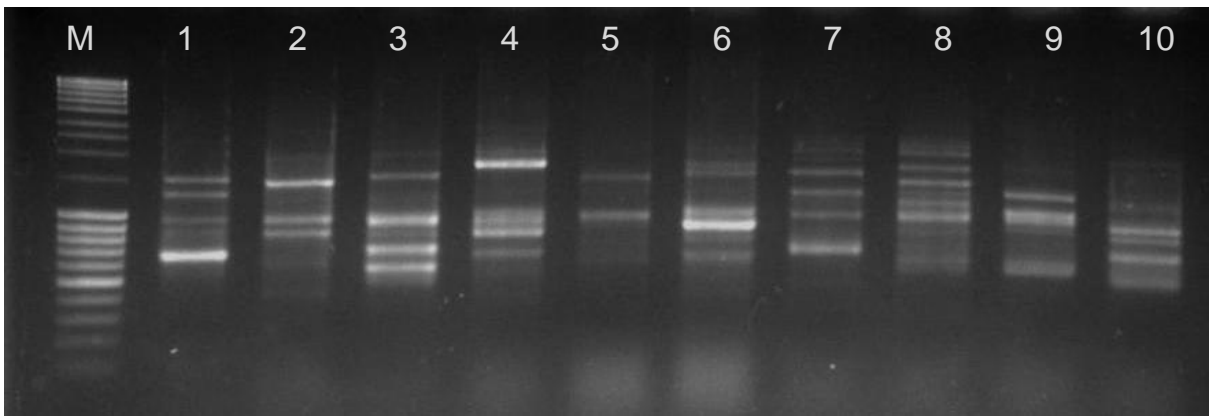


Figura 7. Padrão de amplificação dos primer CI 07.

Apêndice C – Matriz da distância genética de Nei por população

Quadro 2 – Matriz da distância genética de Nei por população.

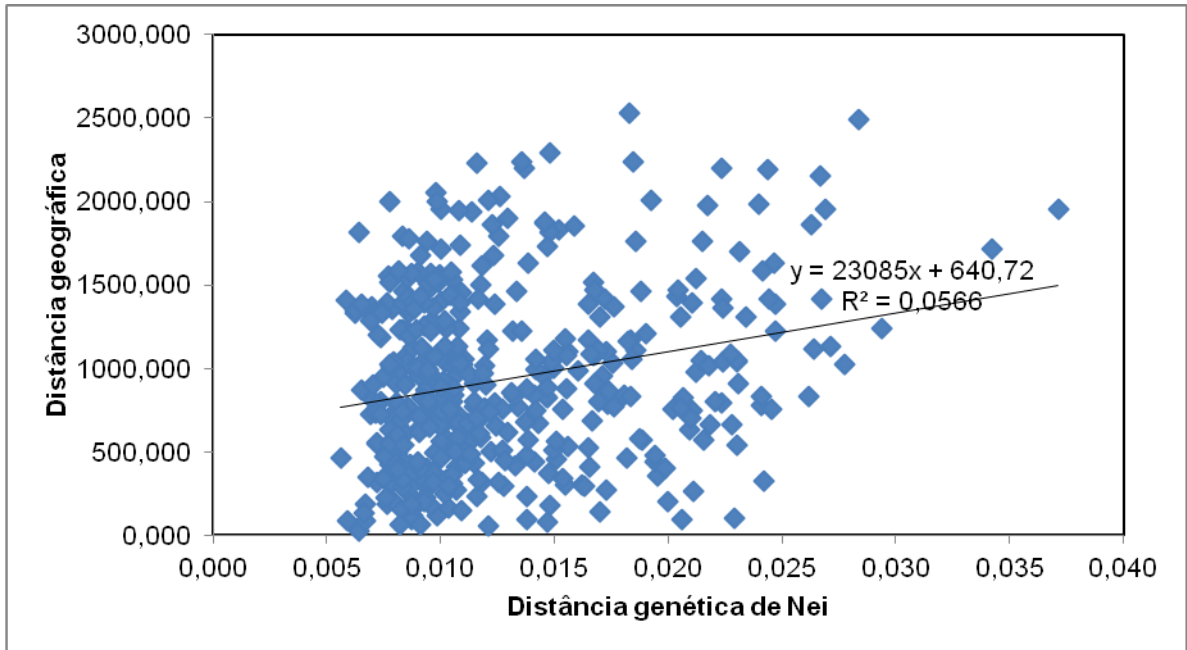
(continua)

