

SILVIA AKIMI CAVAGUCHI YANO

**ANÁLISE DE RISCO PARA MANEJO DA RESISTÊNCIA A TOXINA CRY1AC  
E INSETICIDAS CONVENCIONAIS E ESTUDOS DE DIVERSIDADE  
GENÉTICA DE *Anticarsia gemmatalis* HÜBNER E *Pseudoplusia includens*  
(WALKER) (Lepidoptera: Noctuidae) NO BRASIL**

Tese apresentada como requisito para  
obtenção de “Doutor em Ciências” no  
Programa de Pós-graduação em Ciências  
Biológicas. Área de concentração em  
Entomologia, da Universidade Federal do  
Paraná.

Orientador: Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez

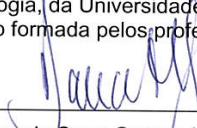
Curitiba- PR

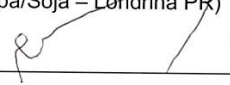
2012

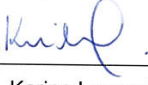
SILVIA AKIMI CAVAGUCHI


"Análise de risco para manejo de resistência a toxina Cry1Ac e inseticidas convencionais e estudos de diversidade genética de *Pseudoplusia includens* (Walker) e *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil"

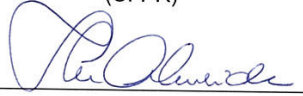
Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de "Doutor em Ciências", no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gomez (Orientador)  
(Embrapa/Soja – Londrina PR)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Celso Omoto  
(ESALQ/USP)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Karine Lucas da Silva Brandão  
(ESALQ/USP)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Mário Antonio Navarro da Silva  
(UFPR)

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Lúcia Massutti de Almeida  
(UFPR)

Curitiba, 27 de fevereiro de 2012.

A Deus, acima de tudo,  
pela saúde e disposição  
para superar todos os  
obstáculos

AGRADEÇO

A minha família e  
amigos pelo incentivo e  
confiança, fornecendo-  
me força para atingir  
meus objetivos,

DEDICO

Ao meu marido  
Gilberto Takeo Yano,  
fonte de todo amor e  
perseverança que existe  
em mim

OFEREÇO

## AGRADECIMENTOS

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

À Universidade Federal do Paraná (UFPR), pela oportunidade de realização do curso de Doutorado no Programa de Pós-graduação em Entomologia;

Ao Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gómez, pelo estímulo, orientação, amizade e confiança. Por transmitir grandes conhecimentos e ser exemplo de dedicação à pesquisa neste país;

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)- Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSO) por ter permitido a realização do trabalho de tese do Doutorado, juntamente com as atividades de pesquisa da Empresa;

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Entomologia Elis, Fábio, Ivanilda, Jairo, Jovenil, Neiva e Sérgio.

Aos amigos, estagiários e funcionários do Laboratório de Entomologia e Sementes, agradecimentos especiais para Agnes, Ariane, Antônio, Flávia, Matias, Gabriella, Mariana, Melchiades e Patrícia pela ajuda no trabalho de tese, pela amizade, convivência e companheirismo.

Aos funcionários da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)- Centro Nacional de Pesquisa de Soja (CNPSO) locados nos diferentes setores pela prestação de serviço e pela amizade;

Agradecimento especial a Fábio Eduardo Paro e José Jairo da Silva pela amizade, experiência e principalmente pela essencial colaboração no desenvolvimento do trabalho de tese.

À Dra. Aluana Gonçalves de Abreu, Dra. Karina Lucas da Silva-Brandão e a Dra. Maria Imaculada Zucchi pela contribuição na realização das análises genéticas;

Ao Dr. Samuel Martinelli pela colaboração no trabalho e por todo o apoio oferecido;

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Entomologia da UFPR;

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Entomologia da UFPR pela amizade e convívio durante minha temporada em Curitiba;

À família Hikishima pelo imenso carinho e acolhimento durante minha temporada em Curitiba.

Aos meus amigos pela força, apoio, companheirismo e amizade sincera. Sem citar nomes, mas com certeza cada amigo(a) saberá que jamais esquecerei de cada ligação, mensagem, e-mail, convite para sair, visita, confidência e oração, mesmo nos momentos mais difíceis vocês estiveram presentes;

Aos meus queridos afilhados e aos meus amiguinhos que me encheram de alegria e sempre renovaram minhas energias nos momentos difíceis;

Aos familiares pelo apoio e incentivo, em especial aos meus pais Sakuzo e Márcia, ao meu irmão Marcos e aos meus sogros Milton e Massako e também a todos os demais integrantes dessa família tão querida;

Enfim, a todos, que direta ou indiretamente, fizeram parte da minha vida neste período e colaboraram para o êxito deste trabalho, meu sincero agradecimento e estima.

## ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE QUADROS.....	xii

### CAPÍTULO 1

#### **Introdução geral e Revisão Bibliográfica**

1.1 Introdução .....	1
1.2 Aspectos bioecológicos de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	2
1.3 Aspectos bioecológicos de <i>Pseudoplusia includens</i> .....	6
1.4 Resistência a Inseticidas .....	8
1.5 Suscetibilidade à proteína Cry1Ac .....	11
1.6 Estudo de variabilidade genética e fluxo gênico.....	13
1.7 Referências Bibliográficas .....	14

### CAPÍTULO 2

#### **Suscetibilidade de *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) aos diferentes grupos de inseticidas nas regiões produtoras de soja.**

2.1 Introdução .....	24
2.2 Material e Métodos.....	26
2.2.1 Coleta e manutenção das populações de insetos .....	26
2.2.2 Inseticidas .....	27
2.2.3 Bioensaios .....	27
2.3 Resultados.....	28

2.4 Discussão .....	32
2.5 Conclusões .....	34
2.6 Referências Bibliográficas .....	34

### CAPÍTULO 3

#### **Suscetibilidade de *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac.**

3.1 Introdução .....	36
3.2 Material e Métodos.....	38
3.2.1 Coleta e manutenção das populações de insetos .....	38
3.2.2 Bioensaio.....	40
3.2.3 Linha-básica suscetibilidade de <i>A. gemmatalis</i> e <i>P. includens</i> à proteína Cry1Ac .....	40
3.2.4 Monitoramento da suscetibilidade de <i>P. includens</i> e <i>A. gemmatalis</i> à proteína Cry1Ac .....	41
3.3 Resultados.....	42
3.3.1 Linha-básica da suscetibilidade de <i>P. includens</i> e <i>A. gemmatalis</i> à proteína Cry1Ac .....	42
3.3.2 Monitoramento da suscetibilidade de <i>P. includens</i> e <i>A. gemmatalis</i> à proteína Cry1Ac .....	46
3.4 Discussão .....	48
3.5 Conclusões .....	50
3.6 Referências Bibliográficas .....	51

### CAPÍTULO 4

#### **Estudo da variabilidade genética das populações de *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) nas regiões produtoras de soja no Brasil**

4.1 Introdução .....	55
4.2. Material e Métodos.....	56

4.2.1 Espécimes .....	56
4.2.2 Extração do DNA .....	57
4.2.3 Quantificação do DNA .....	58
4.2.4 Amplificação e sequenciamento.....	59
4.2.5 Análise dos dados.....	60
4.3 Resultados.....	60
4.3.1 Variabilidade genética dos genes COI, COII e CytB para <i>Pseudoplusia includens</i> .....	60
4.4 Discussão .....	63
4.5 Conclusões .....	65
4.6 Referência Bibliográficas .....	65

## CAPÍTULO 5

### **Estudo da variabilidade genética das populações de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) nas regiões produtoras de soja no Brasil**

5.1 Introdução .....	69
5.2 Material e Métodos .....	70
5.2.1 Espécimes .....	70
5.2.2 Extração do DNA .....	71
5.2.3 Quantificação do DNA .....	72
5.2.4 Amplificação e sequenciamento.....	73
5.2.5 Análise de dados.....	74
5.3 Resultados.....	74
5.3.1 Variabilidade genética dos genes COI, COII e CytB para <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	74
5.4 Discussão .....	78
5.5 Conclusão.....	79
5.6 Referências Bibliográficas.....	80

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 2.1 Características comerciais dos produtos .....	27
Tabela 2.2 Resposta de concentração-mortalidade de quatro populações oriundas de campo de lagarta de final do segundo instar de <i>Pseudoplusia includens</i> e uma população suscetível de referência ao inseticida permetrina .....	29
Tabela 2.3 Resposta de concentração-mortalidade de quatro populações oriundas de campo de lagarta de final do segundo instar de <i>Pseudoplusia includens</i> e uma população suscetível de referência ao inseticida metomil .....	30
Tabela 2.4 Resposta de concentração-mortalidade de quatro populações oriundas de campo de lagarta de final do segundo instar de <i>Pseudoplusia includens</i> e uma população suscetível de referência ao inseticida metamidofós.....	31

### CAPÍTULO 3

Tabela 3.1 Nível de suscetibilidade (CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> ) à proteína Cry1Ac em subpopulações brasileira de lagartas neonatas de <i>Pseudoplusia includens</i> . Safras: 2008/09, 2009/10 e 2010/11 .....	43
Tabela 3.2 Nível de suscetibilidade (CL <sub>50</sub> e CL <sub>90</sub> ) à proteína Cry1Ac em populações de lagartas neonatas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> . Safras: 2008/09 e 2010/11 .....	44
Tabela 3.3 Resposta das populações de <i>Pseudoplusia includens</i> coletadas nas safras 2008/09, 2009/10 e 2010/11 à proteína Cry1Ac em relação à inibição do crescimento larval em bioensaio de incorporação da proteína em dieta artificial .....	45
Tabela 3.4 Monitoramento da suscetibilidade das lagartas neonatas de <i>Pseudoplusia includes</i> à proteína Cry1Ac incorporadas em dieta artificial. Safra soja: 2009/10 e 2010/11 .....	47
Tabela 3.5 Monitoramento da suscetibilidade das lagartas neonatas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> à proteína Cry1Ac incorporada em dieta artificial. Safra soja: 2010/11 .....	48

### CAPÍTULO 4

Tabela 4.1. Frequência dos diferentes haplótipos de <i>Pseudoplusia includens</i> determinados com o auxílio do programa Arlequin v. 3,5, nas regiões COI, COII e CytB .....	
--	--

Tabela 4. 2. Diversidade haplotípica e nucleotídica em *P. includens*, região COI, COII e CytB ..... 62

Tabela 4.3. Análise variância molecular de *P. includens*, regiões COI, COII e CytB ..... 62

## CAPÍTULO 5

Tabela 5.1. Frequência dos diferentes haplótipos de *Anticarsia gemmatalis* determinados com o auxílio do programa Arlequin v. 3,5, nas regiões COI, COII e CytB ..... 76

Tabela 5.2 Diversidade haplotípica e nucleotídica em *Anticarsia gemmatalis*, região COI, COII e CytB ..... 76

Tabela 5.3. Análise variância molecular de *Anticarsia gemmatalis*, região COI, COII e CytB ..... 77

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 4

Figura 4.1. Rede de haplótipos mostrando as inter-relações existentes entre os haplótipos de *Pseudoplusia includens* nas diferentes regiões produtoras de soja. a) gene COI, b) gene COII e c) gene CytB. ....61

Figura 4.2 Distribuição das frequências do número de diferenças nucleotídicas pareadas (*Mismatch distribution*) de COI + COII + CytB das amostras de *Pseudoplusia includens* coletadas em diferentes regiões brasileiras, na cultura da soja.....63

### CAPÍTULO 5

Figura 5.1 Rede de haplótipos mostrando as inter-relações existentes entre os haplótipos de *Anticarsia gemmatalis* nas diferentes regiões produtoras de soja. a) gene COI, b) gene COII e c) gene CytB ..... 75

Figura 5.2 Distribuição das frequências do número de diferenças nucleotídicas pareadas (*Mismatch distribution*) de COI + COII + CytB das amostras de *Anticarsia gemmatalis* coletadas em diferentes regiões brasileiras, na cultura da soja..... 77

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO 2

Quadro 2.1- Identificação das populações de *Pseudoplusia includens* amostradas em soja em diferentes regiões, municípios, coordenadas geográficas e datas de coleta. 27

### CAPÍTULO 3

Quadro 3.1- Identificação das populações de *Pseudoplusia includens* e *Anticarsia gemmatalis* amostradas em soja em diferentes safras agrícolas, regiões, municípios, coordenadas geográficas e datas de coleta. .... 39

### CAPÍTULO 4

Quadro 4.1 Identificação de amostras de *Pseudoplusia includens*, com localidade, coordenadas geográficas e data de coleta no campo na cultura da soja..... 57

Quadro 4.2. Iniciadores utilizados para o sequenciamento de espécimes de *Pseudoplusia includens* e seus respectivos programas de amplificação ..... 59

### CAPÍTULO 5

Quadro 5.1 Identificação de amostras de *Anticarsia gemmatalis*, com localidade, coordenadas geográficas e data de coleta no campo na cultura da soja ..... 71

Quadro 5.2. Iniciadores utilizados para o sequenciamento de espécimes de *Anticarsia gemmatalis* e seus respectivos programas de amplificação ..... 73

## Resumo

*Anticarsia gemmatalis* Hübner e *Pseudoplusia includens* (Walker) são importantes pragas da cultura da soja. A principal forma de controle dessas pragas é por meio de aplicações de inseticidas químicos e com a introdução da soja geneticamente modificada com o gene de *Bacillus thuringiensis*, tornam-se necessários os estudos de análise de risco para evitar a seleção de insetos resistentes e também a investigação da variabilidade genética destas pragas nas regiões produtoras de soja são fundamentais para a implementação de um manejo de resistência de insetos no Brasil. Assim, os objetivos desse trabalho foram: determinar as linhas discriminatórias de *P. includens* aos diferentes grupos de inseticidas, avaliar a suscetibilidade à proteína Cry1Ac em populações de *P. includens* coletadas nas principais regiões produtoras de soja no Brasil durante as safras agrícolas 2008/09, 2009/10 e 2010/11 e de *A. gemmatalis* nas safras 2008/09 e 2010/11 e verificar se há diferença na suscetibilidade das populações de lagartas provenientes de diferentes regiões geográficas e avaliar a variabilidade genética e fluxo gênico das populações de *A. gemmatalis* e *P. includens* utilizando sequências de DNA mitocondriais. Para determinar as linhas discriminatórias de suscetibilidade aos diferentes inseticidas, foram utilizadas lagartas de final de segundo instar e as diferentes concentrações de inseticidas foram aplicadas nas lagartas por meio da aplicação tópica na região dorsal torácica da lagarta. As linha-básicas de suscetibilidade à proteína Cry1Ac foram estabelecidas utilizando lagartas neonatas, por meio de bioensaios de incorporação das diferentes concentrações da proteína em dieta artificial. Para avaliar a variabilidade genética utilizou-se sequências de DNA mitocondriais das subunidades I da citocromo oxidase (COI) e citocromo B (CytB) de cinco regiões produtoras de soja para *A. gemmatalis* e *P. includens*. Nos estudos sobre linhas discriminatória de *P. includens*, observou uma variação da CL<sub>50</sub> de 0,034 a 0,08, 0,029 a 0,126 e 4,026 a 12,167 µg i.a./ml de água destilada, para o inseticida permetrina, metamidofós e metomil, respectivamente. O inseticida metomil apresentou o maior potencial de controle para *P. includens*. Nos estudos de linha-básicas de suscetibilidade de *A. gemmatalis* à proteína Cry1Ac apresentaram CL<sub>50</sub> de 0,03 a 0,09 µg Cry1Ac ml<sup>-1</sup> dieta, variação de 2,28 vezes. As CL<sub>50</sub> estimadas para as populações de *P. includens* variaram de 0,81 a 2,01 µg Cry1Ac ml<sup>-1</sup> dieta, uma variação de aproximadamente 2,45 vezes. A partir da análise conjunta dos dados de concentração-mortalidade de todas as

populações avaliadas, foram definidas e validadas as concentrações diagnósticas de 0,56 e 1,00  $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$  dieta e 5,60 e 18,00  $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$  dieta para o programa de monitoramento de resistência de *A. gemmatalis* e *P. includens* à proteína Cry1Ac no Brasil, respectivamente. No estudo da estrutura genética populacional de *A. gemmatalis* e *P. includens*, observou-se que há baixa variabilidade genética entre as populações estudadas e é alta a ocorrência de fluxo gênico entre as populações.

Palavras-chave: suscetibilidade, falsa-medideira, lagarta-da-soja, DNA mitocondrial.

## Abstract

*Anticarsia gemmatalis* Hübner and *Pseudoplusia includens* (Walker) are important pests of soybean. The main form to control these pests is through application of chemical insecticides and the introduction of genetically modified soybeans with *Bacillus thuringiensis* gene, become necessary studies of risk analysis to avoid selection of resistant insects and also investigation of the genetic variability of these pests in soybean-producing regions are essential for the implementation of an insect resistance management in Brazil. The objectives of this study were to determine the lines discriminatory of *P. includens* to different groups of insecticides, to assess the susceptibility to Cry1Ac in populations of *P. includens* collected in the main soybean producing regions in Brazil during the agricultural years 2008/09, 2009/10 and 2010/11 and *A. gemmatalis* harvests in 2008/09 and 2010/11 and check if there are differences in susceptibility of populations of larvae from different geographic regions and assess the genetic variability and gene flow in populations of *A. gemmatalis* and *P. includens* using DNA sequences mitochondrial. In the studies about lines discriminatory of susceptibility, were used caterpillars of end of second instar and the different concentrations of insecticides were applied in the caterpillars through topical application on the dorsal thorax of the caterpillar. The line-basis of susceptibility to Cry1Ac protein were established using caterpillars neonate through bioassays of incorporation of different concentrations of protein in artificial diet. To evaluate the genetic variability, we used DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome B (CytB) of five soybean producing regions for *A. gemmatalis* and *P. includens*. Within results obtained on lines discriminatory of *P. includens* in different insecticides, observed a variation of LC<sub>50</sub> from 0.034 to 0.08, 0.029 to 0.126 and from 4.026 to 12.167 i.a/ml of distilled water, to permethrin, methamidophos and methomyl, respectively. The insecticide methomyl presented the highest potential for controlling *P. includens*. In study the line-basis susceptibility of *A. gemmatalis* LC<sub>50</sub> presented to the Cry1Ac protein from 0.03 to 0.09 µg.ml<sup>-1</sup> Cry1Ac diet, change of 2.28 fold. The LC<sub>50</sub> estimated for populations of *P. includens* ranged from 0.81 to 2.01 µg.ml<sup>-1</sup> Cry1Ac diet, a variation of approximately 2.45 fold. From the analysis of the concentration-mortality data for all populations were defined and validated diagnostic concentrations of 0.56 and 1.00 µg ml<sup>-1</sup> Cry1Ac diet and 5.60 and 18.00 µg.ml<sup>-1</sup> Cry1Ac diet program for monitoring resistance in *A. gemmatalis* and *P. includens* the Cry1Ac

protein in Brazil, respectively. In the study of population genetic structure of *A. gemmatalis* and *P. includens*, it was observed that there is low genetic variability among populations is high and the occurrence of gene flow between populations.

Keywords: susceptibility, soybean looper, velvetbean caterpillar, mitochondrial DNA.

## CAPÍTULO 1

### 1.1 Introdução Geral

A cultura da soja, *Glycine max* (Merril) (Fabaceae), é um dos produtos mais importantes para exportação no Brasil e tem como principais pragas desfolhadoras a lagarta-da-soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e a lagarta-falsa-medideira, *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). A lagarta-falsa-medideira era considerada praga secundária, pois seu controle era naturalmente feito por parasitóides e fungos entomopatogênicos (Sosa-Gómez et al., 2003). Entretanto, desde a safra de 2003/2004 têm se observado vários surtos nas diferentes regiões produtoras de soja (Braga et al., 2011).

O controle químico *P. includens* muitas vezes não é eficiente, principalmente pelo hábito dela permanecer na porção inferior da planta e a calda inseticida não atingi-la. Além disso, a crescente utilização de fungicidas para o controle de ferrugem asiática em soja, também contribuem para a redução da ação de fungos entomopatógenos importantes para o controle natural de *P. includens* (Sosa-Gómez, 2006).

O grande desafio nos programas de controle de pragas envolvendo o uso de compostos químicos é evitar a seleção de linhagens resistentes. Por isso é necessário o desenvolvimento de dados da linha básica de suscetibilidade ou linhas discriminatórias (Tabashnik et al., 1993) para avaliar a eficiência do controle químico ou ainda determinar a situação real da resposta das populações geográficas a um inseticida e definir se existe a necessidade de modificar as táticas de manejo.

O advento das culturas transformadas geneticamente com genes da bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*, alterou os paradigmas do Manejo Integrado de Pragas. A liberação de culturas geneticamente modificadas tornam necessários os estudos de análise de risco, envolvendo organismos alvos e não alvos. Entre os estudos de análise de risco, um dos aspectos mais importantes consiste na avaliação da suscetibilidade as toxinas Cry antes da liberação das culturas Bt no ambiente. Possibilitando assim, estudos posteriores da evolução das frequências alélicas dos genes de resistência à toxina. Esses estudos são realizados sobre populações geográficas da praga para ter um quadro amplo dos níveis de suscetibilidade. Assim, a caracterização precisa dessas populações geográficas através de estudos de variabilidade genética permitem inferir as taxas de fluxo gênico, as quais têm importância nos estudos de resistência (Sosa-Gómez et al. 2004). Por exemplo, espécies com fluxo gênico elevado apresentam menores probabilidades de seleção de populações resistentes (Guse et al. 2002).

