

SYSTEMATICS, MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY

Análise da Estrutura e Diversidade Molecular de Populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Associadas às Culturas de Milho e Arroz no Rio Grande do Sul

GUSTAVO R. BUSATO¹, ANDERSON D. GRÜTZMACHER¹, ANTÔNIO C. DE OLIVEIRA², EDUARDO A. VIEIRA², PAULO D. ZIMMER², MAURÍCIO M. KOPP², JULIANA DE M. BANDEIRA¹ E TAÍS R. MAGALHÃES¹

¹Lab. Biologia de Insetos - DFs/FAEM; ²Centro de Genômica e Fitomelhoramento - DFt/FAEM
UFPEL - C. postal 354, 96010-900, Pelotas, RS

Neotropical Entomology 33(6):709-716 (2004)

Analysis of the Molecular Structure and Diversity of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Populations Associated to the Corn and Rice Crops in Rio Grande do Sul State, Brazil

ABSTRACT - The goal of this work was to analyze the molecular structure and diversity of four *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) populations associated to the corn and rice crops in Rio Grande do Sul State. Four populations of caterpillars were collected from distinct areas (more than 300 km apart), from the counties of Santa Rosa (corn) and Uruguaiana (irrigated rice), and in adjacent areas in Pelotas county (corn and irrigated rice). The analysis of 40 caterpillars (10 from each population), with five combinations of primers generated a total of 241 loci, among them 229 (95%) were polymorphic. The dendrogram generated by the clustering method UPGMA, based on the Dice similarity matrix, showed overlappings among the studied populations. The diversity indexes evidenced that 88% of the genetic diversity was observed within populations and 12% between *S. frugiperda* populations. The dendrogram generated by clustering UPGMA method, based on the dissimilarity matrix from the euclidean distances, evidenced the existence of a differentiation among populations according to the host plant, being the loci 42 and 47 (*M*-CTG/*E*-ACC) capable of detecting 100% of the genetic differences. These results showed that the genetic variation of *S. frugiperda* populations is associated to host plants, confirming the presence of the “corn” and “rice” biotypes of *S. frugiperda* in Rio Grande do Sul State.

KEY WORDS: Insecta, fall armyworm, AFLP, biotype

RESUMO - O objetivo do trabalho foi analisar a estrutura e a diversidade molecular de quatro populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) associadas às culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. Foram coletadas lagartas de quatro populações em áreas isoladas (distanciadas em mais de 300 km) nos municípios de Santa Rosa (milho) e Uruguaiana (arroz irrigado) e em áreas adjacentes, no município de Pelotas (milho e arroz irrigado). A análise de 40 lagartas (10 de cada população), com cinco combinações de oligonucleotídeos iniciadores geraram o total de 241 locos, dentre os quais 229 (95%) foram polimórficos. O dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, baseado na matriz de similaridade de Dice, mostrou sobreposições entre as lagartas das populações estudadas. Os índices de diversidade evidenciaram que 88% da diversidade genética foi observada dentro das populações e 12% entre as populações de *S. frugiperda*. O dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, baseado na matriz de dissimilaridade das distâncias euclidianas, evidenciou a existência de uma diferenciação entre as populações de acordo com a planta hospedeira, sendo os locos 42 e 47 (*M*-CTG/*E*-ACC) capazes de detectar 100% das diferenças genéticas. Esses resultados sugerem que a variação genética das populações de *S. frugiperda* está associada às plantas hospedeiras, confirmando a presença dos biótipos “milho” e “arroz” de *S. frugiperda* no Rio Grande do Sul.

PALAVRAS-CHAVE: Insecta, lagarta-do-cartucho, lagarta-da-folha, AFLP, biótipo

A lagarta *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) é uma das principais pragas da cultura do milho e do arroz irrigado no Rio Grande do Sul, por ocasionar altos índices de desfolhamento às plantas (Grützmacher *et al.* 2000, Martins

et al. 2000). Caracteriza-se por ser uma espécie polífaga, apresentando como hospedeiros 23 famílias de plantas. Nos Estados Unidos (EUA) foram detectados dois biótipos de *S. frugiperda*, sendo que as lagartas do biótipo “milho” alimentam-se de milho e algodão e o biótipo “arroz” alimentam-se de arroz, grama-seda e outras gramíneas forrageiras (Pashley 1986, 1993). O estudo da compatibilidade reprodutiva entre os dois biótipos indicou a existência de isolamento unidirecional (Pashley & Martin 1987) e a análise da composição do feromônio, evidenciou a existência de variação quantitativa nos três principais acetatos. Desta forma, tais biótipos passaram a ser considerados espécies crípticas associadas às plantas hospedeiras (Drès & Mallet 2002).

A constatação da existência de biótipos de *S. frugiperda* tem fundamental importância na atual concepção da entomologia econômica, uma vez que pode haver um comportamento diferenciado dos biótipos quanto à suscetibilidade a inseticidas (Pashley et al. 1987a, Adamczyk et al. 1997, Edwards et al. 1999) e à resistência de plantas a biótipos (Pashley et al. 1987b, Whitford et al. 1988).