GO 01	GO 03	GO 02	MS 02	GO 04	BA 02	TO 02	MG 02	BA 01	MT 02	MG 01	MT 03	PR01	PR 03	
0,000														GO 01
0,020	0,000													GO 03
0,016	0,010	0,000												GO 02
0,017	0,010	0,009	0,000											MS 02
0,018	0,009	0,010	0,009	0,000										GO 04
0,019	0,008	0,008	0,011	0,010	0,000									BA 02
0,019	0,012	0,009	0,011	0,009	0,011	0,000								TO 02
0,017	0,008	0,009	0,011	0,008	0,010	0,010	0,000							MG 02
0,017	0,008	0,008	0,010	0,008	0,007	0,009	0,008	0,000						BA 01
0,018	0,017	0,016	0,015	0,017	0,019	0,015	0,018	0,018	0,000					MT 02
0,014	0,012	0,010	0,011	0,011	0,011	0,012	0,012	0,009	0,015	0,000				MG 01
0,016	0,011	0,009	0,010	0,011	0,011	0,009	0,010	0,008	0,015	0,010	0,000			MT 03
0,018	0,010	0,008	0,011	0,010	0,012	0,010	0,010	0,009	0,015	0,011	0,010	0,000		PR 01
,017	0,007	0,008	0,011	0,008	0,011	0,010	0,008	0,008	0,015	0,011	0,010	0,009	0,000	PR 03
0,016	0,008	0,007	0,007	0,007	0,008	0,010	0,009	0,006	0,015	0,008	0,010	0,008	0,008	BA 03
0,017	0,010	0,009	0,011	0,009	0,009	0,011	0,009	0,007	0,019	0,012	0,011	0,011	0,011	MS 03
0,016	0,009	0,007	0,008	0,008	0,010	0,009	0,008	0,007	0,014	0,009	0,009	0,008	0,008	MS 01
0,016	0,009	0,007	0,011	0,008	0,008	0,009	0,009	0,006	0,015	0,009	0,009	0,008	0,008	MS 04
0,017	0,011	0,007	0,011	0,011	0,009	0,011	0,011	0,009	0,017	0,011	0,011	0,010	0,011	PR 02
0,015	0,008	0,007	0,008	0,007	0,009	0,008	0,009	0,007	0,013	0,008	0,008	0,008	0,006	PR 04
0,024	0,017	0,014	0,017	0,017	0,015	0,014	0,017	0,012	0,022	0,017	0,017	0,015	0,015	PI 01
0,019	0,010	0,009	0,011	0,010	0,008	0,010	0,009	0,008	0,018	0,011	0,011	0,010	0,009	BA 04
0,034	0,020	0,021	0,025	0,025	0,027	0,022	0,024	0,024	0,027	0,025	0,026	0,022	0,021	RS 04
0,019	0,013	0,010	0,010	0,012	0,014	0,012	0,014	0,013	0,017	0,012	0,012	0,012	0,011	RS 01
0,017	0,008	0,007	0,008	0,007	0,010	0,008	0,009	0,008	0,013	0,009	0,009	0,008	0,008	RS 03
0,019	0,012	0,010	0,011	0,009	0,013	0,011	0,011	0,011	0,018	0,012	0,012	0,011	0,009	RS 02
0,024	0,013	0,015	0,014	0,013	0,012	0,015	0,015	0,012	0,021	0,014	0,017	0,015	0,013	MG 03
0,018	0,013	0,010	0,012	0,012	0,014	0,009	0,013	0,012	0,015	0,010	0,011	0,008	0,008	MT 04
0,021	0,024	0,020	0,022	0,021	0,028	0,022	0,021	0,023	0,023	0,022	0,023	0,020	0,022	MT 01
0,020	0,008	0,009	0,009	0,008	0,008	0,008	0,008	0,007	0,017	0,011	0,010	0,009	0,007	TO 01

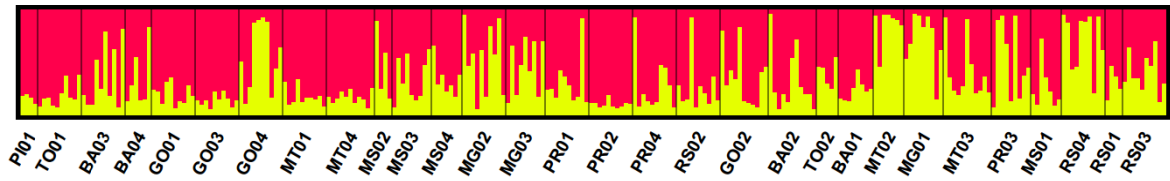
(conclusão)

BA 03	MS 03	MS 01	MS 04	PR 02	PR 04	PI 01	BA 04	RS 04	RS 01	RS 03	RS 02	MG 03	MT 04	MT 01	TO 01	
																GO 01
																GO 03
																GO 02
																MS 02
																GO 04
																BA 02
																TO 02
																MG 02
																BA 01
																MT 02
																MG 01
																MT 03
																PR 01
																PR 03
0,000																BA 03
0,010	0,000															MS 03
0,008	0,009	0,000														MS 01
0,006	0,007	0,008	0,000													MS 04
0,009	0,011	0,009	0,008	0,000												PR 02
0,006	0,009	0,007	0,007	0,009	0,000											PR 04
0,014	0,015	0,016	0,013	0,015	0,015	0,000										PI 01
0,009	0,010	0,009	0,008	0,010	0,008	0,013	0,000									BA 04
0,019	0,026	0,021	0,023	0,025	0,023	0,028	0,024	0,000								RS 04
0,010	0,014	0,012	0,011	0,011	0,010	0,018	0,014	0,021	0,000							RS 01
0,006	0,010	0,007	0,007	0,010	0,006	0,015	0,010	0,020	0,010	0,000						RS 03
0,009	0,011	0,010	0,010	0,013	0,009	0,018	0,011	0,021	0,010	0,009	0,000					RS 02
0,012	0,016	0,014	0,012	0,014	0,013	0,017	0,012	0,024	0,017	0,014	0,015	0,000				MG 03
0,009	0,015	0,010	0,011	0,012	0,008	0,018	0,012	0,021	0,011	0,009	0,010	0,014	0,000			MT 04
0,022	0,026	0,019	0,023	0,023	0,021	0,029	0,023	0,037	0,027	0,022	0,023	0,027	0,022	0,000		MT 01
0,008	0,009	0,007	0,007	0,010	0,007	0,013	0,008	0,022	0,012	0,009	0,010	0,012	0,010	0,021	0,000	TO 01

Apêndice D – Gráfico da relação genética com a geográfica



Apêndice E – Gráfico em barras representado o ΔK



Cada coluna representa um indivíduo. Cada cor representa um grupo formado.