Este trabalho teve como objetivo determinar a suscetibilidade natural de populações geográficas de *A. gemmatalis* e *P. includens* à proteína Cry1Ac de *B. thuringiensis*, estudar as linhas discriminatórias nas diferentes populações geográficas aos principais grupos de inseticidas utilizados para o controle de *P. includens* e estudar a variabilidade genética destas pragas nas regiões produtoras de soja do Brasil.

## **1.2 Aspectos bioecológicos de *Anticarsia gemmatalis***

*A. gemmatalis* é vulgarmente conhecida como “lagarta-da-soja” no Brasil (Panizzi et al., 1977). Devido à extensa área de cultivo de soja, essa praga possui grande importância econômica na agricultura brasileira. As lagartas dessa espécie podem

consumir até 100% das folhas das plantas (Gazzoni & Moscardi, 1998, Hoffmann-Campo et al., 2000). O primeiro relato de *A. gemmatalis* causando dano na soja foi ao sul da Carolina do Sul no final do verão e outono de 1925 e neste mesmo ano, esta praga também foi relatada como praga da soja na Flórida (Nickels, 1926).

É um inseto nativo das áreas tropicais e subtropicais e restritas ao continente Americano (Ford et al., 1975). Foi encontrado pela primeira vez na Flórida em 1903 (Hinds & Osterberger, 1931). Atualmente, é permanentemente encontrada nas Américas, como no Canadá (Gazzoni et al., 1988), na Costa do Golfo dos Estados Unidos (Nickels, 1926, Douglas, 1930, Hinds & Osterberger, 1931, Greene, 1976) e engloba também o México (Pacheco, 1970), Colômbia (Posada et al., 1970), Brasil (Ferreira, 1970) até o sul de Buenos Aires, na Argentina (Sosa-Gómez, 2004).

No Brasil, esta praga pode causar severos desfolhamentos na cultura, desde o Rio Grande do Sul até os estados da região Centro-Oeste (Panizzi et al., 1977; Panizzi, 1990; Gazzoni et al., 1998). Em geral, encontra-se em todas as regiões onde é cultivada a soja, principalmente no período de novembro até abril. Na região ao norte do Paraná podem ser encontradas a partir de novembro e a partir de dezembro no Rio Grande do Sul (Hoffman-Campo et al., 2000).

Embora a soja esteja no topo da preferência alimentar de *A. gemmatalis*, a fase imatura do inseto é generalista e pode se alimentar de outras espécies de vegetais, principalmente do grupo das leguminosas, totalizando 34 espécies e mais cinco espécies pertencentes às famílias Begoniaceae, Gramineae e Malvaceae (Herzog & Todd, 1980). No Brasil, estes hospedeiros preferenciais como soja, alfafa, caupi e amendoim, podem estar totalmente disponíveis em determinadas regiões, e podem servir como fontes sequenciais de alimento para o inseto. Quando estes hospedeiros não estão disponíveis

ou são nutricionalmente inadequados, plantas selvagens, incluindo ervas daninhas, podem servir como hospedeiros para multiplicação da espécie (Conti & Waddil, 1982)

De acordo com Mackenzie et al. (1985) a *A. gemmatalis* pode sobreviver em condições desfavoráveis como no inverno e ser ameaçada pela falta de plantas hospedeiras adequadas, durante o início e o fim da estação. No Brasil, a *A. gemmatalis* tem várias gerações por ano e parte da população sobrevive durante o inverno moderado em plantas hospedeiras alternativas. A disponibilidade de plantas hospedeiras adequadas durante o ano todo é um indicativo para aumentar a população desta praga na soja (Panizzi et al., 2004).

A mariposa apresenta envergadura de 30 a 38 mm. A coloração da asa na parte dorsal é bastante variável com distribuição de cores variando em padrões de cinza, marrom amarelado claro a marrom avermelhado escuro ou bege. Já na parte ventral não sofre tanta variação. Na região dorsal, uma linha escura estende-se nas duas asas dianteiras e ficam evidentes quando as asas são estendidas. As pontas das asas têm coloração marrom clara com uma linha de pontos claros próxima às margens (Watson, 1916).

Os ovos são depositados isoladamente na parte inferior das folhas, no caule, nos ramos e nos pecíolos com maior concentração nos terços médio e inferior das plantas. Os ovos apresentam coloração verde clara assim que depositados e, com o desenvolvimento do embrião, tornam-se acinzentados e, próximos à eclosão passam à coloração marrom escuro. O período embrionário é de aproximadamente, três dias e cada fêmea tem capacidade de colocar até 1000 ovos, sendo que cerca de 80% são depositados nos primeiros oito a dez dias de vida. A longevidade das fêmeas é de, aproximadamente, 20 dias (EMBRAPA, 2010).

Após a eclosão, as larvas recém-eclodidas se alimentam da casca dos ovos da quais eclodem. Em geral, a lagarta da soja é um inseto desfolhador que começa a se alimentar da epiderme inferior e do mesófilo da folha (Watson, 1916; Greene, 1973; Hoffman-Campo et al., 2000).

Até o segundo instar, as lagartas alimentam-se raspando o parênquima foliar (Hoffman-Campo et al., 2000). Somente a partir do terceiro instar é que a lagarta consegue perfurar e se alimentar da folha inteira, chegando a promover a completa desfolhação da planta, deixando apenas as veias intactas (Watson, 1916). Depois que a parte superior das folhas são consumidas, a folhagem do dossel médio e baixo passam a ser consumidas, podendo resultar num desfolhamento completo (Roberts & Guillebau, 1999). A lagarta também podem atacar caules, gemas e vagens (Bárbara, 2000). Em geral, as lagartas alimentam-se continuamente na fase larval, com exceção para o período onde ocorre a troca de instar. No quarto, quinto e sexto instar larval podem consumir a vegetação equivalente ao seu próprio peso, num período de 15 a 16 horas (Watson, 1916)

Até completar seu desenvolvimento, cada lagarta consome cerca de 90 cm<sup>2</sup> de folha (Leppla et al., 1977). Alguns autores indicam que o consumo médio até o sexto instar é entre 108 a 150 cm<sup>2</sup> (Gazzoni et al., 1988; Moscardi, 1986). Considera-se que cerca de 96% deste consumo ocorre entre 4º e o 6º ínstar (Hoffmann-Campo et al. 2000).

### 1.3 Aspectos bioecológicos de *Pseudoplusia includens*

*P. includens* é conhecida popularmente como falsa-medideira e tem explorado novos habitats com a introdução da soja em novas áreas. É a espécie mais abundante do grupo das Plusiinae que atacam a soja, na maior parte das Américas do Norte e do Sul e toda América Central (Herzog, 1980; Braga et al., 2011). Suas populações ocorrem ao mesmo tempo que as populações da lagarta-da-soja, *A. gemmatalis*. Entretanto, na maioria das regiões de sua ocorrência, *P. includens* era considerada como praga secundária, raramente causando dano econômico à soja (Herzog, 1980; Gazzoni, 1981; Moscardi, 1993; Moraes et al., 1991).

O uso intenso de fungicidas para o controle da ferrugem asiática podem ter contribuído para a redução de fungos que fazem o controle natural de *P. includens* provocando um aumento populacional dessa praga (Sosa-Gomez, 2006). Assim, nos últimos anos, *P. includens*, tem ocorrido em altas populações em algumas regiões do Brasil, demandando a aplicação de inseticidas químicos. No entanto, durante este período, relatos frequentes de diversos agricultores reportaram a ineficácia no controle de *P. includens* com a aplicação de inseticidas, em especial com piretróides e organofosforados.

Inicialmente *P. includens* foi observada atacando feijão, repolho, quiabo, batata-doce, fumo e tomate, sendo considerados os hospedeiros mais frequentes (Bottimer, 1926; Folsom, 1936; Wolcott, 1936). A falsa-medideira tem sido citada na literatura com ampla abrangência nas culturas de interesses agrícola, na floricultura e até mesmo em plantas não cultivadas tem sido correlacionadas como hospedeiras. A lista de hospedeiros contém membros de 28 famílias (Herzog, 1980).

*P. includens* é uma espécie desfolhadora que habitualmente alimenta-se da porção baixa aos dois terços do dossel da soja (Herzog, 1980). Lagartas jovens geralmente selecionam folhas com baixo conteúdo fibroso (Kogan & Cope, 1974), enquanto que, lagartas mais velhas são menos exigentes e alimentam-se de folhas mais maduras. Com o aumento da população de lagartas na parte mais baixa do dossel, migram para cima e consomem as folhas da parte superior do dossel (Herzog, 1980).

No primeiro e no segundo ínstar as lagartas não conseguem alimentar-se completamente da folha, raspando-a somente. Do terceiro ao sexto ínstar há um amplo consumo, causando um dano irregular na área das folhas, deixando as veias intactas. Provocam um severo dano nas folhas, deixando-as com aspecto rendilhado. A área da superfície de consumo foliar pela *P. includens* durante todo o seu período de desenvolvimento é de 82 a 207 cm<sup>2</sup> (Reid & Greene, 1973; Kogan & Cope, 1974).

Os adultos apresentam 35 mm de envergadura, com as asas anteriores de coloração escura, com dois pontos prateados na asa anterior e a asa posterior possui coloração marrom (Galo et al., 2002). Os ovos são depositados de forma isolada e são globulares. Antes da eclosão a coloração dos ovos muda da cor creme claro para marrom claro (Mitchel, 1967; Jackai, 1978). Na fase larval, dentro de cada ínstar, a lagarta sofre uma perceptível mudança na coloração, mudando de verde amarronzado claro, enquanto se alimenta, para verde limão translúcido quando está para mudar de ínstar. O tamanho do corpo torna-se proporcionalmente maior do que a cápsula cefálica no período de transição, indicando mudança de ínstar larval (Smilowitz, 1973).

A pupa possui um tegumento de cor amarelo pálido para verde claro no início, com irregular pigmentação dorsal até 48 horas antes da emergência. Com o passar dos dias tornam-se escuro. Neste período a região que correspondem aos olhos passam de

uma tonalidade escura para coloração verde clara. Doze horas antes da emergência, a cutícula do adulto e as estruturas estão formadas dentro da cutícula pupal (Shour & Sparks, 1981).

#### **1.4 Resistência a Inseticidas**

A evolução da resistência é uma consequência do controle inadequado de pragas, isto porque muitas das práticas de manejo tais como o controle químico, a resistência de plantas a insetos e os agentes de controle biológico são idealizadas e colocadas na prática com o objetivo de reduzir a população de uma praga mediante o aumento da mortalidade ou pela diminuição da fecundidade dos insetos. Deste modo, possíveis diferenças na sobrevivência e ou fecundidade entre os indivíduos de uma população, após a utilização de alguma destas práticas de manejo, podem resultar na seleção de insetos resistentes a táticas de controle (Via, 1990). Neste caso, a existência de suficiente variabilidade genética na população de insetos com relação a quaisquer características fisiológicas e/ou comportamentais que possibilitem os indivíduos vencerem as medidas de controle, implicam em um processo de seleção de pragas mais adaptadas e difíceis de serem controladas (Gould, 1991).

O grande desafio em programas de controle de pragas envolvendo o uso de compostos químicos é evitar a seleção de linhagens resistentes (Metcalf, 1980). Dentre os fatores mais comuns de desenvolvimento da resistência podem ser citados a aplicação frequente de inseticidas com modos de ação semelhantes, aplicações “preventivas” antes que as populações alcancem os níveis de dano econômico, o que pode ser agravado com isolamento geográfico (não introdução de alelos suscetíveis), e os componentes relativos à herança dessa resistência (Georghiou, 1983). Assim, a

estratégia inadequada compromete os princípios do manejo integrado de pragas, em vista da maior contaminação ambiental, destruição de inimigos naturais e elevação nos custos de controle de pragas. Desta forma, o manejo da resistência de pragas a produtos químicos se constitui num importante componente do MIP (Croft, 1990; Georghiou, 1983).

A resistência ocorre em uma população de campo, quando existem indivíduos resistentes em número suficiente para provocar dano econômico em uma determinada cultura em resposta a uma falha no controle de pragas (Fitt et al., 2006). O manejo da resistência tem como finalidade retardar ou reverter a evolução da resistência em pragas (Omer et al., 1993). O sucesso de qualquer programa de manejo da resistência está relacionado a meios rápidos e eficientes para detectar e monitorar a resistência em populações de pragas no campo (Bush et al 1993).

Os principais mecanismos de resistência a inseticidas são: aumento na taxa de metabolismo do inseticida pela atividade de esterases, oxidases de função mistas ou glutathiona-S-transferases, ou por uma alteração no sítio de ação do produto (MUTERO et al., 1994), diminuição da sensibilidade nervosa (Gunning et al., 1991) e redução na penetração cuticular (Ahmad, 1989, Gunning et al., 1991).

Por isso, para evitar a evolução da resistência, o monitoramento é essencial em programas de manejo de resistência de artrópodes a pesticidas (Staetz, 1985). Através do monitoramento é possível determinar em quais regiões ocorre o problema e quais são os ingredientes ativos responsáveis pelas falhas de controle, o que permitiria definir as estratégias de ação a serem adotadas futuramente.

Para iniciar um bom programa de manejo de resistência é necessário o desenvolvimento de dados da linha básica de suscetibilidade ou linhas discriminatórias (screening dose) que representam o primeiro passo para detectar mudanças na

suscetibilidade que podem resultar da exposição repetida e prolongada ao inseticida. As linhas discriminatórias são determinadas após a exposição das populações de campo aos inseticidas, neste caso, há a possibilidade da presença de indivíduos com alelos de resistência.

Nos casos em que a frequência de resistência ainda é baixa, o método da concentração diagnóstica pode ser mais eficiente, desde que haja uma metodologia de bioensaio definida e adequada para a praga a ser testada (Roush & Miller, 1986). De modo geral, os bioensaios devem ser realizados através de tratamento tópico ou tratamentos de efeito residual, nos quais se agrupam inseticidas de amplo espectro de ação, como fosforados, carbamatos e piretróides. No entanto, alguns dos novos inseticidas com ação promissora para lagartas em campos de soja agem por ingestão. Desta maneira, é importante monitorar o desenvolvimento da resistência utilizando técnicas de bioensaios, por meio de aplicações tópicas ou incorporação do produto na dieta (Mascarenhas & Boethel, 2000).

*P. includens* apresenta histórico de desenvolvimento de resistência a inseticidas químicos nos Estados Unidos (Felland et al., 1990; Thomas & Boethel, 1994; Mascarenhas e Boethel, 2000). Os primeiros casos de resistência a piretróides foram documentados após sete a oito anos de utilização, na Louisiana (Felland et al., 1990). Segundo a base de dados da Universidade de Michigan (<http://www.pesticideresistance.org/search/12/248/0/>) essa praga já se tornou resistente ao acefato, BHC, DDT, cipermetrina, deltametrina, permetrina, teflutrim, fenvalerato, metomil, paratiom metílico e tiodicarbe. Os níveis mais elevados de resistência constatados na literatura são para permetrina (TR = 41,6) e metomil (TR = 26,1) (Felland et al. 1990).

Inseticidas permanecem eficazes contra *A. gemmatalis*, no entanto, as infestações podem atingir níveis prejudiciais e causar perdas econômicas se inseticidas não forem aplicados imediatamente. Estratégias de controles alternativos, tais como inseticidas biológicos e inimigos naturais estão disponíveis, mas não são utilizados (Luttrell et al., 1998; Moscardi, 1999) e os esforços para desenvolver linhagens de soja com características agrônômicas desejáveis, por meio do melhoramento convencional não foram bem sucedidos (Boethel, 1999). Avanços na biotecnologia agrícola oferecem uma alternativa promissora aos inseticidas químicos para o controle de lepidópteros pragas na cultura da soja. A introdução das variedades transgênicas expressando genes *cry* de *Bacillus thuringiensis*, torna-se uma importante ferramenta para um manejo eficaz de pragas agrícolas.

### **1.5 Suscetibilidade à proteína Cry1Ac**

As plantas geneticamente modificadas são importante estratégia para o manejo integrado de pragas, pois as toxinas são expressas continuamente, controlando as pragas-alvo durante todos os estádios de desenvolvimento fenológicos das culturas; com isso, ocorre substancial redução no uso de inseticidas nas lavouras GM, bem como o favorecimento das populações de inimigos naturais presentes nos agrossistemas (Almeida et al., 2011).

O monitoramento para verificar as alterações nas frequências alélicas de insetos-alvo do controle é uma das fases mais importantes para a duração dessa tecnologia. Por meio do monitoramento é possível avaliar os resultados das estratégias do manejo para retardar o surgimento de insetos resistentes e garantir a eficiência das plantas Bt no controle de insetos-praga, mas também validar muito dos parâmetros biológicos estimados por modelos matemáticos (Almeida et al., 2011). O objetivo do

monitoramento é antecipar a detecção de tipos resistentes no campo, antes que ocorram surtos e o controle seja tardio e não seja possível fazer um manejo eficiente (Fengxia et al., 2003).

Para que seja iniciado um programa de monitoramento é necessário que seja feito um estudo sobre o nível de suscetibilidade antes da liberação da planta geneticamente modificada. Para isso é necessário o desenvolvimento de dados da linha básica de suscetibilidade para gerar dados que representam o primeiro passo para detectar mudanças na suscetibilidade que podem resultar da exposição repetida e prolongada a toxina Bt. Através dessas informações também é possível o desenvolvimento de bioensaios com doses diagnósticas que seriam mais eficientes na detecção de populações resistentes (Siegfried et al., 2000)

A seleção de populações de insetos resistentes em condições de laboratório demonstram que, quando existe suficiente variabilidade genética inicial, o inseto pode desenvolver resistência a produtos à base de Bt ou suas proteínas Cry. Em condições de laboratório, o primeiro caso de resistência foi com uma população de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) tratada com biopesticida à base de *B. thuringiensis* (Bernardi, et al., 2011). Gould et al. (1995) relataram que *H. virescens* coletadas do campo desenvolveram resistência de 500 vezes à proteína Cry1Ac após 19 gerações de seleção. Luttrell et al. (1999) relataram que após sete gerações de seleção, *H. zea* desenvolveram resistência de até 100 vezes à toxina Bt e Stone et al. (1989) documentaram a capacidade genética de *H. virescens* de adquirir resistência ao Bt. Burd et al. (2003) relataram que *H. zea* tem uma capacidade de desenvolver resistência de pelo menos 94 vezes as toxinas Bt.

Não há caso de resistência de *P. includens* a produtos a base de *B. thuringiensis* (Mascarenhas et al., 1998). Cultivares de soja Bt ainda não são comercializados, no

entanto, testes experimentais têm sido desenvolvidos. Uma variedade de soja contendo gene *cryIAc* (Jack-Bt) causava mortalidade total para *A. gemmatalis* e significativa redução sobrevivência larval para *P. includens* e *H. zea* em condições de laboratório (Stewart et al., 1996). A maioria dos cultivares de soja Bt testados, contendo o gene sintético *cryIAc*, causou mortalidade completa apenas em lagartas de *A. gemmatalis* (Miklos, et al., 2007; Homrich et al., 2008). Com o decorrer do tempo, foi possível desenvolver linhagens transgênicas de soja expressando o gene *cryIA* sintético, que ao avaliar a resistência contra várias pragas de lepidópteros em ensaios em campo apresentaram eficácia praticamente completa contra todas as pragas *A. gemmatalis* e *P. includens* (Macrae et al., 2005; Braga et al., 2011).

### **1.6 Estudo de variabilidade genética e fluxo gênico**

O DNA mitocondrial (mtDNA) possui tamanho relativamente pequeno, a alta taxa de mudança evolutiva e a herança maternal do mtDNA, o tornam adequado para a análise de populações e sobre a história e a evolução entre táxons estreitamente relacionados (Simon et al., 1991; Caterino et al., 2000).

As sequências de mtDNA têm sido usadas com bons resultados para estudos populacionais de vários grupos de Lepidoptera (Roe & Sperling, 2007), incluindo análises da estrutura de populações e fluxo gênico, biogeografia e relações filogenéticas (Awise et al., 1987; Lang et al., 1999). Uma das formas para analisar a variação do DNAmít é por meio do sequenciamento de DNA, este método é o mais utilizado nos estudos moleculares sistemáticos (Caterino et al., 2000).

Ainda nos fatores bioecológicos, os conhecimentos da estrutura genética e do fluxo gênico entre populações da praga têm sido reconhecidos como informações de

grande importância para o manejo integrado de pragas. No Brasil, pouco se sabe sobre a separação das populações geográficas de *P. includens* e *A. gemmatalis*. A soja é a principal cultura hospedeira, porém, outros hospedeiros alternativos estão disponíveis durante o ano todo e é possível que as populações de lagartas possam se manter nestes locais. Pode ocorrer também que parte da população permaneça no local e parte dela seja migratória. Ambas as espécies são migratórias, no entanto, não é possível saber se os genótipos estão distribuídos em uma região específica (Sosa-Gómez, 2004).