Em condições de várzea na região sul do Rio Grande do Sul, o milho é potencialmente uma das melhores alternativas para a rotação de cultura com o arroz irrigado, principalmente para minimizar os índices de infestação de plantas daninhas (Porto et al. 1998). Nessas áreas, existe a possibilidade de ocorrerem os biótipos “milho” e “arroz” de *S. frugiperda*, pois, de acordo com Pashley (1988), estes coexistem em Porto Rico e nos Estados Unidos (Flórida, Geórgia e Louisiana).

O emprego da biologia molecular, mediante a utilização de marcadores moleculares, tem permitido a identificação de populações, raças e/ou espécies crípticas associadas às plantas hospedeiras (Drès & Mallet 2002). Além disso, é uma ferramenta importante para a realização de estudos aplicados (Pashley 1988) e tem se mostrado eficiente na distinção dos biótipos “milho” e “arroz” de *S. frugiperda* (Pashley et al. 1985, Lu et al. 1992, Lu & Adang 1996, Levy et al. 2002).

Dentre as técnicas de marcadores moleculares, o AFLP (amplified fragment length polymorphism) destaca-se pelo grande número de marcadores gerados por reação (capacidade multiplex), grande poder de detecção de variabilidade genética e maior robustez do ensaio (Vos et al. 1995). Apesar de essa técnica ser dominante, ou seja, detectar apenas um alelo por loco (presença ou ausência), ela foi empregada com sucesso em estudos de diversidade genética e estruturação populacional de insetos (Yan et al. 1999, Takami et al. 2004).

O manejo de insetos pragas vem sendo realizado dentro das bases técnicas do manejo integrado de pragas (MIP) que associa os conhecimentos do ambiente e da dinâmica populacional da espécie-alvo e utiliza todos os métodos e técnicas apropriadas de forma tão compatível quanto possível para manter a população da praga em níveis abaixo daqueles capazes de causar dano econômico. Entretanto, para que se tenha êxito na utilização das estratégias do MIP visando o controle de *S. frugiperda* nas culturas do milho e do arroz irrigado é preciso caracterizar as populações da

praga. Desta forma, o objetivo do trabalho foi analisar a estrutura e diversidade molecular de quatro populações de *S. frugiperda* associadas às culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul.

Material e Métodos

Origem e Criação dos Insetos. Foram coletadas lagartas de quatro populações de *S. frugiperda* no Rio Grande do Sul (500 insetos por população) nos municípios de Santa Rosa (latitude: 27° 52' 15" Sul e longitude: 54° 28' 53" Oeste) e de Uruguaiana (latitude: 29° 45' 17" Sul e longitude: 57° 05' 18" Oeste), tradicionalmente produtores de milho e arroz irrigado, respectivamente, e no município de Pelotas (latitude: 31° 46' 19" Sul e longitude: 52° 20' 33" Oeste), que produz milho e arroz irrigado (lado a lado). As populações estudadas receberam as seguintes denominações: A) milho Santa Rosa (M/SR); B) arroz Uruguaiana (A/U); C) milho Pelotas (M/P); e, D) arroz Pelotas (A/P), de acordo com a cultura e o local de coleta. As lagartas coletadas foram criadas no Laboratório de Biologia de Insetos (DFs/FAEM/UFPel) sobre folhas do respectivo hospedeiro até a pupação. Os adultos foram mantidos em gaiolas cilíndricas de PVC (20 x 20 cm), revestidas internamente com papel jornal e fechadas na parte superior com tecido tipo tule, alimentados com solução aquosa de mel a 10%, sendo as posturas acondicionadas em câmaras climatizadas. Por ocasião da eclosão, as lagartas foram mantidas em dieta artificial de Greene modificada até a extração do DNA.

Extração e Quantificação do DNA. Os estudos moleculares foram realizados no Centro de Genômica e Fitomelhoramento (DFt/FAEM/UFPel). A extração do DNA genômico de 10 lagartas de 4º ínstar de cada população (1ª geração) seguiu o protocolo descrito por Saghai-Marooof et al. (1984). Os insetos foram macerados inteiros em tubo de microcentrifuga (1,5 ml) contendo 400 µl do tampão de extração [EB; 200 mM Tris pH 8,0; 200 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% SDS; 20 µg de proteinase K] sendo tratados com 400 µl de CTAB 2%. Para eliminação dos contaminantes presentes no DNA, realizou-se uma extração orgânica [clorofórmio: álcool isoamílico (24:1)]. Posteriormente, o DNA foi precipitado por desidratação com isopropanol e etanol 70%, sendo diluído em 50 µl de TE [10 mM Tris pH 0,8%; 1 mM EDTA].

A quantificação do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídeo, onde a concentração de DNA foi estimada através de comparação com o padrão conhecido do marcador de massa molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). O DNA genômico foi armazenado a -20°C.