Este fator é importante no manejo de populações resistentes a inseticidas ou para plantas geneticamente modificadas, pois o conhecimento da estrutura genética e do fluxo gênico entre as populações de pragas têm sido reconhecidos como informações de grande importância para o manejo de resistência de insetos (Caprio & Tabashnik, 1992).

### 1.7 Referências bibliográficas

AHMAD, M. GLADWELL, R.T.; MCCAFFERY, A.R. Decreased nerve sensitivity is a mechanism of resistance in a pyrethroid resistant strain of *Heliothis armigera* from Thailand. **Pesticide Biochemistry and Physiology**.v. 35, p. 165-171, 1989.

ALMEIDA, G.D.; ANDRADE, G.S.; SOBREIRA, F.M.; VALICENTE, F.H. Plantas geneticamente modificadas no manejo integrado de pragas. In: BORÉM, A.; ALMEIDA, G.D. **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais**. Ed. Suprema, 2011,p. 73-94.

BARBARA, K.A. Velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). <http://creatures.ifas.ufl.edu>. EENY-151 (IN308). 1-5. 2000.

BERNARDI, O.; ALBERNAZ, K.C.; VALICENTE, F.H.; OMOTO, C. Resistência de insetos-praga a plantas geneticamente modificadas. In: BORÉM, A.; ALMEIDA, G.D. **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais**. Ed. Suprema, 2011, p. 179-204.

BOETHEL, D.J. Assesment of soybean germplasm for multiple insect resistance. In: CLEMENTE, S.I.; QUISENBERRY, S.S. **Global plant genetic resources for insect-resistant crops**. CRC, Boca Raton, Fl., 1999, p. 101-129.

BOTTIMER, L.J. Notes on some Lepidoptera from eastern Texas. **Journal Agricultural Research**. v. 39, p. 797-819, 1926.

BRAGA, P.V.; OLIVEIRA, W.S., MARTINELLI, S. SOSA-GÓMEZ, D.R.; OLIVEIRA, M. Estudo de Caso da Soja MON 87701 x MON 89788 (Bt/RR2). In: BORÉM, A.; ALMEIDA, G.D. **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais**. Ed. Suprema, 2011, p. 347-390.

BURD, A.D.; GOULD, F.; BRADLEY, J.R.; VAN DUYN, J.W.; MOAR, W.J. Estimated frequency of nonrecessive Bt resistance genes in bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) in eastern North Carolina. **Journal of Economic Entomology**, v. 96, p. 137-142, 2003.

BUSH, M.R.; ABDEL-AAL, Y.A.I.; SAITO, K.; ROCK, G.C. Azinphosmethyl resistance in the tufted apple bud moth (Lepidoptera: Tortricidae): reversion, diagnostic concentrations, associated esterases, and glutathione transferases. **Journal of Economic Entomology**, v. 86, p. 213-225, 1993.

CAPRIO, M.A.; TABASHNIK, B.E. Local adaptation and gene flow among finite populations simulation of evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 85, p. 611-620. 1992.

CATERINO MS, CHO S, SPERLING FAH. The current state of insect molecular systematic: a thriving tower of Babel. **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 1-54, 2000.

CONTI, L.; WADDILL, V. Development of velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) on several winter hosts. **Environmental Entomology**, v. 11 (5), p. 1112-1113, 1982.

CROFT, B.A. Developing a philosophy and program of pesticide resistance management. In: ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E (Ed). **Pesticide resistance in arthropods**. New York: Chapman and Hall, 11, 1990, p. 277-296.

- DENNEHY, T.J.; GRANETT, J. Monitoring dicofol resistant spider mites (Acari: Tetranychidae) in California cotton. **Journal of Economic Entomology**, v.77, p.1386-1392, 1984.
- DOUGLAS, W.A. The velvetbean caterpillar as a pest of soybeans in southern Louisiana and Texas. **Journal of Economic Entomology**. v. 23, p. 684- 690, 1930.
- EMBRAPA Soja. 2010. Tecnologia de produção da soja- Região Central do Brasil 2009 e 2010. 263pp. Disponível on line:  
<http://www.cnpso.embrapa.br/download/tecnol2009.pdf>
- FELLAND, C.M.; PITRE, H.N. ; LUTTRELL, R.G.; HAMER, J.L. Resistance to pyrethroid insecticides in soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) in Mississippi. **Journal of Economic Entomology**. v. 83 (1), p. 35-40, 1990.
- FENGXIA, M.; SHEN, J.; ZHOU, W.; CEN, H. Long-term selection for resistance to transgenic cotton expressing *Bacillus thuringiensis* toxin in *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, v. 60, p.167-172, 2003.
- FERREIRA, E. Pragas da soja no Rio Grande do Sul. **Simpósio Brasileiro de Soja**. 1: 1- 17. 1970.
- FOLSOM, J.W. Notes on little-known insects. **Journal of Economic Entomology**. v. 29, p. 282-285, 1936.
- FITT,G.P.; OMOTO, C.; MAIA, A.H.; WAQUIL, J.M.; CAPRIO, M.; OKECH, M.A.; IA, E.; HUAN, N.H.; ANDOW, D.A. Resistance risks of Bt cotton and their management in Brazil. IN: HILBECK, A. ANDOW, D.A e FONTES, E.M.G. (Eds.). **Environmental risk assessment of genetically modified organisms: Methodologies for assessing Bt cotton in Brazil**. Cambridge: CABI Publishing, 2006, p. 300-345.
- FORD, B.J.; STRAYER, J.R.; GOFREY, G.L. The literature of arthropods associated with soybean. IV. A briography of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepdoptera Noctuidae). **Natural History Survey**, v. 92, p. 15, 1975.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.;

VENDRAMIM, J.D.; MARCHINI, L.C.; SPOTTI LOPES, J.R.; OMOTO, C.

**Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ. 2002, 920 p.

GAZZONI, D.L. **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL. 1062p. 1981.

GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, E.B.; CORSO, I.C.; FERREIRA, B.S.C.; VILLAS BOAS, G.L.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A.R. **Manejo de pragas da soja**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo. (Circular Técnica). 1998, 44p.

GAZZONI, D.L., MOSCARDI, F. Effect of defoliation levels on recovery of leaf area, on yield and agronomic traits of soybeans. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 33, n. 4, p. 411-424, 1998.

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

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

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

GREENE, G.L. Biology and control of arthropods on soybeans. **Annual Report. Florida University. Agricultural Experimental Station**. p. 173-244, 1973.

GREENE, G.L. Pest management of the velvetbean caterpillar in a soybean ecosystem. Pp.. 602-610. In L.D. Hill, ed. World soybean research. **Proceedings World Soybean Research Conference**, Interstate Print., Danville, Illinois. 1073 p. 1976.

GUNNING, R.V.; EASTON, C.S.; BALFE, M.E.; FERRIS, I.G. Pyrethroid resistance mechanisms in Australian *Helicoverpa armigera*. **Pesticide Science**, v. 33, p. 473-490, 1991.

GUSE, C.A.; ONSTAD, D.W.; BUSCHMAN, L.P.; PORTER, L.; HIGGINS, R.A.; SLODEBECK, P.E.; CRONHOLM; G.B. ; PEAIRS, F.B. Modeling the development of resistance by stalk-boring lepidoptera (Crambidae) in areas with irrigated transgenic corn. **Environmental Entomology**, v. 31, p. 676-685, 2002.

HERZOG, D.C.; TODD, J.H. Sampling velvetbean carterpillar on soybean. p. 107-140. In M. Kogan; D.C. Herzog (eds.). **Sampling methods in soybean entomology**. New York, Springer-Verlag, 1980, 587p.

HINDS W.E.; OSTERBERGER, B.A. The soybean caterpillar in Louisiana. **Journal of Economic Entomology**. v. 24, p.1168-1173, 1931.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F. CÔRREA-FERREIRA, B.S.; OLIVEIRA, L.J.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; PANIZZI, A.R.; CORSO, I.C.; GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, E.B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja. (Circular Técnica/Embrapa Soja, n.30). 2000, 70p.

HOMRICH, M.S.; PASSAGLIA, L.M.P.; PEREIRA, J.F.; BERTAGNOLLI, P.F.; SALVADORI, J.R.; NICOLAU, M.; KALTCHUK-SANTOS, E.; ALVES, L.B.; BODANESE-ZANETINI, M.H. Agronomic performance, chromosomal stability and resistance to velvetbean caterpillar of transgenic soybean expressing *cryIAc* gene. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p.801-807, 2008.

JACKAI, L. E. N. Induction and host-selection behavior in the soybean looper *Pseudoplusia includens*, Walker (Lepidoptera: Plusiinae). 168 p. **Thesis (Doctor of Philosophy in Entomology) - University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana**. 1978.

KOGAN, M.; COPE, D. Feeding and nutrition of insects associated with soybeans. Food intake utilization, and growth in the soybean looper, *Pseudoplusia includens*. **Annals of the Entomological Society of America**. v. 67(1), p. 66- 72, 1974.

LEPPLA, N.C.; ASHLEY, T.R.; GUY, R.H.; BUTLER, G.D. Laboratory life history of the velvetbean caterpillar. **Annals of the Entomological Society of America**. v. 70 (2), p. 217-220, 1977.

LUTTRELL, R.G.; ALI, A.; YOUNG, S.Y.; KNIGHTEN, K. Relative activity of commercial formulation of *Bacillus thuringiensis* against selected noctuid larvae (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Entomological Science**, v. 33, p. 365-377, 1998.

LUTTRELL, R.G.; WAN, L.; KNIGHTEN, K. Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin proteins and

commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, p. 21-32, 1999.

MacKENZIE, R.A.; GREEN, P.E.; THORNTON, A.M.; CHUNG, Y.S.;  
MACKENZIE, A.R.; CYBINSKI, D.H.; GEORGE, T.D. Diseases of deer in south  
eastern Queensland. **Australian Veterinary Journal**. v. 62 (12), p. 424, 1985.

MACRAE, T.C.; BAUR, M.E.; BOETHEL, D.J.; FITZPATRICK, B.J.; GAO, A.G.;  
GAMUNDI, J.C.; HARRISON, L.A.; KABUYE, V.T.; MCPHERSON, R.M.;  
MIKLOS, J.A.; PARADISE, M.S.; TOEDEBUSCH, A.S.; VIEGAS, A. Laboratory and  
field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic  
*Bacillus thuringiensis cryIA* gene for control of Lepidoptera. **Journal of Economic  
Entomology**, v. 98, p. 577-587, 2005.

MASCARENHAS, R.N.; BOETHEL, D.J.; LEONARD, B.R.; BOYD, M.L.;  
CLEMENS, C.G. Resistance monitoring to *Bacillus thuringiensis* insecticides for  
soybean loopers (Lepidoptera: Noctuidae) collected from soybean and transgenic Bt-  
cotton. **Journal of Economic Entomology**, v. 91, p. 1044-1050, 1998.

MASCARENHAS, R. M.; D. J. BOETHEL. Development of diagnostic concentration  
for insecticide resistance monitoring in soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) larvae  
using an artificial diet overlay bioassay. **Journal of Economic Entomology**. v. 93, p.  
897-904, 2000.

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

MIKLOS, J.A.; ALIBHAI, M.F.; BLEDIG, S.A.; CONNOR-WARD, D.C.; GAO, A.;  
HOLMES, B.A.; KOLACZ, K.H.; KABUYE, V.T.; MACRAE, T.C.; PARADISE,  
M.A.; TOEDEBUSCH, A.S.; HARRISON, L.A. Characterization of soybean exhibiting  
high expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIA* transgene that confers a high  
degree of resistance to lepidopteran pests. **Crop Science**, v. 47, p. 148-157, 2007.

MITCHELL, E.R. Life history of *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera:  
Noctuidae). **Journal Georgia Entomological Society**. v. 2, p. 53-57, 1967.

MORAES, R.R.; LOECK, A.C.; BELARMINO, L.C. Inimigos naturais de

*Rachiplusia nu* (Guenée, 1852) e de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) (Lepidoptera: Noctuidae) em soja do rio Grande do Sul. **Pesquisa Agropecuária brasileira**, v. 26, p. 57-64, 1991.

MORITZ, C.T.; DOWLING, T.E.; BROWN, W.M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. **Annual Review Ecology, Evolution and Systematics**, v. 18, p. 269-292, 1987.

MOSCARDI, F. Utilização de vírus para o controle da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, p. 188-202. In S.B.Alves (ed.), **Controle microbiano de insetos**. São Paulo, Manole, 407p, 1986.

MOSCARDI, F. Soybean Integrated Pest Management In Brazil. **Plant Protection Bulletin**. v. 41 (2), p. 91-100, 1993.

MOSCARDI, F. Assesment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review Entomology**, v. 44, p. 257-259, 1999.

MUTERO, A.; PRALAVORIO, M.; BRIDE, J.M.; FOURNIER, D. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. **Proceedings of National Academy of Science**, v. 91, p. 5922- 5926, 1994.

NICKELS, C.B. An important outbreak of insects infesting soybeans in lower South Carolina. **Journal of Economic Entomology**, v. 14, p. 614- 618, 1926.

OMER, A.D.; JOHNSON, M.W.; TABASHNIK, B.E.; COSTA, H.S.; ULMAN, D.E. Sweetpotato whitefly resistance to insecticides in Hawaii: intra-island variation is related to insecticides use. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 67, p. 173-182, 1993.

PACHECO, F. Plagas del Valle del Yaqui. **Mexican Institut Nacional Investigated Agriculture**. CIANO.v. 53, p. 124, 1970.

PANIZZI, A. R., B. S. CORREA, R.B.; GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, E.B.; NEWMAN, G.G.; TURNIPSEED, S.G. Insetos da soja no Brasil. **Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina, (Boletim Técnico 1)**. 20 p. 1977.

PANIZZI, A.R. Manejo integrado de pragas da soja no Brasil. In: **Manejo integrado de pragas** (CROCOMO, W., ed.) UNESP, Botucatu, 1990, p. 293-321.

PANIZZI, A.R.; OLIVEIRA, L.J.; SILVA, J.J. Survivorship, larval development and pupal weight of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) feeding on potential leguminous host plants. **Neotropical Entomology** v. 33(5), p. 563-567, 2004.

POSADA, O.L.; POLANIZ, I.Z.; DE AREVALO, E.S.; SALDARRIAGA, A.; GARCIA ROSA, F.A.; CARDENAS, Y.R. Lista de insectos daninos y otras plagas en Colombia. **Programa Nacional de Entomologia**, v. 17, p. 202, 1970.

RETNAKARAN, A.; GRANETT, F.; ENNIS, T. Insect growth regulators. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L. I. (Ed) **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Oxford: Pergamon, 1985. Cap. 12, p.529-601.

REID, J.C.; GREENE, G.L. The soybean looper: pupal weight, development time, and consumption of soybean foliage. **Florida Entomologist**, v. 56, p. 203- 206, 1973.

ROBERTS, P.; GUILLEBEAU. Velvetbean caterpillar- *Anticarsia gemmatalis* Hübner. Georgia IPM- integrated pest management. <http://www.gaipm.org/top50/velvetbean.html>. 1999.

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

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

SHOUR, M.H.; SPARKS, T.C. Biology of the soybean looper, *Pseudoplusia includens*: Characterization of last-stage larvae. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 74 (6), p.531-535, 1981.

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

SMILOWITZ, Z. Electrophoretic patterns in hemolymph protein of cabbage looper during development of the parasitoid *Hyposoter exiguae*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 66, p. 93-99, 1973.

SOSA-GÓMEZ, D.R.; DELPIN, K.E.; MOSCARDI, F.; NOZAKI, M.H. The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootic and on populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 287-291, 2003.

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

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

SOSA-GÓMEZ, D.R. 2006. **Seletividade de agroquímicos para fungos entomopatogênicos**. Disponível em: <[http://cnpso.embrapa.br/download/artigos/seletiv\\_fung.pdf](http://cnpso.embrapa.br/download/artigos/seletiv_fung.pdf)>.

STAETZ, C.A. Susceptibility of *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae) to permethrin from across the cotton belt: a five-year study. **Journal of Economic Entomology**, v.78, p.505-510, 1985.

STEWART, C.N.; ADANG, M.J.; ALL, J.N.; BOERMA, H.R.; CARDINEAU, G. TUCKER, D.; PARROTT, W.A. Genetic transformation, recovery and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAc* gene. **Plant Physiology**, v. 112, p. 121-129, 1996.

STONE, T.B.; SIM, S.R.; MARRONE, P.G. Selection of tobacco budworm to a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* containing the  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 53, p. 228-234, 1989.

TABASHNIK, B.E.; FINSON, N.; CHILCUTT, C.F.; CUSHING, N.L.; JOHNSON, M.W. Increasing efficiency of bioassays : evaluating resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamond- back moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 86, p. 635-644, 1993.

THOMAS, J.D.; MINK, J.S.; BOETHEL, D.J.; WIER, A.T.; LEONARD, B.R..

Activity of two novel insecticides against permethrin-resistant *Pseudoplusia includens*.

**Pest Science**, v.40, p. 239-243, 1994.

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

VIA, S. Ecological genetics and host adaptation in herbivorous insects: the experimental study of evolution in natural and agricultural systems. **Annual Review of Entomology**, v. 35, p. 421-426, 1990.

WATSON, J.R. Life-history of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner. **Journal of Economic Entomology**, v. 9, p. 521-528, 1916.

WOLCOTT, G.N. Insectae Borinquenses. **Journal Agriculture University. Puerto Rico**. v. 20, p. 1-627, 1936.

WOLSTENHOLME, D.R. Animal mitochondrial DNA structure and evolution. **International Review of Cytology**, v. 141, p. 173-218, 1992.

## CAPÍTULO 2

### **Suscetibilidade de *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) aos diferentes grupos de inseticidas nas regiões produtoras de soja.**

#### **2.1 Introdução**

A lagarta-falsa-medideira, *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) que até o final da década de 90 era considerada praga secundária, porém, no Brasil, a espécie passou a ser encontrada com maior frequência a partir de 2003 e sua ocorrência tem sido mais abrangente, justificando o uso de inseticidas em maior extensão e intensidade (Braga et al., 2011).

Este fato é devido à crescente utilização de fungicidas para o controle da ferrugem asiática em soja, cuja ação desses produtos pode ter afetado fungos entomopatogênicos que controlavam naturalmente pragas como *P. includens* (Sosa-Gómez, 2006). Durante estes últimos anos, relatos frequentes de diversos agricultores reportaram a ineficácia no controle de *P. includens* com a aplicação de inseticidas, em especial com piretróides e organofosforados. Práticas indevidas, como o aumento das doses do produto acima das recomendações do rótulo, ou até mesmo misturas indevidas para uma obtenção de controle satisfatório, podem promover a evolução da resistência desta praga a inseticidas.

*P. includens* apresenta histórico de desenvolvimento de resistência a inseticidas químicos nos Estados Unidos (Felland et al., 1990; Mascarenhas & Boethel, 2000). Os primeiros casos de resistência a piretróides foram documentados após sete a oito anos

de utilização, em Louisiana (Felland et al., 1990). Segundo a base de dados da Universidade de Michigan (<http://www.pesticideresistance.org/search/12/248/0/>) essa praga já se tornou resistente ao acefato, BHC, DDT, cipermetrina, deltametrina, permetrina, teflutrim, fenvalerato, metomil, paratiom metílico e tiodicarbe. Os níveis mais elevados de resistência constatados na literatura são para permetrina (TR = 41,6) e metomil (TR = 26,1) (Felland et al., 1990).

O grande desafio nos programas de controle de pragas envolvendo o uso de compostos químicos é evitar a seleção de linhagens resistentes. Assim, o monitoramento é considerado essencial em programas de manejo de resistência de pragas a pesticidas. Através do monitoramento é possível verificar se as falhas de controle e na eficiência do controle químico são devidas a casos de resistência ou ainda determinar a situação real da resposta das populações geográficas a um inseticida e definir se existe a necessidade de modificar as táticas de manejo (Metcalf, 1980).

Para isso é necessário o desenvolvimento de dados da linha básica de suscetibilidade ou linhas discriminatórias (screening dose) que representam o primeiro passo para o desenvolvimento de um programa de monitoramento para detectar mudanças na suscetibilidade que podem resultar da exposição repetida e prolongada ao inseticida. As linhas discriminatórias são definidas após a exposição das populações de campo aos inseticidas, neste caso existe a possibilidade da presença de indivíduos com alelos de resistência (Tabashnik et al., 1993). Através dessas informações também é possível o desenvolvimento de bioensaios com doses diagnósticas que seriam mais eficientes na detecção de populações resistentes, pois possibilita a detecção precoce de casos de resistência (Siegfried et al., 2000; Cook et al., 2003)

Assim, este trabalho tem por objetivo determinar a suscetibilidade de *P. includens* aos diferentes grupos de inseticidas e verificar se há diferença na suscetibilidade das populações de lagartas provenientes de diferentes regiões geográficas.

## **2.2 Material e Métodos**

### **2.2.1 Coleta e manutenção das populações de insetos**

As populações de campo de *P. includens* foram coletadas em diferentes regiões produtoras de soja (Quadro 2.1). As coletas foram realizadas no início das infestações a campo, sendo que em cada local foram coletados aproximadamente 800 a 1000 lagartas, colocadas em gaiolas de madeira contendo folhas de soja e transportadas para o laboratório. O georeferenciamento foi realizado com um aparelho de GPS portátil (Garmin Etrex, Olathe, Kansas) contendo o sistema de datum WGS 84.

Os adultos obtidos a partir destas lagartas foram mantidos em gaiolas para oviposição. As lagartas foram criadas em dieta artificial, conforme protocolo de Hoffmann-Campo et al. (1985), a temperatura de  $26 \pm 2^\circ \text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  umidade e 14h de fotoperíodo. Também foi utilizada uma população suscetível (Susc) de laboratório, de referência. Os insetos da população Susc eram provenientes de Bela Vista do Paraíso no Paraná e foram mantidas em laboratório por pelo menos quinze gerações.

Estado	Localização	Latitude	Longitude	Data de coleta
MT	Rondonópolis (RonMT)	16° 28' 15"	54° 38' 15"	10/12/2008
BA	Luis Eduardo Magalhães (LemBA)	11° 37' 23.0"	45° 35' 66.1"	14/01/2009
GO	Santa Helena (ShGO)	17° 51' 17.0"	50° 51' 74.8"	26/01/2009
PR	Londrina (LonPR)	23° 14' 10.1"	51° 08' 43.5"	12/02/2009

Quadro 2.1 Identificação das populações de *Pseudopplusia includens* amostradas em soja em diferentes regiões, municípios, coordenadas geográficas e datas de coleta.

### 2.2.2 Inseticidas

Nos bioensaios foram estudados diferentes grupos inseticidas, piretróide (permetrina), carbamato (metomil) e organofosforado (metamidofós) (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Características comerciais dos produtos.

Nome técnico	Nome comercial	Grupo químico	Formulação	g. i.a. <sup>1</sup>	Fabricante
Permetrina	Talcord	Piretróide	Emulsão óleo em água	250	Basf S.A
Metomil	Lannate	Metilcarbamato de oxima	Concentrado solúvel	215	Du Pont do Brasil S.A.
Metamidofós	Stron	Organofosforado	Concentrado Solúvel	338	Nufarm S.A.

<sup>1</sup> Quantidade de ingrediente ativo (em g)/L do produto comercial

### 2.2.3 Bioensaios

Para a determinação da suscetibilidade foram testadas de sete a oito concentrações dos inseticidas, de maneira que proporcionaram mortalidade entre 5 e 99%. No bioensaio foi utilizada a técnica de aplicação tópica na região torácica dorsal

da lagarta. Com auxílio de uma micropipeta, foi inoculado um microlitro da concentração de inseticida por lagarta de final de segundo instar, utilizando pelo menos cinco repetições (25 lagartas/concentração). Cada repetição foi colocada cinco lagartas em copos plásticos descartáveis de 50 ml e dieta artificial. As concentrações dos produtos foram preparadas em água destilada com agente espalhante (Tween 80, Sigma Chemical Co.). Os copos foram mantidos em câmara climatizada regulada à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e fotofase de 14 horas.

A avaliação da mortalidade foi realizada 48 horas após aplicação de inseticida nas lagartas. Os dados de mortalidade de cada população testada foram submetidos à análise de Probit para estimativa de  $CL_{50}$  (LeOra Software, 1987). A razão da resistência (RR) de cada população de campo foi calculada dividindo-se a respectiva  $CL_{50}$  (ou  $CL_{90}$ ) pelo valor da  $CL_{50}$  da população suscetível (Silva et al., 2009).

### 2.3 Resultados

As  $CL_{50}$  estimadas de *P. includens* para a permetrina variaram entre 0,034 a 0,08  $\mu\text{g}$  i.a./lagarta (Tabela 2.2). Os valores das  $CL_{50}$  de permetrina para todas as localidades estudadas diferiram da  $CL_{50}$  da população Susc, não havendo sobreposição de seus intervalos de confiança (IC 95%).

A diferença entre as populações estudadas foi de 2,35 vezes. As populações LonPR e LemBA apresentaram sobreposição de seus intervalo de confiança, não diferindo estatisticamente entre si. As populações LonPR, LemBA e ShGO não apresentaram sobreposição do intervalo de confiança para a população RonMT. A população que apresentou a maior  $CL_{50}$  foi a população da LemBA, que comparada a população Susc apresentou uma diferença de oito vezes. Situação similar pode ser

observada com a população do LonPR, que comparada a população Susc apresentou uma diferença de sete vezes. As  $CL_{90}$  variaram de 0,393 a 0,842  $\mu\text{g i.a./lagarta}$ . Ao observar os valores da  $CL_{90}$  obtidos todas as populações estudadas não apresentaram sobreposição no intervalo de confiança em relação a população Susc.

**Tabela 2.2** Resposta de concentração-mortalidade de quatro populações oriundas de campo de lagarta de final do segundo ínstar de *Pseudoplusia includens* e uma população suscetível de referência ao inseticida permetrina.

População	n <sup>1</sup>	CL <sub>50</sub> / IC(95%)	RR <sup>4</sup> a CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub> / IC (95%)	RR <sup>4</sup> a CL <sub>90</sub>	CA <sup>2</sup> ± (EPM <sup>3</sup> )
Susc	450	0,010 (0,007-0,013)	-	0,059 (0,04-0,104)	-	1,69 ± 0,25
LonPR	756	0,07 (0,051-0,092)	7	0,842 (0,489- 2,148)	14,27	2,16 ± 0,16
ShGO	945	0,045 (0,037-0,054)	4,5	0,654 (0,452- 1,088)	11,08	2,01 ± 0,12
RonMT	864	0,034 (0,023-0,047)	3,4	0,393 (0,237-0,975)	6,66	2,22 ± 0,15
LemBA	1155	0,08 (0,051-0,113)	8	0,703 (0,367- 3,319)	11,91	2,47 ± 0,13

n<sup>1</sup>= número de insetos submetidos ao teste; <sup>2</sup>CA= coeficiente angular; <sup>3</sup>EPM= erro padrão da média; <sup>4</sup>RR= razão de resistência, obtida pela divisão do valor da CL de cada população pelo valor da CL de Susc, a  $CL_{50}$  ou  $CL_{90}$ .

Os valores de  $CL_{50}$  obtido nas diferentes populações para o inseticida metomil variaram de 0,029 a 0,126  $\mu\text{g i.a./lagarta}$ , representando uma diferença de 4,34 vezes (Tabela 2.3). Ao comparar a população Susc com as demais populações houve sobreposição do intervalo de confiança, não diferindo estatisticamente. As populações do RonMT e da LemBA apresentaram menor diferença nos valores da concentração-resposta em relação a população Susc, a diferença foi de 0,41 e 0,49 vezes, respectivamente.

Os valores da  $CL_{90}$  variaram de 4,026 a 12,167  $\mu\text{g i.a./lagarta}$ . A população de RonMT e ShGO apresentaram o menor e o maior valor da  $CL_{90}$ , respectivamente. Ao observar os valores dos intervalos de confianças da  $CL_{50}$  e da  $CL_{90}$ , todas as populações

estudadas apresentaram sobreposição de intervalo de confiança em relação a população Susc, não diferindo estatisticamente.

**Tabela 2.3** Resposta de concentração-mortalidade de quatro populações oriundas de campo de lagarta final do segundo ínstar de *Pseudoplusia includens* e uma população suscetível de referência ao inseticida metomil.

População	n <sup>1</sup>	CL <sub>50</sub> / IC (95%)	RR <sup>4</sup> a CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub> / IC (95%)	RR <sup>4</sup> a CL <sub>50</sub>	CA ± (EPM <sup>2</sup> )
Susc	450	0,071 (0,037-0,219)	-	0,565 (0,194-20,488)	-	1,424 ± 0,168
LonPR	603	0,126 (0,0318-0,254)	1,77	5,944 (1,405- 3662,72)	10,52	1,39 ± 0,14
RonMT	909	0,029 (0,004- 0,060)	0,41	4,026 (0,877- 1425,03)	7,12	1,09 ± 0,10
ShGO	103 5	0,077 (0,045-0,112)	1,08	12,167 (4,364- 78,465)	21,53	1,06 ± 0,09
LemBA	954	0,035 (0,005-0,077)	0,49	10,328 (1,934-2113,77)	18,26	0,93 ± 0,07

n<sup>1</sup>= número de insetos submetidos ao teste; <sup>2</sup>CA= coeficiente angular; <sup>3</sup>EPM= erro padrão da média; <sup>4</sup> RR= razão de resistência, obtida pela divisão do valor da CL de cada população pelo valor da CL de Susc, a CL<sub>50</sub> ou CL<sub>90</sub>.

Para o metamidofós, as CL<sub>50</sub> variaram de 1,425 a 14,593 µg i.a./lagarta. As diferenças nos valores das CL<sub>50</sub> entre as populações não foram estatisticamente significativas, a diferença entre as populações é de 10,24 vezes. A população da LemBA foi a que apresentou maior valor de CL<sub>50</sub> ao produto metamidofós com 14,593 µg i.a./lagarta e quando comparada à população Susc observou-se uma diferença de 65,73 vezes, seguido de RonMT 9,09 vezes, Goiás 8,25 vezes e LonPR 6,42 vezes (Tabela 2.4). A população Susc foi estatisticamente significativa em relação às populações de campo e não apresentou sobreposição nos valores do intervalo de confiança.

As CL<sub>90</sub> variaram de 33,68 a 66,50 µg i.a./lagarta. A diferença entre as populações para a CL<sub>90</sub> foi de apenas 1,97 vezes. Já entre as populações de campo e a

população Susc a razão da resistência variou de 52,31 até 103,26 vezes. A maior diferença foi observada na população LemBa.

**Tabela 2.4** Resposta de concentração-mortalidade de quatro populações oriundas de campo de lagarta de final de segundo ínstar de *Pseudoplusia includens* e uma população suscetível de referência ao inseticida metamidofós.

População	n <sup>1</sup>	CL <sub>50</sub> / IC (95%)	RR <sup>4</sup> a CL <sub>50</sub>	CL <sub>99</sub> / IC (95%)	RR <sup>4</sup> a CL <sub>90</sub>	CA ± (EPM <sup>2</sup> )
Susc	450	0,222 (0,186-0,257)	-	0,644 (0,535-0,829)	-	2,76 ± 0,287
LonPR	918	1,425 (1,115- 1,782)	6,42	33,686 (19,783- 73,716)	52,31	1,69 ± 0,10
RonMT	142 2	2,019 (1,670- 2,414)	9,09	42,871 (28,139- 75,539)	66,57	1,75 ± 0,08
ShGO	765	1,833 (1,431- 2,315)	8,26	47,159 (25,319- 124,72)	73,23	1,64 ± 0,12
LemBa	756	14,593 (1,028- 2,022)	65,73	66,502 (30,291- 238,18)	103,2 6	1,40 ± 0,10

n<sup>1</sup>= número de insetos submetidos ao teste; <sup>2</sup>CA= coeficiente angular; <sup>3</sup>EPM= erro padrão da média; <sup>4</sup> RR= razão de resistência, obtida pela divisão do valor da CL de cada população pelo valor da CL de Susc, a CL<sub>50</sub> ou CL<sub>90</sub>.

Foi estimada a CL<sub>99</sub>= 0,819 (95% IC 0,475- 1,945), 3,631 (95% IC 2,488- 5,878) e 63,695 (95% IC 21,900- 575,24) µg i.a./lagarta mediante a análise conjunta dos dados de concentração-mortalidade para todas as populações de *P. includens* aos produtos permetrina, metomil e metamidofós, respectivamente. Por meio da análise da CL<sub>99</sub> poderão ser definidas as concentrações diagnósticas para o monitoramento da suscetibilidade de *P. includens* aos inseticidas acima citados.

## 2.4 Discussão

Neste estudo revelaram-se variações dos níveis de suscetibilidade aos diferentes inseticidas e entre as populações. Esta variação pode estar relacionada ao modo como é feito o manejo de controle de pragas em cada região de coleta das lagartas.

Os valores de coeficiente angular obtidos pelas populações estudadas para o inseticida permetrina foram maiores que 2,0 (Tabela 2.4), o que indica maior homogeneidade genética nas populações estudadas quanto à resposta ao inseticida permetrina (Silva et al., 2009). Para os inseticidas metamidofós e metomil, todas as localidades apresentaram coeficiente angular de regressão linear menor que 2,0 (Tabela 2.2 e 2.3). Isso mostra uma resposta de uma população geneticamente heterogênea quanto à sua suscetibilidade ao inseticida (Robertson & Preisler, 1992). Os maiores extremos nas variações de suscetibilidade foram observados para o inseticida metamidofós, as diferenças de  $CL_{50}$  em relação a população Susc variaram de 6,48 até 65 vezes.

Ao analisar as populações estudadas, independente do inseticida utilizado, a população LemBa foi a que apresentou os maiores valores de concentração-resposta para os inseticidas. A região de Barreiras, na Bahia, é caracterizada pelo cultivo em larga escala de grandes culturas, tais como, algodão, soja, milho e feijão. Em regiões com grandes extensões de áreas agrícolas, como na região sul do Maranhão, faz o controle de *P. includens* por aplicação programada, por meio de um controle preventivo, pois os produtores procuram fazer o controle antes que a incidência da praga atinja o nível de ação (informação pessoal, Dirceu Kepler). As grandes variações de suscetibilidade para o produto metamidofós, provavelmente deve-se ao fato pela região ter sofrido forte pressão de seleção em relação a este produto, principalmente por ser um

inseticida com baixo custo de aplicação e por também ser utilizado no controle da população de percevejos marrons (Sosa-Gómez & Silva, 2010).

Os resultados obtidos mostram que os valores da concentração-respostas para o inseticida metamidofós foram maiores do que para metomil e permetrina. Levantamentos realizados durante a safra 2008/09 sobre o uso de produtos para o controle de lagartas da soja indicaram que o inseticida metamidofós corresponde a 35% do total de inseticidas utilizados, enquanto o uso dos inseticidas permetrina e metomil corresponde à aproximadamente 3% (Informação pessoal Marcelo Nishikawa).

A população do RonMT foi que apresentou baixos níveis de suscetibilidade em todos os produtos estudados e a coleta nesta região foi feita mais cedo. Possivelmente, nesta região tenha sofrido uma menor pressão de seleção pelos inseticidas e também pode estar relacionada com o manejo aplicado.

Considerando uma variabilidade natural entre populações, ao adotar um fator mínimo de resistência ( $RR \geq 5,00$ ) (Silva et al., 2009), observa-se que todas as populações testadas mostraram-se suscetíveis ao inseticida metomil e a permetrina. Para permetrina as populações LonPR e LemBa apresentaram uma variação acima de 5,0 e podem apresentar indícios de problemas de controle para a permetrina. Baseado nos resultados obtidos, para o controle de *P. includens*, o produto que poderia apresentar maior eficiência é o metomil para todas as regiões produtoras de soja estudadas.

## 2.5 Conclusões

Há variabilidade entre as populações de *P. includens* quanto à suscetibilidade aos inseticidas estudados;

O inseticida metamidofós apresentou a maior diferença na suscetibilidade em relação a população suscetível de laboratório;

Entre os inseticidas estudados, o metomil apresenta maior potencial de controle para *P. includens*.

## 2.6 Referências Bibliográficas

- BRAGA, P.V.; OLIVEIRA, W.S., MARTINELLI, S. SOSA-GÓMEZ, D.R.; OLIVEIRA, M. Estudo de Caso da Soja MON 87701 x MON 89788 (Bt/RR2). In: BORÉM, A.; ALMEIDA, G.D. **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais**. Ed. Suprema, 2011, p. 347-390.
- COOK, D.R.H.; TEMPLE, R.H. GABLE, S.; MICINSKI, S.; WALTMAN, W.F.; STEWART, A.M.; LEORNARD, B.R.; BAGWELL, R.D. Insecticide susceptibility of Louisiana bollworm and tobacco budworm populations. **Proceedings of the 2003 Beltwide Cotton Conferences.**, 6-10 January 2003, Nashville, TN.
- FELLAND, C.M.; PITRE, H.N.; LUTTRELL, R.G.; HAMER, J.L. Resistance to pyrethroid insecticides in soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) in Mississippi. **Journal of Economic Entomology**, v.83: 35-40, 1990.
- HOFFMANN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. **Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*)**, EMBRAPA/CNPSo, Documentos 1985, p. 10.
- LEORA SOFTWARE. **Polo-PC: A user's guide to probit or logit analysis**. Berkeley, CA, USA : LeOra Software, 22p. 1987.

MASCARENHAS, R. M.; BOETHEL, D. J. Development of diagnostic concentration for insecticide resistance monitoring in soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) larvae using an artificial diet overlay bioassay. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 897-904, 2000.

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

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

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

SILVA, L.D.; OMOTO, C.; BLEICHER, E.; DOURADO, P.M. Monitoramento da suscetibilidade a inseticidas em populações de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) no Brasil. **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 116-125, 2009.

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

SOSA-GÓMEZ, D.R. Intraspecific Variation and Population Structure of the Velvetbean Caterpillar *Anticarsia gemmatalis* Hübner 1818 (Insecta: lepidoptera: Noctuidae). **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n.3, p.378-384. 2004.

SOSA-GÓMEZ, D.R. 2006. Seletividade de agroquímicos para fungos entomopatogênicos. Disponível em:

<[http://cnpso.embrapa.br/download/artigos/seletiv\\_fung.pdf](http://cnpso.embrapa.br/download/artigos/seletiv_fung.pdf)>.

SOSA-GOMEZ, D. R.; SILVA, J.J. Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n.7, p. 767-769, 2010.

TABASHNIK, B.E.; FINSON, N.; CHILCUTT, C.F.; CUSHING, N.L.; JOHNSON, M.W. Increasing efficiency of bioassays : evaluating resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamond- back moth (Lepidoptera: Plutellidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 86, p. 635-644. 1993.

## CAPÍTULO 3

### **Suscetibilidade de *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) à proteína Cry1Ac.**

#### **3.1 Introdução**

O Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja. Na safra 2009/10, a cultura ocupou uma área de 23,6 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 68,7 milhões de toneladas (Embrapa, 2011).

Muitas pragas causam danos econômicos anualmente na cultura da soja. A lagarta-da-soja, *A. gemmatalis* tem ocorrência em diversos países da América Latina, onde é apontada como o principal inseto-praga na cultura da soja (Gallo et al., 2002). Outra lagarta de grande importância é a lagarta falsa-medideira, *P. includens*, que até o final da década de 90 era considerada praga secundária, porém, no Brasil, a espécie passou a ser encontrada com maior frequência a partir de 2003 em todas as áreas cultivadas com soja e tem-se observado que sua ocorrência pode ser simultânea ou mais tardia à lagarta *A. gemmatalis*.

Pesquisas no território brasileiro indicam que as áreas pulverizadas por inseticidas têm aumentado nos últimos dez anos devido a maior frequência de lagartas falsa-medideira, a alta população de percevejos e a ressurgência de ácaros tetraniquídeos (Sosa-Gómez & Silva, 2010; Roggia et al., 2008). Relatos frequentes de agricultores reportaram a ineficácia no controle de *P. includens* com a aplicação de inseticidas, em especial com piretróides e organofosforados. Nos Estados Unidos há

relatos de casos de resistência de *P. includens* a inseticida de amplo espectro, como os piretróides (Felland et al., 1990; Leonard et al., 1990).

A introdução da soja transgênica com o gene sintético da bactéria entomopatogênica, *Bacillus thuringiensis cryIAc* ao mercado brasileiro para a safra 2012/13, é uma alternativa interessante para diminuir as aplicações de inseticidas convencionais. Os principais benefícios da soja Bt são a redução de aplicações de inseticidas, o aumento de inimigos naturais e a diminuição da poluição ambiental. No entanto, a disponibilidade de toxina Bt em grandes áreas leva a uma principal preocupação, que é a seleção de insetos com genótipos resistentes a esta toxina (Gould, 1998). A presença do mesmo gene *cryIAc* no algodão Bt contribui em uma maior exposição de *P. includens* para a mesma toxina. Os principais alvos da tecnologia da soja Bt são as lagartas-da-soja e as falsas-medideira, ambas são amplamente distribuídas nos campos brasileiros de soja. Além disso, encontra-se campos de algodão com o mesmo sistema de produção na região Nordeste e Central do Brasil. Em casos em que há sobreposição de cultivos de planta Bt, o risco de evolução de resistência é elevado, uma vez que proteínas semelhantes estão sendo utilizadas em plantas com insetos-praga em comum. Nesse cenário, as estratégias de manejo de resistência apresentam maior importância, pois necessitam ser eficientes no retardamento da evolução de resistência (Bernardi et al., 2011).