Técnica de AFLP. As reações de AFLP, conforme descrito por Vos et al. (1995) foram desenvolvidas utilizando-se o kit AFLP® Analysis Sistem I. Aproximadamente 150 ng de DNA genômico de cada lagarta foram submetidos à digestão com enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI* e ligação de oligonucleotídeos adaptadores (Tabela 1). Em seguida, foi realizada a amplificação, utilizando iniciadores com uma base seletiva (*EcoRI*-A e *MseI*-C) em 25 µl de reação.

Tabela 1. Adaptadores e seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores (5'-3') usados na técnica de AFLP. FAEM/UFPEL, Pelotas, 2003.

Oligonucleotídeo iniciador	Tipo de oligonucleotídeo iniciador	Seqüência (5'-3')
<i>EcoRI</i> -A1	Adaptador	CTCGTAGACTGCGTACC
<i>EcoRI</i> -A2	Adaptador	AATTGGTACGCAGTCTAC
<i>EACT</i>	+3	GACTGCGTACCAATTCAC
<i>EACC</i>	+3	GACTGCGTACCAATTCACC
<i>MseI</i> -A1	Adaptador	GACGATGAGTCTTGAG
<i>MseI</i> -A2	Adaptador	TACTCAGGACTCAT
<i>MCAG</i>	+3	GATGAGTCCTGAGTAACAG
<i>MCTC</i>	+3	GATGAGTCCTGAGTAACTC
<i>MCAC</i>	+3	GATGAGTCCTGAGTAACAC

Posteriormente, o DNA pré-amplificado foi diluído (1:25) e amplificado utilizando iniciadores com três bases seletivas (*EcoRI*-ANN e *MseI*-CNN), sendo que para os iniciadores, cada N corresponde a uma base: A, C, T ou G. As reações de PCR foram realizadas em termociclador *PTC-100* (MJ Research).

A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada após a eletroforese (potência constante de 60 W, temperatura de 60°C, por 90 min.) em gel desnaturante de poliacrilamida (5%) em aparato vertical modelo *S2* (Life Technologies) contendo tampão de cuba TBE IX. A coloração do gel com nitrato de prata seguiu o protocolo descrito por Creste *et al.* (2001).

Análise dos Dados e Estimativas dos Parâmetros de Diversidade Genética. Os produtos das reações de amplificação seletiva foram classificados conforme presença (1) e ausência (0) de bandas e somente os locos polimórficos foram analisados. Para a estimativa das freqüências alélicas foi assumido que os locos apresentavam equilíbrio de Hardy-Weinberg, uma vez que os locos de AFLP segregam como marcadores dominantes e não permitem a estimativa direta das freqüências alélicas, procedimento similar ao adotado por Yan *et al.* (1999) e Takami *et al.* (2004). Desta forma, a freqüência do alelo recessivo ($q_{(i)}$) no loco i , foi estimada pela fórmula: $q_{(i)} = \sqrt{x_{(i)}}$, onde $x_{(i)}$ é a freqüência do homozigoto recessivo (nulo) no loco i e a freqüência do alelo dominante (presente) foi estimada da seguinte forma: $p_{(i)} = [1 - q_{(i)}]$, onde $q_{(i)}$ é a freqüência do alelo recessivo (nulo) q no loco i , através do programa AFLP-SURV 1.0 (Vekemans *et al.* 2002). Para a mensuração da diversidade genética foi empregada a função de Shannon-Wiener: $H' = -\sum p_i \log_2(p_i)$, onde p_i se refere à freqüência do alelo i no loco i , segundo o método proposto por Lewontin (1972), por ser apropriado para a análise de dados binários (presença x ausência), como os obtidos com a técnica de AFLP.

Foram calculados os índices de diversidade dentro das populações: i) H_0 (diversidade genética de cada loco em cada população) com base nas freqüências alélicas de cada loco em cada população, ii) H_{pop} (diversidade genética média de cada loco nas quatro populações) através da média aritmética dos H_0 s de cada loco nas quatro populações e iii) H_{pop} (diversidade genética dentro das populações)

através da média aritmética do H_{pop} de todos os locos estudados. Também foram determinados os índices de diversidade entre as populações: i) $H_{espécie}$ (diversidade genética de cada loco nas quatro populações) com base na freqüência alélica de cada loco nas quatro populações e ii) $H_{espécie}$ (diversidade genética total) através da média aritmética dos $H_{espécie}$ s de todos os locos estudados. Posteriormente, foi calculada a proporção da diversidade genética presente dentro das populações em cada loco analisado ($H_{pop}/H_{espécie}$) e em todos os locos estudados ($H_{pop}/H_{espécie}$), bem como a proporção da diversidade genética presente entre as populações em cada um dos locos estudados ($H_{espécie} - H_{pop}$) e em todos ($H_{espécie} - H_{pop}$)/ $H_{espécie}$.

Os dados de presença/ausência de bandas obtidos na análise de AFLP de 40 lagartas (10 de cada uma das populações) foram também utilizados para o cálculo da similaridade genética entre todos os pares de indivíduos, com o auxílio do programa computacional NTSYS (Rohlf 1989). No cálculo da similaridade genética foi utilizado o coeficiente de Dice (Dice 1945) e com base na matriz de similaridade gerada foi construído um dendrograma através do método de agrupamento UPGMA. Para a verificação do ajuste entre a matriz de similaridade e o dendrograma obtido foi calculado o coeficiente de correlação cofenética (r), segundo Sokal & Rohlf (1962). A estabilidade estatística dos agrupamentos foi estimada pela análise de *bootstrap* com 1000 replicações através do programa computacional Winboot (Yap & Nelson 1996).

Através dos valores de H_0 (diversidade genética de cada loco em cada uma das populações) foi estimada a distância euclidiana média entre as quatro populações de *S. frugiperda*. Após o cálculo da matriz de distâncias entre as quatro populações foi construído um dendrograma pelo método de agrupamento UPGMA. Foi obtido o coeficiente de correlação cofenética (r) (Sokal & Rohlf 1962) para verificar o ajuste entre a matriz de dissimilaridade e o dendrograma. A nitidez dos grupos formados pela análise de agrupamento foi estimada a partir de um teste de *bootstrap* com 1000 replicações, por meio do aplicativo computacional Multiv v.2.3 (Pillar 1997). Onde foi estimada a probabilidade da formação de dois, três ou quatro grupos, sendo que o nível de significância utilizado para a determinação de um agrupamento nítido foi de $P \leq 0,01$ (Pillar 1999).

Resultados e Discussão

As cinco combinações de oligonucleotídeos iniciadores utilizadas geraram o total de 241 bandas de DNA, sendo 95,0% polimórficas (229), caracterizando um elevado grau de polimorfismo molecular nas populações estudadas (Tabela 1), evidenciando que os marcadores AFLP foram eficientes na detecção da variabilidade genética presente nas populações, fato também constatado por McMichael & Pashley (1999) na identificação dos biótipos “milho” e “arroz” de *S. frugiperda* nos EUA. O número de bandas geradas por combinação de oligonucleotídeo iniciador variou de 39 a 68, com uma média de 48 bandas (Tabela 1). Dentre as combinações utilizadas, a que apresentou a maior porcentagem de locos polimórficos foi a *M-CTC/E-ACT*, com 98,5% dos locos polimórficos, enquanto que a combinação *M-CTG/E-ACT*, apresentou a menor com 92,3% dos locos polimórficos (Tabela 2).

Os valores da diversidade genética dos locos avaliados (H_0) variaram de 0,29 a 1 sendo igual ou superior a 0,80 em 17,8% dos locos, evidenciando a existência de grande diversidade genética nas populações estudadas e o fato de a frequência do alelo detectado (presença de banda) estar muito próxima de 0,50 em grande parte dos locos avaliados. Para a diversidade genética de cada loco dentro das populações (H_{pop}) os valores variaram de 0,23 a 0,97 sendo igual ou superior a 0,80 em 7,9% dos casos. Em relação à diversidade genética total de cada loco ($H_{espécie}$) os valores variaram de 0,27 a 1 sendo igual ou superior a 0,80 em 14,9% dos casos, mostrando que quando são consideradas as quatro populações como um todo, a frequência do alelo detectado está muito próxima de 0,50 na maioria dos locos. Através da análise individual de cada um dos locos constatou-se que a maior parte da diversidade genética está contida dentro das populações, ou seja, em 66,8% dos locos menos de 5,0% da diversidade genética está contida entre as quatro populações de *S. frugiperda* estudadas (dados não apresentados).

Na Tabela 3, são apresentados os índices médios de diversidade, considerando-se os 241 locos simultaneamente. O valor da diversidade genética total ($H_{espécie}$) foi alto (0,54) estando próximo do valor estimado para a diversidade genética dentro das populações (H_{pop}) de 0,47, evidenciando que as populações apresentam altos índices de diversidade genética, sendo grande parte da diversidade mantida dentro das populações (88,0%) e pouco presente entre as quatro

populações (12,0%). McMichael & Pashley (1999) também constataram que a maior parte da diversidade genética é mantida dentro das populações (76,0%) e que a parte presente entre os biótipos “milho” e “arroz” de *S. frugiperda*, corresponde a 24,0% da diversidade genética. A menor diversidade genética detectada entre as populações utilizadas no presente estudo, provavelmente, está associada ao menor tempo de cultivo simultâneo de milho e arroz no Brasil em relação aos EUA, o que ocasionou um período menor de convívio e conseqüentemente de coevolução entre os insetos e as plantas hospedeiras (milho e arroz).