Estudos de suscetibilidade de subpopulações de lagartas à toxina Cry1Ac são importantes para compreender se estas populações apresentam suscetibilidade diferencial à toxina e estabelecer doses diagnósticas para analisar as mudanças na frequência dos genótipos de resistência. Assim, este trabalho tem como objetivo estudar a suscetibilidade das populações de *P. includens* e *A. gemmatilis* de diferentes regiões

brasileiras à toxina Cry1Ac e definir as concentrações diagnósticas para ajudar no programa de manejo de resistência.

## **3.2 Material e Métodos**

### **3.2.1 Coleta e manutenção das populações de insetos**

As populações de campo de *P. includens* e *A. gemmatalis* foram coletadas em diferentes regiões produtoras de soja durante as safras 2008/09, 2009/10 e 2010/11 (Quadro 3.1). As coletas foram realizadas no início das infestações a campo, sendo que em cada local foram coletados aproximadamente de 800 a 1000 lagartas, colocadas em gaiolas de madeira contendo folhas de soja e transportadas para o laboratório. O georreferenciamento foi realizado com um aparelho de GPS portátil (Garmin Etrex, Olathe, Kansas), contendo o sistema de datum WGS 84. Os adultos obtidos a partir destas lagartas foram mantidos em gaiolas para oviposição.

As lagartas foram criadas em dieta artificial, conforme protocolo de Hoffmann-Campo et al. (1985), a temperatura de  $26 \pm 2^\circ \text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  umidade e 14h de fotoperíodo. Também foi utilizada uma população suscetível (Susc) de laboratório de referência. Os insetos da população Susc foram provenientes de Bela Vista do Paraíso no Paraná e estavam mantidas em laboratório por pelo menos quinze gerações.

Inseto	Safra	Estado	Localização/ Código	Latitude	Longitude	Coleta
<i>P. includens</i>	2008/09	MT	Rondonópolis (RonMT)	16° 28' 15"	54° 38' 15"	10/12/08
		BA	Luis Eduardo Magalhães (LemBA)	11° 37' 23.0"	45° 35' 66.1"	14/01/09
		GO	Santa Helena (ShGO)	17° 51' 17.0"	50° 51' 74.8"	26/01/09
		PR	Londrina (LonPR)	23° 14' 10.1"	51° 08' 43.5"	12/02/09
	2009/10	MT	Campo Verde (CvMT)	15° 24' 50.1"	55° 06' 54.8"	18/12/09
		BA	Luis Eduardo Magalhães (LemBA)	11° 28' 41.1"	45° 34' 99.7"	15/01/10
		GO	Santa Helena (ShGO)	17° 51' 17.0"	50° 51' 74.8"	22/01/10
		SP	Santa Cruz das Palmeiras (ScpSP)	21° 49' 04.8"	47° 16' 11.1"	11/01/10
		PR	Bela Vista do Paraíso (BvpPR)	23° 02' 019"	51° 10' 6.76"	21/01/10
	2010/11	GO	Rio Verde (RvGO)	17° 47' 27.1"	50° 57' 33.7"	16/01/11
		MT	Campo Verde (CvMT)	15° 38' 19,7"	55° 13' 36.11"	28/12/10
		PR	Cambé (CamPR)	21° 07' 52.0"	51° 23' 26.2"	29/12/10
		BA	Roda Velha (RvBA)	12° 48' 10.7"	46° 07' 49.52"	13/01/11
		RS	Selbach (SelRS)	28° 61' 52"	52° 95' 33"	15/02/11
	<i>A. gemmatalis</i>	2008/09	BA	Luis Eduardo Magalhães (LemBA)	11° 28' 41.1"	45° 34' 99.7"
MT			Campo Verde (CvMT)	15° 24' 50.1"	55° 06' 54.8"	20/12/08
PR			Bela Vista do Paraíso (BvpPR)	23° 02' 019"	51° 10' 6.76"	21/01/09
2010/11		GO	Rio Verde (RvGO)	17° 47' 27.1"	50° 57' 33.7"	15/12/10
		BA	Luis Eduardo Magalhães (LemBA)	11° 28' 41.1"	45° 34' 99.7"	16/12/10
		MT	Campos Novos do Parecis (CnpMT)	13° 47' 29.00"	57° 33' 22.00"	02/12/10
		RS	Cruz Alta (CaRS)	28° 38' 36.53"	53° 17' 18.38"	05/01/11

Quadro 3.1- Identificação das populações de *Pseudoplusia includens* e *Anticarsia gemmatalis* amostradas em soja em diferentes safras agrícolas, regiões, municípios, coordenadas geográficas e datas de coleta.

### 3.2.2 Bioensaio.

O produto formulado utilizado da proteína sintética de Cry1Ac foi a MVP II (*Pseudomonas* com Cry1Ac encapsulada da Dow Agrosiences, San Diego, EUA), contendo 11,14% de proteína Cry1Ac. O material foi mantido em freezer à temperatura de -20°C. As diferentes concentrações da proteína Cry1Ac utilizadas foram previamente diluídas em água destilada e colocadas em tubos plásticos graduados de 50 ml com tampa tipo Falcon. Em todos os tubos foram colocados 4 ml da proteína diluída (ou somente água destilada no tratamento controle) e adicionado 36 ml de dieta artificial até completar o volume final de 40 ml. A proteína foi incorporada na dieta por meio de um agitador do tipo Vortex e mantida em banho-maria na temperatura de  $56 \pm 1^\circ\text{C}$ . Aproximadamente 1 ml de dieta contendo as diferentes concentrações da proteína foi colocada em cada célula das bandejas de bioensaio com 128 células (BIO-BA-128, CD International Inc., Pitman, NJ), com auxílio de uma pipeta de repetição. Após a geleificação da dieta, uma lagarta neonata de 0-24 horas de idade foi inoculada em cada célula. As placas foram fechadas com lâminas plásticas auto-adesivas (BIO- CV-16, CD International Inc., Pitman, NJ) que permitiam as trocas gasosas com o ambiente externo e mantidas em câmara climatizada a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 14:10 (L:D) h.

### 3.2.3 Linha-básica suscetibilidade de *A. gemmatalis* e *P. includens* à proteína Cry1Ac

Para caracterização toxicológica foram testadas sete concentrações da proteína Cry1Ac. No tratamento controle a lagarta foi alimentada com dieta artificial (0 µg de Cry1Ac) com adição de apenas água destilada. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 4 a 8 repetições para cada concentração, representadas por um grupo de 16 lagartas, sendo testadas no mínimo 64 lagartas por concentração.

As lagartas foram mantidas na dieta por sete dias a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  e 14 h de fotoperíodo. A atividade da proteína Cry1Ac foi verificada mediante a avaliação de mortalidade e redução do peso das lagartas sobreviventes. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit para as estimativas das concentrações letais (CL) e respectivos intervalos de confiança (IC 95 %) por meio do programa estatístico POLO-PC (LeOra Software 1987). As lagartas sobreviventes foram pesadas e os dados referentes ao peso médio das lagartas foram submetidos à análise de regressão não-linear (Sims et al., 1996) para as estimativas das concentrações efetivas (CE), ou seja, a dose de Cry1Ac que impede o crescimento das lagartas em relação ao tratamento controle não exposto, a análise foi feita por meio do programa JMP versão 8.0.2 (SAS Institute, 2004). As CEs das populações cujo intervalo de confiança não foi determinado pelo programa estatística não foram inseridas na tabela.

### **3.2.4 Monitoramento da suscetibilidade de *P. includens* e *A. gemmatalis* à proteína Cry1Ac**

Com base nas linhas de regressão log-dose e na distribuição da mortalidade nas concentrações utilizadas, duas doses diagnósticas foram selecionadas conforme critério de Roush & Miller (1986).

O monitoramento da suscetibilidade de *P. includens* à proteína Cry1Ac foi realizado nas populações coletadas em campo na safra agrícola 2009/10 e 2010/11 e para *A. gemmatalis* na safra 2010/11 (Quadro 3.1). Bioensaios foram realizados usando as duas concentrações diagnósticas. Foram realizadas em média cinco repetições por concentração (cada repetição, com 112 lagartas/tratamento e 16 lagartas testemunha)

distribuídas em bandejas de bioensaio de 128 células (BIO-BA-128, CD International Inc., Pitman, NJ), totalizando 560 lagartas para cada concentração testada. A mortalidade foi observada após uma semana da inoculação da proteína.

Para determinar as concentrações diagnósticas de *P. includens* e *A. gemmatalis*, foi estimada a  $CL_{90}$  mediante a análise conjunta dos dados de concentração-mortalidade para todas as populações estudadas. Para *P. includens* a  $CL_{90}$  foi calculada utilizando os estudos realizados nas safras de 2009/10 e 2010/11 e para *A. gemmatalis* foram utilizados os dados da safra 2010/11. Foram definidas as concentrações diagnósticas que estavam dentro do intervalo de confiança e foram determinadas as doses de 5,60 e 18,00  $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$  dieta e 0,56 e 1,00  $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$  dieta (aproximadamente três vezes a  $CL_{90}$ ) para o monitoramento da suscetibilidade de *P. includens* e *A. gemmatalis*, respectivamente.

### **3.3 Resultados**

#### **3.3.1 Linha-básica da suscetibilidade de *P. includens* e *A. gemmatalis* à proteína Cry1Ac**

As  $CL_{50}$  estimadas para as populações de *P. includens* na safra 2008/09, 2009/10 e 2010/11 variaram de 0,82 a 1,12  $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$  dieta, 0,81 a 1,53  $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$  dieta, 0,99 a 2,01  $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$  dieta, respectivamente. A população ScpSP da safra 2009/10 foi a localidade que apresentou a menor  $CL_{50}$  com 0,81  $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$  dieta e a população CamPR foi a que apresentou a maior  $CL_{50}$  com 2,01  $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$  dieta, representando uma diferença de aproximadamente 2,45 vezes entre as populações avaliadas (Tabela 3.1). Ao comparar os valores de concentração-resposta das populações com a população suscetível de laboratório nas safras estudadas, a

variação da suscetibilidade foi menor que 1,5 vezes. Houve sobreposição dos IC das CL<sub>50</sub> das populações avaliadas, o que mostra que não houve diferença estatística quanto à suscetibilidade à proteína Cry1Ac.

Tabela 3.1 Nível de suscetibilidade (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) à proteína Cry1Ac em subpopulações brasileira de lagartas neonatas de *Pseudoplusia includens*. Safras: 2008/09, 2009/10 e 2010/11.

Safra	Localização	n <sup>1</sup>	CL <sub>50</sub> <sup>2</sup> /IC(95%)	CL <sub>90</sub> / IC (95%)	CA <sup>3</sup> ± (EP)	χ <sup>2</sup>	g.l. <sup>(4)</sup>
2008/09	Susc	640	1,34 (1,13-1,55)	3,74 (3,14-4,70)	2,88 ± 0,28	5,345	4
	LonPR	1152	1,12 (0,61 - 1,58)	14,86 (7,31- 89,59)	2,08 ± 0,19	12,290	4
	LemBA	1472	0,82 (0,47 - 1,12)	8,10 (4,66 - 27,73)	2,34 ± 0,19	13,543	4
	RonMT	1712	0,88 (0,47 - 1,23)	9,30 (5,29 - 32,58)	2,27 ± 0,18	13,420	4
2009/10	ShGO	768	1,39 (0,57 – 1,92)	9,78 (5,19- 108,97)	2,75 ± 0,31	15,245	4
	BvpPR	1008	1,24 (0,95- 1,53)	13,20 (8,73- 25,01)	2,27 ± 0,16	7,778	5
	ScpSP	1728	0,81 (0,65- 0,96)	9,92 (6,91-16,68)	4,23 ± 0,26	4,989	4
	CvMT	1232	1,53 (0,92-2,08)	21,02 (11,33-79,54)	2,05 ± 0,19	13,672	5
2010/11	CamPR	1152	2,01 (1,65 – 2,37)	14,32 (10,99 – 20,64)	1,93 ± 0,18	4,44	5
	RvGO	1152	1,62 (1,18 – 2,02)	7,08 (5,29 – 11,46)	2,57 ± 0,24	7,56	5
	RvBA	1152	0,99 (0,53 – 1,41)	5,48 (3,64 – 12,59)	2,22 ± 0,22	8,80	4
	CvMT	1280	1,64 (0,65 – 2,38)	8,17 (4,82 – 55,44)	2,36 ± 0,25	16,48	4
	SeIRS	1024	1,53 (1,31 – 1,73)	5,97 (4,95 – 7,65)	2,78 ± 0,25	1,80	4

<sup>1</sup>n= número insetos testados; <sup>2</sup>Concentração letal (CL) e Intervalo confiança (IC) expresso em µg de Cry1Ac ml<sup>-1</sup> dieta; <sup>3</sup>CA= coeficiente angular e EP= erro padrão, <sup>4</sup> g.l.= graus de liberdade.

As  $CL_{50}$  estimadas para *A. gemmatalis* na safra de 2008/09 variaram de 0,03 a 0,09  $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$  dieta e na safra 2010/11 variaram de 0,04 a 0,05  $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$  dieta. Ao comparar os valores da  $CL_{50}$  das populações com a população suscetível, apresentaram uma diferença de 2,28 vezes, enquanto que, entre as populações de campo a variação foi de 1,80 vezes na safra 2008/09 e de 1,25 na safra 2010/11 (Tabela 3.2). A população proveniente de Bela Vista do Paraíso, BvpPr foi a que apresentou o maior valor da  $CL_{50}$ , no entanto, não houve sobreposição do intervalo de confiança entre a população BvpPR e a população suscetível, diferindo estaticamente.

Tabela 3.2 Nível de suscetibilidade ( $CL_{50}$  e  $CL_{90}$ ) à proteína Cry1Ac em populações de lagartas neonatas de *Anticarsia gemmatalis*. Safras: 2008/09 e 2010/11.

Safra	Localização	n <sup>1</sup>	$CL_{50}^2/IC(95\%)$	$CL_{90}/IC(95\%)$	CA <sup>3</sup> ± (EP)	$\chi^2$	g.l. <sup>(4)</sup>
-	Susc	450	0,206 (0,182-0,233)	0,524 (0,442-0,648)	3,164 ± 0,248	1,339	5
2008/09	LemBA	1024	0,05 (0,03 – 0,06)	2,23 (1,30 – 4,85)	1,381 ± 0,13	1,162	2
	CvMT	1600	0,03 (0,005 – 0,05)	0,302 (0,144 – 6,58)	2,340 ± 0,17	24,077	3
	BvpPR	768	0,09 (0,041 – 0,14)	1,250 (0,617 – 7,58)	2,059 ± 0,22	10,003	4
2010/11	RvGO	1536	0,05 (0,03 – 0,07)	0,28 (0,20 – 0,49)	2,29 ± 0,16	8,36	4
	LemBA	1280	0,04 (0,03 – 0,05)	0,30 (0,23 – 0,44)	1,90 ± 0,17	1,14	3
	CnpMT	1152	0,04 (0,03 – 0,05)	0,27 (0,20 – 0,42)	2,06 ± 0,15	5,07	4
	CaRS	1152	0,04 (0,04 – 0,05)	0,27 (0,22 – 0,33)	2,14 ± 0,13	3,40	4

<sup>1</sup>n= número insetos testados; <sup>2</sup>Concentração letal (CL) e Intervalo confiança (IC) expresso em  $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$  dieta; <sup>3</sup>CA= coeficiente angular e EP= erro padrão, <sup>4</sup> g.l.= graus de liberdade.

Os valores estimados de  $CE_{50}$  para as populações de *P. includens* variaram de 0,5005 a 0,7420  $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$  dieta na safra 2008/09, de 0,6152 a 0,9319  $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$  dieta na safra 2009/10 e de 0,8300 a 0,9235  $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$  dieta na safra 2010/11

(Tabela 3.3). A variação na suscetibilidade foi de apenas 1,86 vezes nas diferentes safras estudadas.

Tabela 3.3 Resposta das populações de *Pseudoplusia includens* coletadas nas safras 2008/09, 2009/10 e 2010/11 à proteína Cry1Ac em relação à inibição do crescimento larval em bioensaio de incorporação da proteína em dieta artificial.

Safra	Localização	n <sup>1</sup>	CE <sub>50</sub> <sup>2</sup> /IC(95%)	CE <sub>90</sub> /IC (95%)
2008/09	LonPR	1152	0,5960 (0,5319-0,6672)	2,8565 (2,2438-3,7549)
	LemBA	1472	0,7420 (0,5423-11,042)	4,4691 (2,3962-10,970)
	ShGO	1712	0,5005 (0,2969-)	2,0557 (0,8760-10,7968)
2009/10	ShGO	768	0,6152 (0,4015-1,0023)	5,5506 (2,3114-19,5850)
	BvpPR	1008	0,7114 (0,5564-0,9294)	3,4222 (2,0333-6,3187)
	ScpSP	1728	0,6872 (0,5459-0,8920)	3,5123 (2,0745-6,6999)
	CvMT	1232	0,9319 (0,4661-1,8427)	6,3860 (1,9102-46,8428)
2010/11	CamPR	1152	0,9235 (0,4581- 1,689)	4,9708 (1,418- 44,071)
	RvGO	1152	0,8558 (0,5235-1,3633)	4,4261 (1,6981-21,709)
	CvMT	1280	0,9194 (0,7199-1,1696)	5,3650 (3,3519-9,8076)
	SelRS	1024	0,8300 (0,6301-1,1174)	3,2477 (1,8013-6,5626)

<sup>1</sup>n= número de insetos testados; <sup>2</sup> Concentração efetiva (CE) e Intervalo de confiança (IC) expresso em µg de Cry1Ac ml<sup>-1</sup> dieta.

As CLs<sub>90</sub> para *A. gemmatalis* e *P. includens* foram de 0,67 (95% IC 0,37- 1,94) e 15,056 (95% IC 10,63- 25,13) µg de Cry1Ac ml<sup>-1</sup> dieta, respectivamente, mediante a análise conjunta dos dados de concentração-mortalidade com todas as populações estudadas.

### 3.3.2 Monitoramento da suscetibilidade de *P. includes* e *A. gemmatalis* à proteína Cry1Ac

Na safra 2009/10, na menor concentração de 5,6  $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$  dieta provocou mortalidade média de 88,2 a 97%, sendo a menor mortalidade na população de ShGO (88,2%), seguida por CvMT (93,7%), ScpSP (95,4%) e BvpPR (97,3%). A concentração de 18  $\mu\text{g Cry1Ac ml}^{-1}$  dieta causou mortalidade total nas populações de BvpPR e ShGO. A mortalidade de *P. includens* para CvMT e ScpSP foram menores, 99,5% e 99,8%, respectivamente. (Tabela 3.4).

Na safra 2010/11 a porcentagem de mortalidade para a concentração diagnóstica de 5,6  $\mu\text{g de Cry1Ac ml}^{-1}$  dieta variou de 94,76 a 99,78%. Para a concentração diagnóstica de 18  $\mu\text{g de Cry1Ac ml}^{-1}$  dieta as populações de RvGO e SelRS tiveram 100% de mortalidade, enquanto que RvBA, CvMT e CamPR sobreviveram cerca de aproximadamente 1 a 2% do total das lagartas. No entanto, as lagartas sobreviventes na maior concentração diagnóstica, na safra 2009/10 e 2010/11, apresentaram inibição no crescimento e no desenvolvimento larval. Desta maneira, não se observou mudança no instar e não foi possível medir seu peso.

Tabela 3.4 Monitoramento da suscetibilidade das lagartas neonatas de *Pseudoplusia includes* à proteína Cry1Ac incorporadas em dieta artificial. Safra soja: 2009/10 e 2010/11.

Safra	Localização	Tratamento	n <sup>1</sup>	Mortalidade	Peso (mg/lagarta ± EP)
2009/10	BvpPR	Controle	160	28,10	7,4 ± 1,0
		5,6µg.ml <sup>-1</sup>	512	97,30	0,8 ± 1,0
		18 µg.ml <sup>-1</sup>	496	100	-
	CvMT	Controle	128	7,00	4,9 ± 0,4
		5,6µg.ml <sup>-1</sup>	448	93,70	0,6 ± 0,1
		18 µg.ml <sup>-1</sup>	448	99,50	-
	ScpSP	Controle	128	1,20	3,9 ± 0,4
		5,6µg.ml <sup>-1</sup>	448	95,40	0,4 ± 0,1
		18 µg.ml <sup>-1</sup>	448	99,80	-
	ShGO	Controle	128	1,00	11,3 ± 2,5
		5,6µg.ml <sup>-1</sup>	448	88,20	0,7 ± 0,2
		18 µg.ml <sup>-1</sup>	448	100	-
2010/11	RvBA	Controle	128	2,34	9,6 ± 1,2
		5,6µg.ml <sup>-1</sup>	448	99,78	-
		18 µg.ml <sup>-1</sup>	448	99,78	-
	RvGO	Controle	160	1,88	7,7 ± 0,8
		5,6µg.ml <sup>-1</sup>	496	98,19	0,2 ± 0,2
		18 µg.ml <sup>-1</sup>	496	100	-
	SelRS	Controle	160	7,50	6,5 ± 0,4
		5,6µg.ml <sup>-1</sup>	560	96,96	0,1 ± 0,1
		18 µg.ml <sup>-1</sup>	560	100	-
	CvMT	Controle	128	10,16	4,8 ± 0,4
		5,6µg.ml <sup>-1</sup>	480	97,92	0,1 ± 0,01
		18 µg.ml <sup>-1</sup>	480	99,58	-
	CamPR	Controle	160	5,00	8,4 ± 0,5
		5,6µg.ml <sup>-1</sup>	496	94,76	0,3 ± 0,1
		18 µg.ml <sup>-1</sup>	496	99,40	-

<sup>1</sup>n= número de insetos testados; <sup>2</sup>EP= erro padrão.