O dendrograma obtido com base na similaridade genética entre os 40 indivíduos avaliados, gerado a partir dos dados de presença/ausência de bandas de AFLP (Fig. 1), evidenciou a existência de elevada sobreposição entre as populações de *S. frugiperda* estudadas, uma vez que a simples observação do dendrograma não foi capaz de evidenciar alguma tendência de agrupamento. Dos nove agrupamentos que apresentaram valores de *bootstrapping* superiores a 30%, quatro foram formados por insetos de apenas uma população: i) lagartas: A01, A07 e A06; ii) lagartas: A05 e A10; iii) lagartas: D06, D07, D08 e D10; e, iv) lagartas: C01, C04, C06 e C03. O coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,65, evidenciando a existência de um ajuste regular entre a matriz de similaridade e o dendrograma obtido.

Por outro lado o dendrograma gerado com base na distância euclidiana média entre as quatro populações estudadas, obtido a partir dos dados da diversidade genética (H_0) de todos os locos polimórficos (Fig. 2), revelou a formação de dois grupos das populações, de acordo com a planta hospedeira, ressaltando-se a ocorrência de maior diferenciação molecular entre as populações associadas à cultura do milho. O coeficiente de correlação cofenética (r) foi de 0,73, evidenciando a existência de um ajuste regular entre a matriz de similaridade e o dendrograma obtido. Dois grupos foram formados: i) populações: Arroz/Pelotas e Arroz/Uruguaiana, e, ii) populações: Milho/Pelotas e Milho/Santa Rosa.

Os resultados obtidos no presente estudo e em estudos anteriores com populações de *S. frugiperda* (McMichael & Pashley 1999), apontam para a existência de maior similaridade genética entre as populações de uma mesma planta hospedeira, sugerindo que a seleção natural via planta hospedeira foi o processo que orientou as populações no sentido de aumentar o nível de adaptação, fato relatado por

Tabela 2. Bandas consistentes obtidas para cada combinação de oligonucleotídeos iniciadores utilizada na técnica de AFLP. FAEM/UFPel, Pelotas, 2003.

Combinações de oligonucleotídeos iniciadores	Bandas		
	Total	Polimórficas (%)	Monomórficas (%)
MCAG/EACT	42	40 (95,2)	2 (4,8)
MCTC/EACT	68	67 (98,5)	1 (1,5)
MCAC/EACC	42	39 (92,9)	3 (7,1)
MCTG/EACC	50	47 (94,0)	3 (6,0)
MCTG/EACT	39	36 (92,3)	3 (7,7)
Total	241	229 (95,0)	12 (5,0)

Tabela 3. Estimativa dos índices de diversidade: \bar{H}_{pop} (diversidade genética dentro das populações), $\bar{H}_{espécie}$ (diversidade genética total), $\bar{H}_{pop}/\bar{H}_{espécie}$ (proporção da diversidade genética presente dentro das populações) e $(\bar{H}_{espécie} - \bar{H}_{pop})/\bar{H}_{espécie}$ (proporção da diversidade genética presente entre as populações), para as populações de *S. frugiperda*. FAEM/UFPel, Pelotas, 2003.

Parâmetros	Estimativas
\bar{H}_{pop}	0,47
$\bar{H}_{espécie}$	0,54
$\bar{H}_{pop}/\bar{H}_{espécie}$	0,88
$(\bar{H}_{espécie} - \bar{H}_{pop})/\bar{H}_{espécie}$	0,12

Schluter & Nagel (1995) e Kirkpatrick & Ravigné (2002).

A base genética do milho cultivado é bem mais ampla do que a base genética do arroz irrigado. Essa característica pode ter reflexo direto sobre a dieta das lagartas, sugerindo a seguinte relação: quanto maior a base genética da planta hospedeira menor a pressão de seleção do alimento sobre a

população de lagartas e maior a distância genética das populações de lagarta (caso da cultura do milho). O contrário, também pode ser válido para o arroz irrigado. Essa poderia ser uma explicação para a maior distância genética entre as populações das lagartas coletadas no milho. O genoma do milho não exerceria tanta pressão sobre as populações de insetos, por possuir base genética mais ampla decorrente da utilização de híbridos de diferentes companhias, os quais são formados por genomas e grupos heteróticos distintos, aliado ao fato de ser mais polimórfico devido ao sistema de reprodução alógama. Por outro lado, as populações de arroz irrigado, por possuírem base genética menor e sistema de reprodução autógama (menor polimorfismo), exerceriam maior pressão sobre a base genética das populações de insetos, restringindo sua distância genética.