*A. gemmatalis* na concentração diagnóstica de 0,56 de Cry1Ac ml<sup>-1</sup> dieta apenas a população de SelRS apresentou 100% de mortalidade. Já na concentração de 1,00 de Cry1Ac ml<sup>-1</sup> dieta provocou 100% de mortalidade nas populações de LemBA e CaRS. Apesar das demais populações, em ambas as concentrações diagnósticas, apresentarem sobrevivência das lagartas, não foi possível medir o peso das mesmas, pelo fato de não ocorrer à mudança de ínstar e desenvolvimento larval (Tabela 3.5).

Tabela 3.5 Monitoramento da suscetibilidade das lagartas neonatas de *Anticarsia gemmatalis* à proteína Cry1Ac incorporada em dieta artificial. Safra soja: 2010/11.

Safra	Localização	Tratamento	n <sup>1</sup>	Mortalidade	Peso (mg por lagarta ± EP)
2010/11	LemBA	Controle	128	4,68	1,9 ± 0,006
		0,56 µg.ml <sup>-1</sup>	448	99,77	-
		1,00 µg.ml <sup>-1</sup>	448	100	-
	RvGO	Controle	128	2,34	3,8 ± 0,8
		0,56 µg.ml <sup>-1</sup>	448	99,10	-
		1,00 µg.ml <sup>-1</sup>	448	99,77	-
	CaRS	Controle	192	10,41	2,1 ± 0,1
		0,56 µg.ml <sup>-1</sup>	672	100	-
		1,00 µg.ml <sup>-1</sup>	672	100	-
	CnpMT	Controle	160	3,12	3,3 ± 0,006
		0,56 µg.ml <sup>-1</sup>	560	98,75	-
		1,00 µg.ml <sup>-1</sup>	560	99,82	-

<sup>1</sup>n= número de insetos testados; <sup>2</sup>EP= erro padrão.

### 3.4 Discussão

Os valores de CL<sub>50</sub> obtidas para as diferentes populações de *P. includens* e *A. gemmatalis* apresentaram pouca variabilidade. Isto pode ser consequência de sua variabilidade natural, já que essas populações não estiveram expostas a doses da toxina. Níveis semelhantes de suscetibilidade foram observados em subpopulações de *H. virescens*, antes da liberação comercial de algodão Bt nos Estados (Stone & Sims, 1993; Luttrell et al., 1999; Ali et al., 2006).

Ao dividir a respectiva CL<sub>50</sub> de *P. includens* pela CL<sub>50</sub> da população de *A. gemmatalis*, observou-se que as lagartas de *A. gemmatalis* foram 27 vezes mais suscetíveis para à proteína Cry1Ac que as lagartas de *P. includens*. Normalmente, quando a *P. includens* é exposta a inseticidas químicos e biológicos como *B. thuringiensis*, ela apresenta maior tolerância que *A. gemmatalis*, entre 1,5 e 5,6 vezes para Bt e 1,4; 3,2 e 4,6 vezes para metomil, metamidofós e permetrina, respectivamente. Assim o controle de *P. includens* requer a utilização de doses elevadas de inseticidas

químicos e biológicos (Morales et al., 1995; Braga et al., 2011). Ao comparar a suscetibilidade de *P. includens* com *H. virescens* (Albernaz, 2011), observou-se que *H. virescens* foi 4,90 vezes mais suscetível para proteína Cry1Ac que *P. includens*. Desta maneira, em relação à tolerância à proteína Cry1Ac, *A. gemmatalis* é menos tolerante, seguida de *H. virescens* e *P. includens*. Trabalhos em que utilizaram soja expressando altos níveis do gene *cry1Ac*, observaram-se mortalidade total em *A. gemmatalis* e significativa redução para *P. includens*, portanto, essa tolerância parece ser referente à espécie (Stewart et al., 1996; Macrae et al., 2005).

Muitas pragas desenvolveram resistência a plantas Bt em quatro anos após a liberação comercial (Storer et al., 2010; Van Rensburg, 2007) e em laboratório, por meio da pressão de seleção é possível que as pragas desenvolvam altos níveis de resistência (Gould et al., 1995; Luttrell et al., 1999; Burd et al., 2003). Isso mostra que se o manejo não for feito de maneira correta no campo, é possível que em poucos anos tenha casos iniciais de insetos resistentes. No caso de *P. includens*, esta situação pode ser agravada pelo fato da cultura do algodão também ser uma planta hospedeira desta praga. O plantio de algodão Bt expressando à proteína Cry1Ac pode acelerar a evolução da resistência entre as populações de *P. includens*, principalmente nas regiões brasileiras que são produtoras da cultura da soja como do algodão.

Nas estratégias para realizar manejo de resistência, um fator importante a ser considerado é determinar uma concentração diagnóstica capaz de detectar alterações nos níveis de suscetibilidade. A utilização da concentração de 18 µg de Cry1Ac ml<sup>-1</sup> dieta pode ser recomendada nos programa de monitoramento de *P. includens* na soja Bt, pois nos testes realizados, sete dias após o tratamento, observou-se a sobrevivência de lagartas na maior dose diagnóstica, porém, as mesmas não apresentaram desenvolvimento larval, todas as lagartas permaneceram no primeiro instar e em todos

os casos, não foi possível realizar a pesagem das lagartas. Trabalhos indicam que as proteínas Bt podem impedir o crescimento e redução no desenvolvimento dos insetos (Sims et al., 1996; Ali et al., 2006). A inibição no crescimento provocada pela ingestão da proteína Cry1Ac pode ser potencialmente incluída na avaliação da suscetibilidade das populações de lagartas (Ali & Luttrell, 2009), pois a detecção de pequenas alterações no aumento do peso e do desenvolvimento larval após liberação comercial pode indicar o início do desenvolvimento de resistência.

Por fim, por meio do monitoramento é possível preservar a eficiência da tecnologia no campo. Quanto mais cedo for feita a detecção da resistência em populações de campo, maior será a eficiência no manejo da resistência ao Bt (Fengxia et al., 2003).

### **3.5 Conclusões**

As subpopulações de *A. gemmatalis* e *P. includens* não diferiram na suscetibilidade à proteína.

A concentração diagnóstica definida foi 1,00 µg de Cry1Ac ml<sup>-1</sup> dieta para *A. gemmatalis* e 18 µg de Cry1Ac ml<sup>-1</sup> dieta para *P. includens* que será utilizada para monitorar as possíveis alterações de suscetibilidade no programa de monitoramento para o manejo da resistência à proteína presente na soja-Bt.

### 3.6 Referências Bibliográficas

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

2011. 83p. Tese de Doutorado em Entomologia, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 2011.

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

ALI, M.I.; LUTTRELL, R.G. Response estimates for assessing heliothine susceptibility to Bt toxins. **Journal of Economic Entomology**, v. 102, p. 1935-1947, 2009.

BERNARDI, O.; ALBERNAZ, K.C.; VALICENTE, F.H.; OMOTO, C. Resistência de insetos-praga a plantas geneticamente modificadas. In: BORÉM, A.; ALMEIDA, G.D. **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais.** Ed. Suprema, 2011, p. 179-204.

BRAGA, P.V.; OLIVEIRA, W.S., MARTINELLI, S. SOSA-GÓMEZ, D.R.; OLIVEIRA, M. Estudo de Caso da Soja MON 87701 x MON 89788 (Bt/RR2). In: BORÉM, A.; ALMEIDA, G.D. **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais.** Ed. Suprema, 2011, p. 347-390.

BURD, A.D.; GOULD, F.; BRADLEY, J.R.; VAN DUYN, J.W.; MOAR, W.J. Estimated frequency of nonrecessive Bt resistance genes in bollworm, *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) in eastern North Carolina. **Journal of Economic Entomology**, v. 96, p. 137-142, 2003.

EMBRAPA. 2011. A soja. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/soja>. Acesso em: 27 de agosto 2011.

FELLAND, C. M., PITRE, H. N.; LUTTRELL, R.G.; HAMER, J.L. Resistance to pyrethroid insecticides in soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) in Mississippi. **Journal of Economic Entomology**. v. 83, p. 35-40, 1990.

- FENGXIA, M.; SHEN, J.; ZHOU, W.; CEN, H. Long-term selection for resistance to transgenic cotton expressing *Bacillus thuringiensis* toxin in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pest Management Science**, v. 60, p. 167-172, 2003.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMINI, J.D. **Entomologia Agrícola**. 10ª. Ed. São Paulo, Fealq, 2002, p. 920.
- GOULD, F.; ANDERSON, A.; REYNOLDS, A.; BUMGARNER, L. MOAR, W. Selection and genetic analysis of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin. **Journal of Economic Entomology**, v. 88, p. 1545-1559, 1995.
- GOULD, F. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. **Annual Review of Entomology**, v.43, p.701–726, 1998.
- HOFFMANN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, E.B.; MOSCARDI, F. **Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*)**, EMBRAPA/CNPSo, Documentos 1985, p. 10.
- LEONARD, B.R.; BOETHEL, T.C.; SPARKS JUNNIOR, A.M.; LAYTON, M.B.; MINK, J.S.; PAVLOFF, A.M.; BURRIS, E.; GRAVES, J.B. Variations in response of soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) to selected insecticides in Louisiana. **Journal of Economic Entomology**, v. 83, n. 1, p. 27-34, 1990.
- LEORA SOFTWARE. Polo-PC: A user's guide to probit or logit analysis. Berkeley, CA, USA : LeOra Software, 22p. 1987.
- LUTTRELL, R.G.; WAN, L.; KNIGHTEN, K. Variation in susceptibility of Noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin protein and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Economic Entomology**, v. 92, p. 21-32, 1999.
- MACRAE, T.C.; BAUR, M.E.; BOETHEL, D.J.; FITZPATRICK, B.J.; GAO, A.G.; GAMUNDI, J.C.; HARRISON, L.A.; KABUYE, V.T.; MCPHERSON, R.M.; MIKLOS, J.A.; PARADISE, M.S.; TOEDEBUSCH, A.S.; VIEGAS, A. Laboratory and

field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAc* gene for control of Lepidoptera. **Journal of Economic Entomology**, v. 95, n.2, p. 577-587, 2005.

MORALES, L.; MOSCARDI, F.; KASTELIC, J.G.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; PARO, F.E.; SOLDÓRIO, I.L. Suscetibilidade de *Anticarsia gemmatilis* Hübner e *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), a *Bacillus thuringiensis* (Berliner). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**. v. 24, p. 593-598. 1995.

ROGGIA, S.; GUEDES, J.V.C.; KUSS, R.C.R.; ARNEMANN, J.A.; NÁVIA, D. Spider mites associated to soybean in Rio Grande do Sul, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol.43, p. 295-301, 2008.

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

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

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

SOSA-GÓMEZ, D.R.; SILVA, J.J. Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p. 767-769, 2010.

STEWART, C.N.; ADANG, M.J.; ALL, J.N.; BOERMA, H.R.; CARDINEAU, G.; TUCKER, D.; PARROTT, W.A. Genetic transformation recovery, and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIAc* gene. **Plant Physiology**, v. 112, p. 121-129, 1996.

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

STORER, N.P.; BABCOCK, J.M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G.D.; BING, J.W.; HUCKABA, R.M. Discovery and characterization of field resistance to Bt

maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, p. 1031-1038, 2010.

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

## CAPÍTULO 4

### **Variabilidade genética das populações de *Pseudoplusia includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) nas regiões produtoras de soja no Brasil**

#### **4.1 Introdução**

A cultura da soja é uma cultura de grande importância econômica mundial. O Brasil é o segundo maior produtor mundial e estima-se que seja plantada uma área de aproximadamente 24,5 milhões de hectares para a safra 2011/12 (CONAB, 2012).

Muitas pragas causam perdas agrícolas anualmente na cultura da soja. Entre os lepidópteros, *P. includens* é uma das principais pragas e ocorre em todas as áreas produtoras de soja no território nacional. É uma espécie migratória e nativa do continente americano (Ford et al., 1975; Kogan, 1981; Alford & Hamond, 1982; Sosa-Gómez, 2004; Braga et al., 2011).

O controle dessa praga é feito principalmente por meio do controle químico, no entanto, muitas vezes o controle de *P. includens* não é muito eficiente, pelo seu hábito de permanecer na porção interna da planta e o inseticida não conseguir alcançá-la. Além disso, a *P. includens* tem desenvolvido resistência aos inseticidas químicos (Thomas & Boethel, 1994). Estratégias de controles alternativos, principalmente com o uso de inseticidas biológicos são estudadas, mas não são amplamente utilizados (Luttrell et al., 1998; Moscardi, 1999). A comercialização da soja Bt é uma nova tecnologia que traz mais uma ferramenta para o manejo dessas pragas agrícolas (Braga et al., 2011).

As informações sobre a distribuição das populações geográficas de *P. includens* no Brasil ainda é restrita. Assim, o conhecimento da estrutura genética populacional e

do fluxo gênico entre as populações destas pragas são importantes para contribuir no delineamento do manejo. Por meio da análise do mtDNA é possível compreender a diversidade natural genética e a estrutura populacional dos organismos e também para estudos de migração de insetos (Salinas-Hernandez & Saldamando- Benjumea, 2011) . O mtDNA são muito utilizados em estudos de populações de insetos, por ser uma região de tamanho pequeno, alta taxa de mudança evolucionária e por ter herança materna (Roderick, 1996; Caterino, 2000).

Assim, este trabalho tem por objetivo estudar a variabilidade genética de *P. includens* nas principais regiões produtoras de soja, utilizando sequências de genes mitocondriais.

## **4.2 Material e Métodos**

### **4.2.1 Espécimes**

As populações de *P. includens* foram coletadas nas diferentes regiões produtoras de soja nas safras 2008/09 e 2009/10 (Quadro 4.1) e amostradas cinco populações para cada espécie. Os insetos foram mantidos em condições de laboratório até a fase de pupa, a fim de evitar contaminação por parasitoides e micro-organismos entomopatogênicos. As pupas foram mantidas a -20°C com sílica gel desidratada até a extração do DNA.

Localidade	Longitude (S)	Latitude (W)	Data
Campo Verde- Mato Grosso (MT)	15° 24' 50,1''	55° 06' 54,8''	18/12/2008
Tasso Fragoso- Maranhão (MA)	08°30'20''	-	08/01/2009
Bela Vista do Paraíso- Paraná (PR)	23° 02' 019''	51° 10' 6,76''	21/01/2009
Santa Helena- Goiás (GO)	17° 51' 17,0''	50° 51' 74,8''	22/01/2009
Coxilha- Rio Grande do Sul (RS)	28° 11' 16,0''	52° 19' 44,7''	16/03/2009

Quadro 4.1 Identificação de amostras de *Pseudoplusia includens*, com localidade, coordenadas geográficas e data de coleta na cultura da soja.

#### 4.2.2 Extração do DNA

O DNA foi extraído seguindo o protocolo de Rogers & Bendich (1988), a extração foi realizada da cabeça do inseto para evitar a contaminação com a possível presença de parasitoides à hemocele (Sosa-Gómez et al., 2002). Para cada amostra foi utilizada 400 µL de tampão de extração, na concentração final de 200 mM Tris-HCL (pH 8,0), 70 mM EDTA, 2 M NaCL e 1% de β-mercaptoethanol, foi macerada e homogeneizada dentro de tubo de microcentrífuga. Após a adição de 120 µL de 5% CTAB, a amostra foi mantida 5 min até 65°C, seguindo homogeneização. Em seguida, foi adicionado 6 µL solução de proteinase K (10 mg.mL<sup>-1</sup>) e novamente incubada em banho-maria (65°C) por 60 min. Após esse período, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente e centrifugadas a 14.000 rpm durante 15 minutos. A fase superior (500 µL) foi transferida para outro microtubo, adicionando o mesmo volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após leve homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 min. e em seguida foi recuperada a fase aquosa (400 µL), a qual foi transferida para outro microtubo, onde os ácidos nucléicos foram

precipitados com o dobro do volume de isopropanol 100% gelado e 45% do volume de  $\text{NH}_4\text{OAc}$  10 M.

Esse material permaneceu por duas horas a  $-4^\circ\text{C}$ . As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos, descartando-se o sobrenadante e lavando o *pellet* com 300  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado. Os *pellets* foram secos com os tubos invertidos em temperatura ambiente por uma hora. Os *pellets* foram então ressuspensos em 100,8  $\mu\text{L}$  em tampão TE com RNase adicionada na concentração final de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e mantidos a  $37^\circ\text{C}$  por 2 horas. As alíquotas de DNA foram armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$  até serem utilizadas para amplificação.

#### 4.2.3 Quantificação do DNA

O DNA foi quantificado através de gel de agarose (1%) corado com 10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de brometo de etídio. A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 1X (216 g de Tris; 110 g ácido bórico; 80 mL de EDTA 0,5 M e água destilada para completar 2 L) a 120V por 1 hora. A visualização do gel foi feita em transiluminador L-PIX- ST e L-PIX IMAGE 7.1 M Pixel, no programa de captura de imagem L-PIX IMAGE 1.0.1 (Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP). No mesmo gel foram colocadas amostras de  $\lambda$  DNA com concentrações de 5, 10, 15 e 20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , para estimar a concentração de DNA nas amostras estudadas.

#### 4.2.4 Amplificação e sequenciamento

Foram utilizado três fragmentos de regiões de genes mitocondriais de COI, COII e CytB para as análises populacionais de *P. includens* (Quadro 4.2). A reação de

amplificação foi feita em uma reação final de 25 µL contendo 2,5 µL de tampão 10X, 2,0 µL de dNTP's (2,5 mM), 2,0 µL de DMSO (5%), 1,0 µL de iniciador (5 µM), 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM) e 0,2 µL de enzima Taq polimerase (Gibco BRE) (5 U/µL), 10,05 µL de água MiliQ E 5µl de DNA (3ng/µL) por microtubo de amplificação de PCR. Como controle negativo foi utilizado uma amostra que contenha todos os reagentes, exceto o DNA do inseto.

O DNA amplificado foi purificado com enzima ExoSap-IT, conforme instruções do fabricante (Fermentas, Ontario- Canadá) e enviado para sequenciar nos sentidos “forward” e “reverse”, pelo menos duas repetições por amostras. O sequenciamento foi feito pelo sequenciador automático Perkin Elmer Applied Biosystems ABI-3100.

Gene	Iniciador	F/R	Sequência (5' →3')	Programas
COI	J 1514 <sup>(1)</sup>	F	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	1 ciclo: 95°C- 5min, 34 ciclos: 94°C-1 min, 52°C- 1min, 72°C- 1min e 30seg, 1 ciclo: 72°C- 5min.
	N 2175	R	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA	
COII	Patrick <sup>(1)</sup>	F	CTA ATA TGG CAG ATT ATA TGT AAT GGA	1 ciclo: 96°C- 2min, 34 ciclos: 94°C- 1min, 45°C- 1 min e 20 seg, 1 ciclo: 72°C- 4 min.
	Eva	R	GAG ACC ATT ACT TGC TTT CGA TCA TCT	
CytB	CytBF <sup>(2)</sup>	F	GGA CAA ATA TCA TGA GGA GCA ACA G	1 ciclo: 95°C- 5min, 34 ciclos: 94°C-1 min, 52°C- 1min, 72°C- 1min e 30seg, 1 ciclo: 72°C- 5min.
	CytBR	R	ATT ACT CCT CCT AGC TTA TTA GGA ATT G	

(1) Simon et al. (1994); <sup>(2)</sup> Monteiro et al. (1999)

Quadro 4.2. Iniciadores utilizados para o sequenciamento de espécimes de *Pseudoplusia includens* e seus respectivos programas de amplificação

#### 4.2.5 Análise dos dados

As sequências foram analisadas no programa Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor Michigan, EUA) e alinhadas com Clustal W para alinhamento múltiplos no programa BioEdit v.7.05.3 (Hall, 1999). Posteriormente, estas sequências serão depositadas no banco de dados do GenBank.

O índice do padrão genético de diversidade, a diversidade nucleotídica e diversidade de haplótipos foram estimadas usando o programa Arlequin v. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

A análise molecular de variância (AMOVA) foi realizada para a avaliação da estrutura genética por meio do programa Arlequin v.3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

As relações e distribuições dos haplótipos foram estabelecidas usando o programa TCS v. 1.21 (Clemente et al., 2000). Este programa utiliza dados estatísticos de probabilidade baseados no critério da parcimônia para estimar genealogias por meio de sequências de DNA (Templeton et al., 1992).

### 4.3 Resultados

#### 4.3.1 Variabilidade genética dos genes COI, COII e CytB para *Pseudoplusia includens*

Foram sequenciados um total de 67 indivíduos de *P. includens* provenientes de cinco localidades de diferentes regiões produtoras de soja no Brasil e cada localidade foi considerada como uma subpopulação (Quadro 4.1). Foram obtidos uma total de 1797

nucleotídeos de DNAmít, sendo 658 nucleotídeos referentes ao gene COI, 725 nucleotídeos a COII e 414 nucleotídeos a CytB.

Foram analisadas 69 seqüências com os dados COI + COII + CytB combinados e encontrados 29 haplótipos usando o programa TCS v. 1.2.1 (Figura 4.1). O haplótipo mais comum a todas as subpopulações estudadas foi o haplótipo h1, que corresponderam a 17,07% da subpopulação de Goiás, 21,95% Mato Grosso, 17,07% Maranhão, 26,83% Paraná e 9,76% do Rio Grande do Sul. Entre os haplótipos identificados, dois são compartilhados entre amostras, o haplótipo h2, encontrado em um indivíduo da subpopulação de Goiás, quatro do Mato Grosso, um do Paraná e um do Rio Grande do Sul. O segundo é o haplótipo h3, encontrado em um indivíduo de Goiás, um do Maranhão, um do Mato Grosso e um do Rio Grande do Sul. Os demais haplótipos (26) são únicos, sendo que cinco são da subpopulação de Goiás, seis do Maranhão, um do Mato Grosso, quatro do Paraná e um do Rio Grande do Sul (Figura 4.1; Tabela 4.2.)

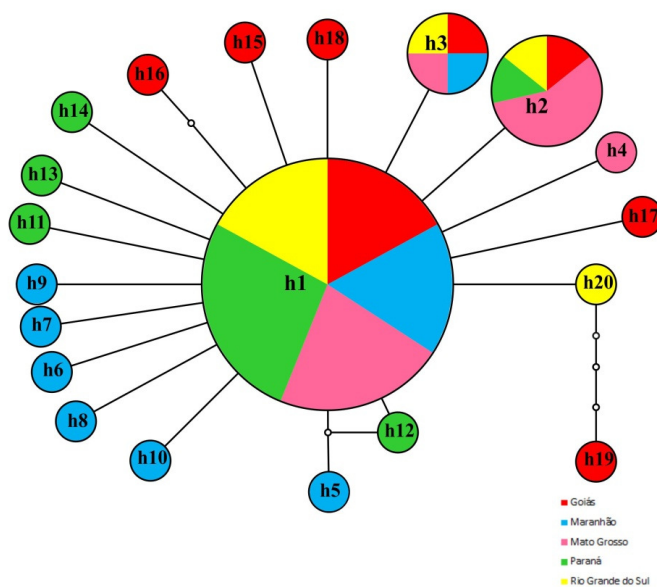


Figura 4.1. Rede de haplótipos mostrando as inter-relações existentes entre os haplótipos de *Pseudoplusia includens* nas diferentes regiões produtoras de soja

A diversidade haplotípica variou de 0,1333 a 0,5055 e a diversidade nucleotídica de 0,00011 a 0,00277 (Tabela 4.2).

Tabela 4. 2. Diversidade haplotípica e nucleotídica em *P. includens*, nas regiões COI + COII + CytB.

Subp. <sup>(1)</sup>	N <sup>(2)</sup>	N <sub>h</sub> <sup>(3)</sup>	Haplótipo (n° indivíduos)	Diversidade haplotípica	Diversidade nucleotídica
MT	15	3	h1(9), h2 (4), h3 (1), h4 (1)	0,1333 ± 0,112	0,00025 ± 0,0003
MA	14	8	h1 (7), h3 (1), h5 (1), h6 (1), h7 (1), h8 (1), h9 (1), h10 (1)	0,5055 ± 0,158	0,00039 ± 0,0003
PR	16	6	h1 (11), h2 (1), h11 (1), h12 (1), h13 (1), h14 (1),	0,2417 ± 0,135	0,00040 ± 0,0003
GO	14	8	h1 (7), h2 (1), h3 (1), h15 (1), h16 (1), h17 (1), h18 (1), h19 (1)	0,3956 ± 0,158	0,00277 ± 0,0021
RS	10	4	h1 (7), h2 (1), h3 (1), h20 (1)	0,2000 ± 0,154	0,00011 ± 0,0001

<sup>(1)</sup> Regiões produtoras de soja; <sup>(2)</sup> número total de indivíduos sequenciados; <sup>(3)</sup> número total de haplótipos observados.

O resultado da AMOVA para COI + COII + CytB combinado, indicou que ocorreu variação apenas dentro das populações. O valor de  $\phi_{st}$  foi de - 0,00547, não sendo significativo.

Tabela 4.3. Análise variância molecular de *Pseudopiusia includens*, regiões COI + COII + CytB.

Fonte de variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componente variação	Porcentagem de variação
Entre populações	4	0,859	- 0,0012 Va	- 0,55
Dentro das populações	64	14,851	0,2320 Vb	100,55
Total	68	15,710	0,23079	
Índice fixação	$\phi_{ST}$	- 0,00547		

A análise da distribuição *Mismatch* mostrou um padrão unimodal, indicando que *P. includens* sofreu um processo recente de expansão populacional (Figura 4.2). Os parâmetros *mismatch* estimados foram theta 0 ( $\theta_0$ )= 0,000, theta 1 ( $\theta_1$ )= 0,385 e tau ( $\tau$ )= 3,000.

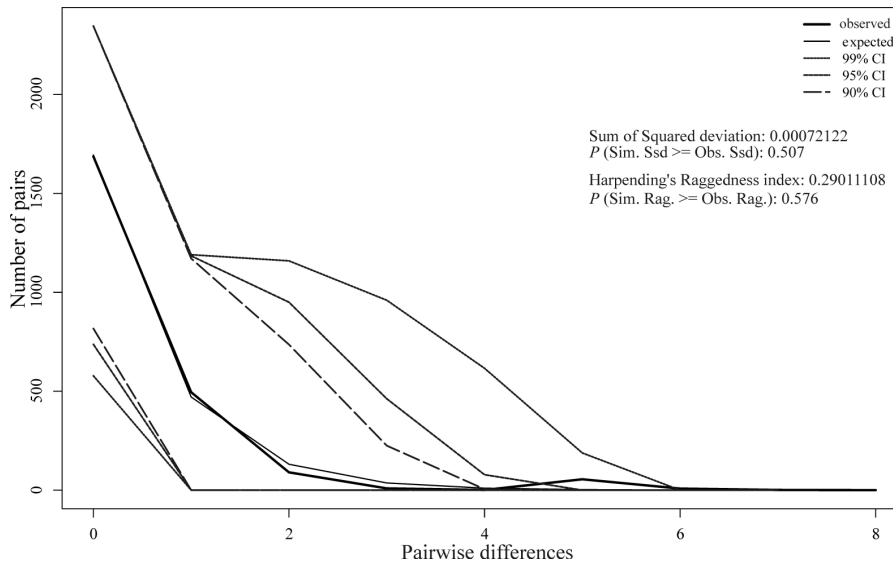


Figura 4.2 Distribuição das frequências do número de diferenças nucleotídicas pareadas (*Mismatch distribution*) de COI + COII + CytB das amostras de *Pseudoplusia includens* coletadas em diferentes regiões brasileiras, na cultura da soja.

#### 4.4 Discussão

Os resultados sobre a variabilidade e fluxo gênico em populações de *P. includens* indicaram que não existe estruturação nas subpopulações estudadas. A ausência de agrupamento na análise da rede de haplótipos das sequências de mtDNA evidencia a reduzida diferenciação entre as subpopulações. A AMOVA sugere uma baixa estruturação genética da população e praticamente a variação genética existente ocorre nas subpopulações.

Os reduzidos valores de diversidade nucleotídica e da estatística F, indicam um elevado fluxo gênico entre as subpopulações geográficas. A baixa estruturação genética

tem sido encontrada em outras pragas de lepidópteros, como *Ostrinia nubilalis*, *H. armigera* e *H. virescens* (Coates et al., 2004; Behere et al., 2007; Albernaz et al., 2011).

Das subpopulações amostradas, o grupo de insetos coletados no estado de Goiás e Maranhão, apresentaram o maior número de haplótipos. A validação dos resultados com marcadores moleculares e a compreensão da distribuição da variabilidade genética das populações de insetos, também depende-se de observações ecológicas referentes ao comportamento de vôo e a capacidade de dispersão da espécie (Sosa-Gómez et al., 2004).

No caso da subpopulação do Maranhão de *P. includens* que também apresentou grande diversidade haplotípica comparada às demais populações estudadas. O isolamento pela distância é capaz de acarretar o aumento na variação genética com o aumento das distâncias devido à dispersão limitada no espaço (Slatkin, 1993).

A área de cultivo de soja no Brasil é de aproximadamente 24,35 milhões de hectares de um total de 50,66 milhões de hectares de área cultivada de grãos (CONAB, 2012). Essa condição pode favorecer elevado fluxo gênico e a expansão demográfica entre as populações de *P. includens*.

O conhecimento gerado neste trabalho é importante em ambientes de cultivos que estão próximas as áreas com ataques de lepidópteros de soja e algodão, por exemplo. Tal preocupação é devida a possibilidade de exploração das diferentes culturas numa região pelas mesmas populações de insetos, o que pode aumentar a pressão de seleção para resistência a inseticidas nas populações de praga (Wu et al., 2004).

#### 4.5 Conclusões

Considerando os fragmentos de genes estudados há baixa variabilidade genética entre as subpopulações de *P. includens*;

O fluxo gênico é elevado entre as subpopulações.

#### 4.6 Referências Bibliográficas

ALBERNAZ, K.C.; SILVA-BRANDÃO, K.L; FRESIA, P.; CÔNSOLI, F.L.; OMOTO, C. Genetic variability and demographic history of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Brazil inferred by mtDNA sequences. **Bulletin of Entomological Research**, p. 1-11, 2011.

ALFORD, A.R.; HAMMOND JR, A.M. Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Louisiana soybeans ecosystems as determined with loop lure-baited traps. **Journal of Economic Entomology**. 75: 647-650. 1982.

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

BRAGA, P.V.; OLIVEIRA, W.S., MARTINELLI, S. SOSA-GÓMEZ, D.R.; OLIVEIRA, M. Estudo de Caso da Soja MON 87701 x MON 89788 (Bt/RR2). In: BORÉM, A.; ALMEIDA, G.D. **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais**. Ed. Suprema, 2011, p. 347-390.

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

CLEMENTE, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1657-1660, 2000.

COATES, B.S.; SUMERFORD, D.V.; HELLMICH, R.L. Geographic and voltinism differentiation among North American *Ostrinia nubilalis* (Europeans corn borer) mitochondrial cytochrome c oxidase haplotypes. **Journal of Insect Science**, v. 4, p. 1-9, 2004.

Companhia Nacional de Abastecimento, CONAB. 2012. **4º Levantamento grãos safra 2011/2012**- Janeiro/2012. Disponível em:  
<<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&t=2>>.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p.564-567, 2010.

FORD, B.J.; STRAYER, J.R.; GOFREY, G.L. The literature of arthropods associated with soybean. IV. A bibliography of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera Noctuidae). **Natural History Survey**. 92: 15. 1975.

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

KOGAN, M. Dynamics of insect adaptations to soybean: Impact of integrated pest management. **Environmental Entomology**. 10: 363-371. 1981.

LUTTRELL, R.G.; ALI, A.; YOUNG, S.Y.; KNIGHTEN, K. Relative activity of commercial formulation of *Bacillus thuringiensis* against selected noctuid larvae (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal Entomological Science**, v. 33, p. 365-377, 1998.

MONTEIRO, F.A.; PEREZ, R.; PANZERA, F.; DUJARDIN, J.P.; GALVÃO, C.; ROCHA, D.; NOIREA, U. F.; SCHOFIELD, C.; BEARD, C.B. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 229-238, 1999.

MOSCARDI, F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review Entomology**, v. 44, p. 257-259, 1999.

POSADA, D.; CRANDALL, K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, p. 917-818, 1998.

- RODERICK, G.K. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. **Annual Review of Entomology**, v. 41, p. 325-352, 1996.
- ROGER, S.O.; BENDICH, A.J. Extraction of DNA from plant issues. **Plant molecular biology**. v.79, p. 1-18, 1988.
- SALINAS-HERNANDEZ, H.; SALDAMANDO-BENJUMEA, C.L. Haplotype identification within *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Corn and rice strains from Colombia. **Neotropical Entomology**, v. 40, p. 421-430, 2011.
- SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved PCR primers. **Annual Entomological Society of America**, v. 87, p. 1-51, 1994.
- SLATKIN, M. Isolation by distance in equilibrium and on equilibrium populations. **Evolution**, v. 47, p. 264-279, 1993.
- SOSA-GÓMEZ, D.R. Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genetics and Molecular Biology**. 27: 378-384. 2004.
- SOSA-GOMEZ, D.R.; DELPIN. K.T.; ALVARO, M.R.; ALMEIDA, A.M.R.; HIROSE, E. Genetic differentiation among Brazilian populations of *Euchistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) based on RAPD analysis. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 179-187, 2004.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.
- TEMPLETON, A.R.; CRANDALL, K.A.; SING, C.A. Cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, v. 132, p.619-633, 1992.

THOMAS, J.D.; BOETHEL, D.J. Synergism of insecticides in tests with resistant soybean looper larvae (Lepidoptera: Noctuidae) in the laboratory and field. **Journal of Economic Entomology**, v. 87, p. 1416-1422, 1994.

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

## CAPÍTULO 5

### **Variabilidade genética das populações de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) nas regiões produtoras de soja no Brasil**

#### **5.1 Introdução**

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), é o principal desfolhador da cultura da soja. É um inseto nativo das áreas tropicais e subtropicais e restritas ao continente Americano (Ford et al., 1975). A importância de *A. gemmatalis* é evidente principalmente na cultura da soja. No Brasil eventualmente ocorre nas culturas de alfafa, amendoim e girassol, principalmente se tais culturas forem plantadas posteriormente à colheita da soja, com a eliminação da planta preferencial, os insetos passam a atacar as plântulas de outros hospedeiros (Embrapa, 2000). Na soja esta praga causa severos danos, inicialmente as lagartas novas raspam as folhas, produzindo pequenos danos, mas à medida que crescem, ficam mais vorazes, destruindo as folhas e até mesmo as hastes mais finas. Até completar seu desenvolvimento, cada lagarta pode consumir aproximadamente 90 cm<sup>2</sup> de folha (Panizzi et al., 1977); desta forma, altas infestações desse inseto em lavouras de soja podem comprometer a produção em função do nível de infestação e do estágio fenológico da cultura (Hoffman-Campo et al., 2000).

Um aspecto importante no controle de pragas é o conhecimento de suas características genótípicas e de fluxo gênico. Atualmente por meio de ferramentas moleculares é possível sequenciar genes e caracterizar a ocorrência de alterações mutacionais, que podem fornecer importantes informações sobre processos evolutivos,

de diferenciação, intra e interespecífica e na identificação de populações resistentes a inseticidas (Martins et al., 2005). Análises de RAPD com *A. gemmatalis* provenientes de diferentes localidades apontaram que há alta similaridade entre as populações brasileiras, além disso, a ligação entre as populações do Brasil e dos Estados Unidos é maior do que comparados com Brasil e Argentina (Sosa-Gómez, 2004).

Cerca de 70% dos estudos com marcadores de DNA fazem uso do DNA mitocondrial como ferramenta genética (Zhan & Hewitt, 2003). O uso de sequências de DNA mitocondrial tem sido utilizado para o estudo de genética de populações em muitos grupos de lepidópteros (Behere et al., 2007). Estudos têm explorado principalmente a região de citocromo oxidase, por exemplo, com *Spodoptera frugiperda* é possível separar duas linhagens por meio da amplificação de um segmento do gene COI e com o uso de enzimas de restrição, separar indivíduos com haplótipos diferentes associados a hospedeiros diferentes (Nagoshi et al., 2006; Nagoshi et al., 2007).

Este trabalho teve por objetivo estudar a variabilidade genética e o fluxo gênico entre as populações de *A. gemmatalis* nas principais regiões produtoras de soja, utilizando sequências de genes mitocondriais.

## **5.2 Material e Métodos**

### **5.2.1 Espécimes**

As populações de *A. gemmatalis* foram coletadas nas diferentes regiões produtoras de soja nas safras 2008/2009 e 2009/2010 (Quadro 5.1). Amostras de cinco localidades foram armazenados em condições de laboratório até a fase de pupa, a fim de

evitar contaminação por parasitoides e microrganismos entomopatogênicos. As pupas foram mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$  com sílica gel desidratada até a extração do DNA.

Localidade	Longitude	Latitude	Data
Santa Helena, Goiás (GO)	17° 51' 17,0"	50° 51' 74,8"	21/01/2009
Luis Eduardo Magalhães, Bahia (BA)	11° 28' 41,1"	45° 34' 99,7"	06/01/2009
Mauá da Serra, Paraná (PR)	23° 52' 55,4"	51° 17' 19,2"	21/01/2009
Coxilha, Rio Grande do sul (RS)	28° 11' 16,0"	52° 19' 44,7"	16/03/2009
Campo Verde, Mato Grosso (MT)	15° 24' 50,1"	55° 06' 54,8"	20/12/2008

Quadro 5.1 Identificação de amostras de *Anticarsia gemmatalis*, com localidade, coordenadas geográficas e data de coleta na cultura da soja.

### 5.2.2 Extração do DNA

O DNA foi extraído seguindo o protocolo de Rogers & Bendich (1988) a extração foi realizada da cabeça do inseto para evitar a contaminação com a possível presença de parasitoides na hemocele das pupas (Sosa-Gómez et al., 2002). Cada amostra foi tratada com 400  $\mu\text{L}$  de tampão de extração, na concentração final de 200 mM Tris-HCL (pH 8,0), 70 mM EDTA, 2 M NaCL e 1% de  $\beta$ -mercaptoethanol, foi macerada e homogeneizada dentro de tubo de microcentrífuga. Após a adição de 120  $\mu\text{L}$  de 5% CTAB, a amostra foi mantida 5 min até  $65^{\circ}\text{C}$ , seguindo homogeneização. Em seguida, foi adicionado 6  $\mu\text{L}$  solução de proteinase K ( $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e novamente incubada em banho-maria ( $65^{\circ}\text{C}$ ) por 60 min. Após esse período, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente, e centrifugadas a 14.000 rpm durante 15 min. A fase superior (500  $\mu\text{L}$ ) foi transferida para outro microtubo, adicionando o mesmo volume de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Após leve homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 min. e em seguida foi recuperada a fase aquosa (400  $\mu\text{L}$ ), a qual foi transferida para outro microtubo, onde os ácidos nucléicos foram

precipitados com o dobro do volume de isopropanol 100% gelado e 45% do volume de  $\text{NH}_4\text{OAc}$  10 M.

Esse material permaneceu por duas horas a  $-4^\circ\text{C}$ . As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 minutos, descartando-se o sobrenadante e lavando o *pellet* com 300  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado. Os *pellets* foram secos com os tubos invertidos em temperatura ambiente por uma hora e posteriormente ressuspensos em 100,8  $\mu\text{L}$  em tampão TE com RNase adicionada na concentração final de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e mantidos a  $37^\circ\text{C}$  por 2 horas. As alíquotas de DNA foram armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$  até serem utilizadas para amplificação.

### 5.2.3 Quantificação do DNA

O DNA foi quantificado através de gel de agarose (1%) corado com  $10\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de brometo de etídio. A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 1X (216 g de Tris; 110 g ácido bórico; 80 mL de EDTA 0,5 M e água destilada para completar 2 L) a 120V por 1 hora. A visualização do gel foi feita em transiluminador L-PIX- ST e L-PIX IMAGE 7.1 M Pixel, no programa de captura de imagem L-PIX IMAGE 1.0.1 (Loccus Biotecnologia, São Paulo, SP). No mesmo gel foram colocadas amostras de  $\lambda$  DNA com concentrações de 5, 10, 15 e 20  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , para estimar a concentração de DNA nas amostras estudadas.

### 5.2.4 Amplificação e sequenciamento

Foram utilizados três fragmentos de regiões de genes mitocondriais de COI, COII e CytB para as análises populacionais de *A. gemmatalis* (Quadro 5.2). A reação de amplificação foi feita em uma reação final de 25 µL contendo 2,5 µL de tampão 10X, 2,0 µL de dNTP's (2,5 mM), 2,0 µL de DMSO (5%), 1,0 µL de iniciador (5 µM), 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM) e 0,2 µL de enzima Taq polimerase (Gibco BRE) (5 U/µL), 10,05 µL de água MiliQ e 5µl de DNA (3ng/µL) por microtubo de amplificação de PCR. Como controle negativo foi utilizado uma amostra que tinha todos os reagentes, exceto o DNA do inseto.