O processo evolutivo está associado à ocorrência de mutação que é a fonte original da variabilidade genética das espécies, tendo como resultado a formação de novos alelos. Posteriormente, a recombinação genética favorecida pela migração dos insetos adultos de *S. frugiperda* a grandes distâncias, que de acordo com Johnson (1987), pode chegar até 250 km, pode suprir a população com novas combinações ampliando a variabilidade genética. Presumindo que os dois

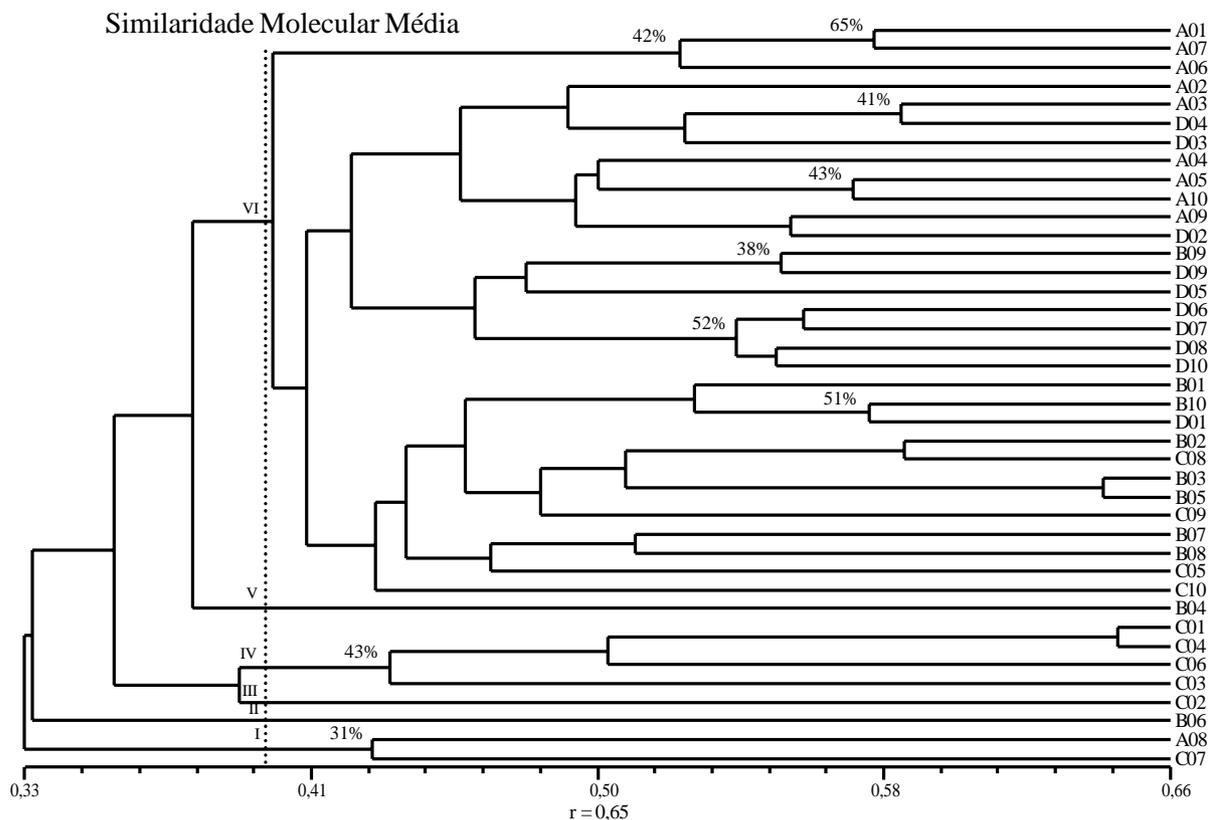


Figura 1. Dendrograma de 40 lagartas das populações de *S. frugiperda* provenientes de áreas isoladas (A - Milho/Santa Rosa e B - Arroz/Uruguaiana) e áreas adjacentes (C - Milho/Pelotas e D - Arroz/Pelotas), no Rio Grande do Sul. Obtido a partir da análise de AFLP utilizando o índice de similaridade de Dice (1945) e o método de agrupamento UPGMA. Os valores em % indicam o número de vezes que os insetos agruparam juntos em 1000 ciclos de análise de *bootstrapping* utilizando o programa Winboot. FAEM/UFPel, Pelotas, 2003.

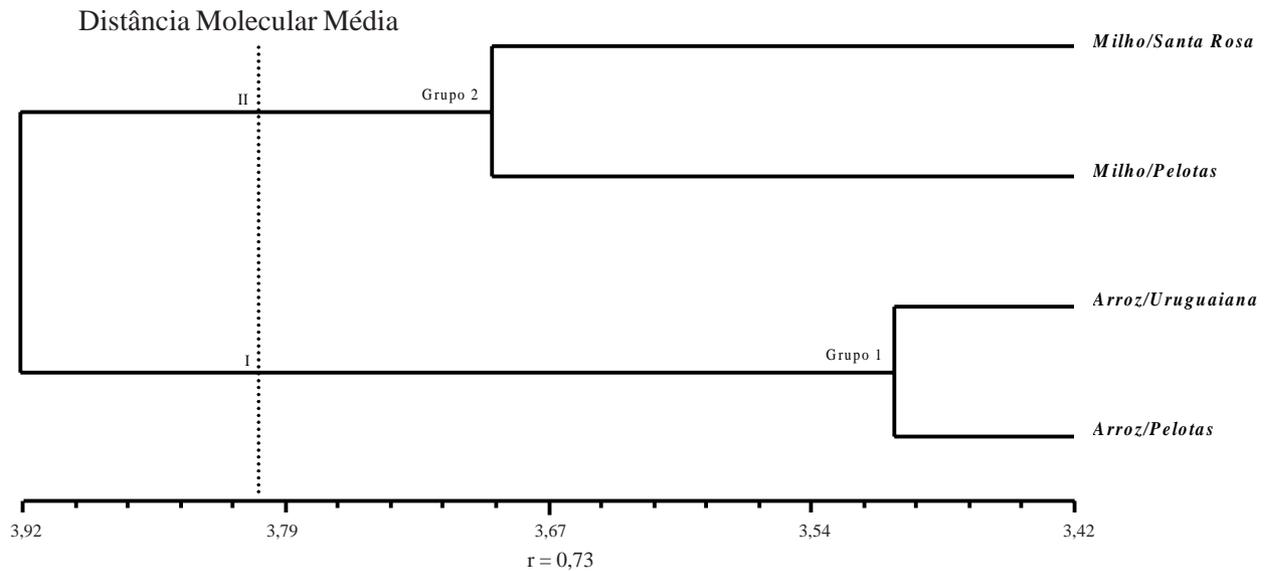


Figura 2. Dendrograma das quatro populações *S. frugiperda* provenientes de áreas isoladas (A - Milho/Santa Rosa e B - Arroz/Uruguaiiana) e áreas adjacentes (C - Milho/Pelotas e D - Arroz/Pelotas), no Rio Grande do Sul. Obtido a partir da distância euclidiana média com base nos valores de (diversidade genética de cada loco em cada uma das quatro populações de *S. frugiperda*), utilizando o método de agrupamento UPGMA. Estão indicados os grupos formados após o teste de nitidez ($P \leq 0,01$) a partir da análise de *bootstrap* com 1000 replicações, com auxílio do programa Multiv v.2.3. FAEM/UFPel, Pelotas, 2003.

eventos ocorram simultaneamente, o processo de seleção natural via planta hospedeira pode ter orientado as populações a um maior nível de adaptação em milho e em arroz irrigado. Desta forma, insetos com características favoráveis à sobrevivência em cada planta hospedeira foram selecionados, aumentando a frequência dos alelos mais adaptados e reduzindo a dos alelos de indivíduos menos adaptados. Em função disso, podem ter surgido os biótipos

“milho” e “arroz” de *S. frugiperda*, com composição genética distinta.

Na Tabela 4, são apresentadas as combinações de oligonucleotídeos iniciadores e os alelos com potencial para diferenciar as populações de *S. frugiperda* associadas ao milho e ao arroz irrigado. Para as combinações M-CAG/E-ACT e M-CTC/E-ACT, foram detectados apenas dois alelos na população “arroz” (8 e 1, respectivamente), enquanto

Tabela 4. Estimativa dos índices de diversidade para os locos que apresentaram maior potencial de diferenciar as populações de *S. frugiperda* provenientes das culturas do milho e arroz irrigado: H_0 (diversidade genética de cada loco em cada população), H_{pop} (diversidade genética média de cada loco nas quatro populações), $H_{espécie}$ (diversidade genética de cada loco nas quatro populações), $H_{pop} / H_{espécie}$ (proporção da diversidade genética presente dentro das populações em cada loco) e $(H_{espécie} - H_{pop}) / H_{espécie}$ (proporção da diversidade genética presente entre as populações em cada loco). FAEM/UFPel, Pelotas, 2003.

Combinação/Loco	H_0				H_{pop}	$H_{espécie}$	$H_{pop} / H_{espécie}$	$(H_{espécie} - H_{pop}) / H_{espécie}$
	M/SR	M/P	A/P	A/U				
M-CAG/E-ACT - 8	0,00	0,00	0,77	1,00	0,44	0,63	0,70	0,30
M-CTC/E-ACT - 1	0,00	0,00	0,32	0,87	0,30	0,40	0,74	0,26
M-CTG/E-ACC - 16	0,77	0,49	0,00	0,00	0,31	0,40	0,79	0,21
M-CTG/E-ACC - 18	0,49	0,64	0,00	0,00	0,28	0,35	0,82	0,18
M-CTG/E-ACC - 42*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,87	0,00	1,00
M-CTG/E-ACC - 44	0,64	0,77	0,00	0,00	0,35	0,44	0,80	0,20
M-CTG/E-ACC - 45	0,00	0,00	0,64	0,87	0,38	0,49	0,78	0,22
M-CTG/E-ACC - 46	0,00	0,00	0,49	0,77	0,31	0,40	0,79	0,21
M-CTG/E-ACC - 47 ^o	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,87	0,00	1,00
M-CTG/E-ACT - 20	0,64	0,49	0,00	0,00	0,28	0,35	0,82	0,18

M/SR: Milho/Santa Rosa; M/P: Milho/Pelotas; A/P: Arroz/Pelotas; A/U: Arroz/Uruguaiiana