O DNA amplificado foi purificado com enzima ExoSap-IT conforme instrução do fabricante (Fermentas, Ontario- Canadá) e enviado para sequenciar nos sentidos “forward” e “reverse”, pelo menos duas repetições por amostras. O sequenciamento foi feito pelo sequenciador automático Perkin Elmer Applied Biosystems ABI-3100.

Gene	Iniciador	F/R	Sequência (5' →3')	Programas
COI	J 1514 <sup>(1)</sup>	F	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	1 ciclo: 95°C- 5min, 34 ciclos: 94°C-1 min, 52°C- 1min, 72°C- 1min e 30seg, 1 ciclo: 72°C- 5min.
	N 2175	R	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA	
COII	Patrick <sup>(1)</sup>	F	CTA ATA TGG CAG ATT ATA TGT AAT GGA	1 ciclo: 96°C- 2min, 34 ciclos: 94°C- 1min, 45°C- 1 min e 20 seg, 1 ciclo: 72°C- 4 min.
	Eva	R	GAG ACC ATT ACT TGC TTT CGA TCA TCT	
CytB	CytBF <sup>(2)</sup>	F	GGA CAA ATA TCA TGA GGA GCA ACA G	1 ciclo: 95°C- 5min, 34 ciclos: 94°C-1 min, 52°C- 1min, 72°C- 1min e 30seg, 1 ciclo: 72°C- 5min.
	CytBR	R	ATT ACT CCT CCT AGC TTA TTA GGA ATT G	

<sup>(1)</sup> Simon et al. (1994); <sup>(2)</sup> Monteiro et al. (1999).

Quadro 5.2. Iniciadores utilizados para o sequenciamento de espécimes de *Anticarsia gemmatalis* e seus respectivos programas de amplificação

### 5.2.5 Análise dos dados

As sequências foram analisadas no programa Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor Michigan, EUA) e alinhadas com Clustal W para alinhamento múltiplos no programa BioEdit v.7.05.3 (Hall, 1999). Posteriormente, estas sequências serão depositadas no banco de dados do GenBank.

O índice do padrão genético de diversidade, a diversidade nucleotídica e diversidade de haplótipos foram estimadas usando o programa Arlequin v. 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

A análise molecular de variância (AMOVA) foi realizada para a avaliação da estrutura genética por meio do programa Arlequin v.3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

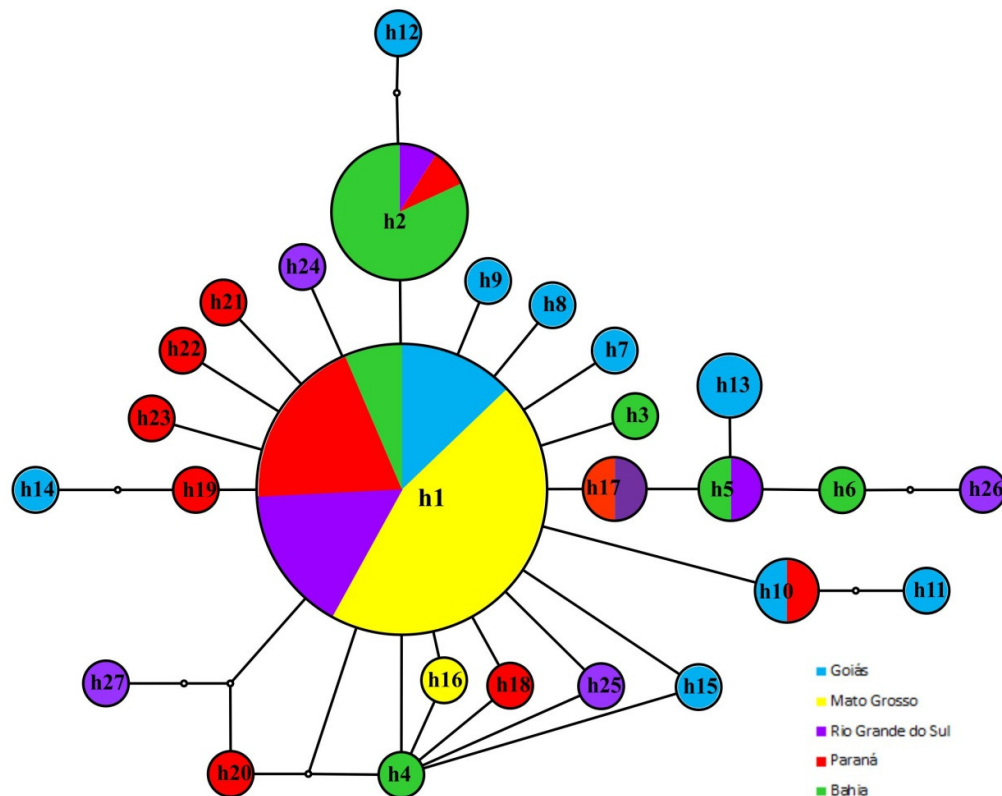
As relações e distribuições dos haplótipos foram estabelecidas usando o programa TCS v. 1.21 (Clemente et al., 2000). Este programa utiliza dados estatísticos de probabilidade baseados no critério da parcimônia para estimar genealogias por meio de sequências de DNA (Templeton et al., 1992).

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Variabilidade genética dos genes COI, COII e CytB para *Anticarsia gemmatalis*

Foram sequenciados um total de 71 indivíduos de *A. gemmatalis* provenientes de cinco localidades de diferentes regiões produtoras de soja no Brasil, os indivíduos de cada localidade foram considerados como subpopulação (Quadro 5.1).

Nas 71 seqüências analisadas com os dados COI + COII + CytB combinados, foram encontrados 27 haplótipos usando o programa TCS v. 1.2.1 (Figura 5.1). O haplótipo mais comum a todas as subpopulações estudadas foi o haplótipo h1, sendo, 6,45% da subpopulação da Bahia, 12,90% de Goiás, 45,16% Mato Grosso, 19,35% Paraná e 16,16% do Rio Grande do Sul. Entre os 27 haplótipos identificados, seis são compartilhados entre duas ou mais subpopulações, o haplótipo mais representativo foi o h2, sendo encontrado em 9 indivíduos da subpopulação da Bahia, um do Paraná e um do Rio Grande do Sul. Os demais haplótipos (21) são únicos, na qual sete são da subpopulação da Bahia, um de Goiás, seis do Mato Grosso, três do Paraná e quatro do Rio Grande do Sul.



**Figura 5.1** Rede de haplótipos mostrando as inter-relações existentes entre os haplótipos de *Anticarsia gemmatalis* nas diferentes regiões produtoras de soja.

A diversidade haplotípica com os dados combinados variou de 0,671 a 1,000 e a diversidade nucleotídica de 0,00044 a 0,0010 (Tabela 5.1)

Tabela 5.1 Diversidade haplotípica e nucleotídica em *Anticarsia gemmatalis*, nas regiões COI + COII + CytB.

Subp. <sup>(1)</sup>	N <sup>(2)</sup>	N <sub>h</sub> <sup>(3)</sup>	Haplótipo (n° indivíduos)	Diversidade haplotípica	Diversidade nucleotídica
BA	15	6	h1 (2), h2 (9), h3 (1), h4 (1), h5 (1), h6 (1)	0,671 ± 0,138	0,0010 ± 0,0007
GO	14	10	h1 (4), h7 (1), h8 (1), h9 (1), h10 (1), h11 (1), h12 (1), h13 (2), h14 (1), h15 (1)	0,989 ± 0,031	0,0015 ± 0,0009
MT	15	2	h1 (14), h16 (1)	1,000 ± 0,024	0,0007 ± 0,0001
PR	15	10	h1 (6), h2 (1), h10 (1), h17 (1), h18 (1), h19 (1), h20 (1), h21 (1), h22 (1), h23 (1)	1,000 ± 0,024	0,0007 ± 0,0005
RS	12	8	h1 (5), h2 (1), h17 (1), h24 (1), h25 (1), h26 (1), h27 (1)	1,000 ± 0,034	0,0004 ± 0,0065

<sup>(1)</sup> Regiões produtoras de soja; <sup>(2)</sup> número total de indivíduos sequenciados; <sup>(3)</sup> número total de haplótipos observados

Os resultados da AMOVA revelaram que 91,65% da variabilidade genética está dentro das subpopulações e o índice de fixação  $\phi_{st}$  foi de 0,08354, sendo significativo (Tabela 5.2).

Tabela 5.2. Análise variância molecular de *Anticarsia gemmatalis*, nas regiões COI + COII + CytB.

Fonte de variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componente variação	Porcentagem de variação
Entre subpopulações	4	6,609	0,065713 Va	8,35
Dentro das subpopulações	66	45,574	0,72082 Vb	91,65
Total	70	54,183	0,78653	
Índice fixação	$\phi_{st}$	0,08354		

O  $F_{st}$  de Slatkin (1995) par-a-par de todas as populações estudadas variou de 0,000 a 0,316, sendo o maior valor encontrado referente às subpopulações de Mato Grosso e da Bahia (Tabela 5.3).

Tabela 5.3  $F_{st}$  de Slatkin par a par para amostras de *Anticarsia gemmatalis* de cada região, baseada na análise combinada dos genes COI + COII+ CytB.

	Número de migrantes (Nm)				
	BA	GO	MT	PR	RS
BA	0,0000				
GO	<b>0,10987</b>	0,0000			
MT	<b>0,31665</b>	<b>0,04225</b>	0,0000		
PR	<b>0,15691</b>	0,00064	0,0000	0,0000	
RS	<b>0,11346</b>	0,00000	<b>0,14504</b>	0,02092	0,00000

Matriz de Slatkin ( $F_{ST}$ )

Negrito- significativos.

A análise da distribuição *Mismatch* mostrou um padrão unimodal, indicando que *A. gemmatalis* sofreu um processo recente de expansão populacional (Figura 5.2). Os parâmetros *mismatch* estimados foram theta 0 ( $\theta_0$ )= 3,517, theta 1 ( $\theta_1$ )= 99999,00 e tau ( $\tau$ )= 1,211.

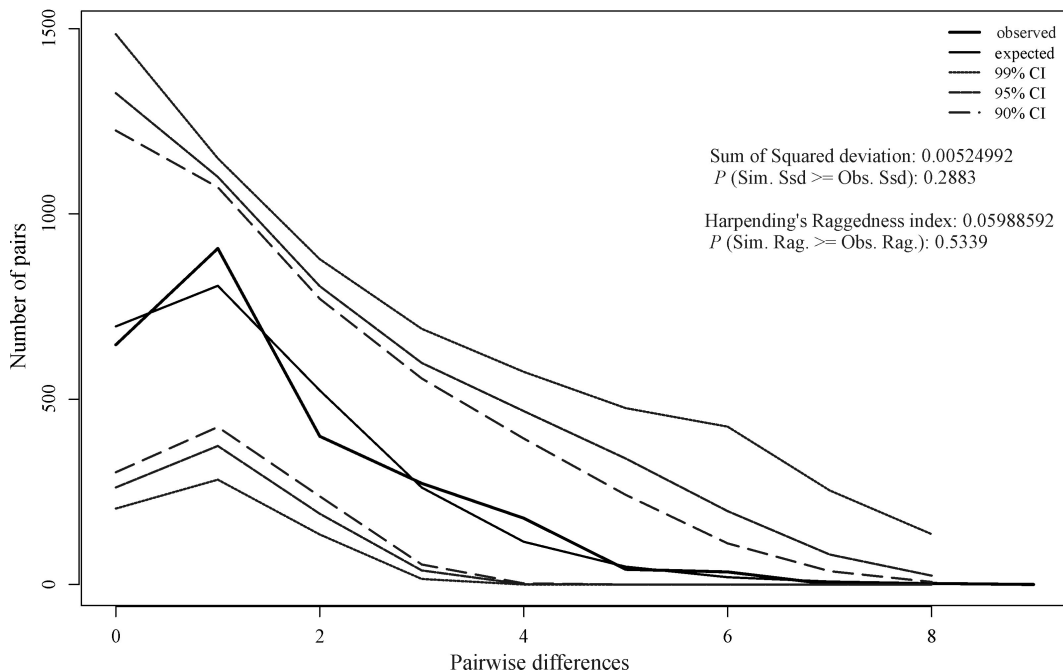


Figura 5.2 Distribuição das frequências do número de diferenças nucleotídicas pareadas (*Mismatch distribution*) de COI + COII + CytB das amostras de *Anticarsia gemmatalis* coletadas em diferentes regiões brasileiras, na cultura da soja.

## 5.4 Discussão

A subpopulação de MT apresentou a menor variação na frequência dos haplótipos para todas as regiões estudadas. Alguns haplótipos são exclusivos de um único indivíduo de uma subpopulação, outros são específicos de algumas regiões, por exemplo, na subpopulação de Goiás, o haplótipo h13 foi observado em dois de um total de quatorze indivíduos. Neste caso, há necessidade de realizar amostragens com maior número de indivíduos para inferir com maior confiabilidade quais haplótipos são mais representativos.

O haplótipo h1 foi o mais frequente e amplamente distribuído e pode ser considerado o haplótipo ancestral, pois a partir do qual se originaram todos os outros haplótipos. Após o haplótipo h1, o haplótipo mais representativo foi o h2, sendo encontrado em indivíduos da Bahia, Paraná e Rio Grande do Sul. Neste haplótipo, observou-se a maior frequência haplotípica dentro de uma mesma subpopulação. Na subpopulação da Bahia observou-se uma mutação de transição, nove de um total de quinze indivíduos apresentaram o nucleotídeo A, enquanto que os demais foram observados com o nucleotídeo G. Estudos complementares com a técnica de RFLP devem ser realizados para poder confirmar a diferenciação dessas alterações na sequência. Por meio desta distinção dos haplótipos, em muitos casos, é possível distinguir linhagens diferentes que podem estar relacionados à preferência de hospedeiros, fisiologia, comportamento e suscetibilidade a inseticidas (Pashley et al., 1986; Prowell, 2004; Busato et al., 2005; Nagoshi et al., 2007). Estudos realizados por Nagoshi et al. (2007) determinaram por meio do estudo dos haplótipos, duas linhagens relacionados a dois hospedeiros diferentes, o arroz e milho. Estes haplótipos são identificados mesmo em insetos provenientes de regiões distantes, como América do Norte e na América do Sul.

Alguns haplótipos foram observados em mais de uma subpopulação como h5 (BA, RS), h10 (PR, GO) e h17 (PR, RS). O haplótipo h17, foi o que apresentou uma relação mais próxima, pois o estado do Paraná e do Rio Grande do Sul, estão localizadas na mesma região. Já os haplótipos h5 e h10, em que um mesmo haplótipo agrupou-se em subpopulações com localizações distantes, também foram observados esta relação com marcadores RAPD por Sosa-Gómez (2004), onde apresentou similaridade em *A. gemmatalis* localizadas em Goiás, Paraná e Rio Grande do Sul.

Os estudos das regiões mitocondriais de *A. gemmatalis* e *P. includens* demonstrou que não há forte estruturação genética em ambas espécies estudadas. Grande parte dos haplótipos encontrados foi representada apenas por um único indivíduo de uma subpopulação. No entanto, para *A. gemmatalis* foi possível observar que há um maior potencial para identificar possíveis haplótipos que possam caracterizar uma determinada subpopulação. Para isso é necessário à utilização de outras ferramentas, como por exemplo, estudos com enzimas de restrição, que possam contribuir na identificação de haplótipos nas subpopulações de *A. gemmatalis* no Brasil.

## 5.5 Conclusão

A subpopulação da Bahia apresentou uma maior frequência no haplótipo h2, mas de modo geral a distribuição dos haplótipos esteve distribuída entre as demais subpopulações;

*A. gemmatalis* apresentou maior variabilidade genética dentro das subpopulações do que entre as subpopulações.

## 5.6 Referências Bibliográficas

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

BUSATO, G.R.; GRÜTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S.; GIOLO, F.P.; ZOTTI, M.J.; STEFANELLO-JÚNIOR, G.J. Biologia comparada de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de milho e arroz. **Neotropical Entomology**, v. 34, n.5, p. 743-750, 2005.

CLEMENTE, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1657-1660, 2000.

EMBRAPA. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 70 p.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p.564-567, 2010.

FORD, B.J.; STRAYER, J.R.; GOFREY, G.L. The literature of arthropods associated with soybean. IV. A bibliography of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepdoptera Noctuidae). **Natural History Survey**, v. 92, p. 15, 1975.

GROOT, A.T., CLASSEN, A., INGLIS, O., BLANCO, C.A., LÓPEZ, J. JR, VARGAS, A.T., SCHAL, C., HECKEL, G.; SCHÖFL, G. Genetic differentiation across North America in the generalist moth *Heliothis virescens* and the specialist *H. subflexa*. **Molecular Ecology**, v. 20, n.13, p. 2676-2692, 2011.

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

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F. CÔRREA-FERREIRA, B.S.; OLIVEIRA, L.J.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; PANIZZI, A.R.; CORSO, I.C.; GAZZONI,

D.L.; OLIVEIRA, E.B. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina: Embrapa Soja. (Circular Técnica/Embrapa Soja, n.30). 2000, 70p.

MARTINS, E.S.; QUEIROZ, P.R.; LIMA, L.H.C.; MONNERAT, R.G. Análise da variabilidade genética de uma população de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares RAPD. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 17p., 2005.

MONTEIRO, F.A.; PEREZ, R.; PANZERA, F.; DUJARDIN, J.P.; GALVÃO, C.; ROCHA, D.; NOIREA, U. F.; SCHOFIELD, C.; BEARD, C.B. Mitochondrial DNA variation of *Triatoma infestans* populations and its implication on the specific status of *T. melanosoma*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 229–238, 1999.

NAGOSHI, R. N., R. L. MEAGHER, J. J. ADAMCZYK, S. K. BRAMAN, R. L. BRANDENBURG, AND G. NUSSLY. New restriction fragment length polymorphisms in the cytochrome oxidase I gene facilitate host strain identification of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the southeastern United States. **Journal of Economic Entomology**, v. 99, p. 671- 677, 2006.

NAGOSHI, R.N.; SILVIE, P.; MEAGHER, R.L. Comparisons of haplotype frequencies differentiate fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) corn-strain populations from Florida and Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 100, n. 3, p. 953-961, 2007.

PANIZZI, A. R., B. S. CORREA, R.B.; GAZZONI, D.L.; OLIVEIRA, E.B.; NEWMAN, G.G.; TURNIPSEED, S.G. Insetos da soja no Brasil. **Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina, (Boletim Técnico 1)**, 1977, 20 p.

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

POSADA, D.; CRANDALL, K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, p. 917-818, 1998.

PROWELL, D.P.; McMICHAEL, M.; SILVAIN, J.F. Multilocus genetic analysis of host use, introgression and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, n.5, p. 1034-1044, 2004.

ROGER, S.O.; BENDICH, A.J. Extraction of DNA from plant issues. **Plant molecular biology**, v.79, p. 1-18, 1988.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved PCR primers. **Annual Entomological Society of America**, v. 87, p. 1-51, 1994.

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

SOSA-GÓMEZ, D.R.; HUMBER, R.; MOSCARDI, F. Entomopathogens associated with soybean/wheat production systems in Brazil and Argentina. In: SIP 35<sup>th</sup> Annual Meeting Society for Invertebrate Pathology. Foz de Iguassu, August 18-23, PR, Brazil, p. 75, 2002.

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

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

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

ZHANG, D.X.; HEWITT, G.M. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 563- 568, 2003.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao determinar a suscetibilidade de *P. includens* aos diferentes inseticidas observou-se que há variação entre as subpopulações. Esta variação pode estar relacionada ao modo como é feito o manejo de controle de pragas em cada região de coleta estudada. Os valores da concentração-resposta para o inseticida metamidofós foram maiores do que para metomil e permetrina. Ao analisar as populações estudadas, os indivíduos provenientes da Bahia apresentaram os maiores valores de concentração-resposta, independente do inseticida utilizado.

Quanto a suscetibilidade de *P. includens* e *A. gemmatalis* à proteína Cry1Ac apresentaram pouca variabilidade. Isto pode ser consequência de sua variabilidade natural, já que as populações não estiveram expostas a doses da toxina no campo.

As lagartas de *A. gemmatalis* foram 27 vezes mais suscetíveis para à proteína Cry1Ac que as lagartas de *P. includens*. Isso mostra que o manejo para *P. includens* necessita de maior atenção, além disso a cultura do algodão também é uma planta hospedeira desta praga. Assim, o plantio de algodão Bt expressando à proteína Cry1Ac pode acelerar a evolução da resistência entre as populações de *P. includens*, principalmente nas regiões brasileiras que são produtoras da cultura da soja como do algodão.

Os estudos das regiões mitocondriais de *A. gemmatalis* e *P. includens* demonstrou que há reduzida estruturação genética em ambas espécies estudadas. Grande parte dos haplótipos encontrados foi representada apenas por um único indivíduo de uma subpopulação. No entanto, para *A. gemmatalis* foi possível observar que há um maior potencial para identificar possíveis haplótipos que possam

caracterizar uma determinada subpopulação. Para isso é necessário à utilização de outras ferramentas, como por exemplo, estudos de PCR-RFLP, que possam contribuir na identificação de haplótipos nas subpopulações de *A. gemmatalis* no Brasil.