* Monomórfico para as populações provenientes da cultura do milho (M/SR e M/P)

^o Monomórfico para as populações provenientes da cultura do arroz irrigado (A/P e A/U)

que para a combinação M-CTG/E-ACT foi detectado apenas o alelo 20 na população “milho”. Já na combinação M-CTG/E-ACC, foram detectados sete alelos: três polimórficos (16, 18 e 44) e um monomórfico (42) presentes apenas na população “milho” (M/SR e M/P); e, dois polimórficos (45 e 46) e um monomórfico (47) presentes apenas na população “arroz” (A/U e A/P). Ressalta-se, que os alelos 42 e 47 (M-CTG/E-ACC) foram capazes de detectar 100% das diferenças genéticas entre as populações associadas ao milho e arroz irrigado. Esses locos podem se tornar possíveis sondas ou iniciadores relacionados a caracteres adaptativos de interesse e/ou de diferenciação dos possíveis biótipos. Futuros estudos deverão ser conduzidos no sentido de eluir os fragmentos de DNA (alelos) para seqüenciamento. O conhecimento da seqüência de bases dos referidos locos permitirá a realização de trabalhos voltados à associação da biologia adaptativa dos biótipos “milho” e “arroz”, com os respectivos genes prospectados.

Diante dos resultados, e considerando os demais estudos fenotípicos e genotípicos, ocorrem no Rio Grande do Sul os biótipos “milho” e “arroz” de *S. frugiperda*. Em futuros estudos, deverá ser analisada a compatibilidade reprodutiva entre os biótipos, a fim de caracterizar se são raças associadas às plantas hospedeiras ou espécies crípticas (Drès & Mallet 2002).

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa ao primeiro autor e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo apoio financeiro.

Literatura Citada

- Adamczyk, J.J., J.W. Holloway, B.R. Leonard & J.B. Graves. 1997.** Susceptibility of fall armyworm collected from different plant hosts to selected insecticides and transgenic Bt cotton. *J. Cot. Sci.* 1:21-28.
- Creste, S., A. Tulmann-Neto & A. Figueira. 2001.** Detection of single sequence repeat polymorphism in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Mol. Biol. Rep.* 19:1-8.
- Dice, L.R. 1945.** Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297-307.
- Drès, M. & J. Mallet. 2002.** Host races in plant-feeding insects and their importance sympatric speciation. *Phil. Trans.: Biol. Sci.* 357: 471-492.
- Edwards, M.L., J.L.H. Mendoza, A.P. Rubio, J.M. Ochoa, R.L. Gutiérrez, J.J. Hamm & B.R. Wiseman. 1999.** Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in Mexico. *Fla. Entomol.* 82: 254-262.
- Grützmaker, A.D., J.F. da S. Martins & U.S. da Cunha. 2000.** Insetos-pragas das culturas do milho e sorgo no agroecossistema de várzea. p.87-102. In J.M.B. Parfitt *Produção de milho e sorgo em várzea*. Pelotas, Embrapa Clima Temperado, 146p.
- Johnson, S.F. 1987.** Migration and the life history strategy of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in the Western Hemisphere. *Insect Sci. Appl.* 8: 543-549.
- Kirkpatrick, M. & V. Ravigné. 2002.** Speciation by natural and sexual selection. *Am. Nat.* 159: 22-35.
- Levy, H.C., A. Garcia-Maruniak & J.E. Maruniak. 2002.** Strain identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) insects and cell line: PCR-RFLP of cytochrome oxidase C subunit I gene. *Fla. Entomol.* 85: 186-190.
- Lewontin, R.C. 1972.** The apportionment of human diversity. *Evol. Biol.* 6: 381-398.
- Lu, Y. & M.J. Adang. 1996.** Distinguishing fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) strains using a diagnostic mitochondrial DNA marker. *Fla. Entomol.* 79: 48-55.
- Lu, Y., M.J. Adang, D.J. Eisenhour & G.D. Kochert. 1992.** RFLP analysis of genetic variation North America populations of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Mol. Ecology* 1: 199-208.
- Martins, J.F.S. da, U.S. da Cunha, J.V. de Oliveira & H.F. Prado. 2000.** Controle de insetos na cultura do arroz irrigado. p.137-154. In J.C. Guedes, I.D. Costa & E. Castiglioni. *Bases e técnicas do manejo de insetos*. Santa Maria, UFSM/CCR/DFS, 248p.
- McMichael, M. & D.P. Pashley. 1999.** Differences in amplified fragment-length polymorphisms in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 92: 175-181.
- Pashley, D.P. 1986.** Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex? *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79: 898-904.
- Pashley, D.P. 1988.** Quantitative genetics, development, and physiological adaptation in host strains of fall armyworm. *Evolution* 42: 93-102.
- Pashley, D.P. 1993.** Causes of host-associated variation in insect herbivores: An example from fall armyworm, p. 351-359. In K.C. Kim & B.A. McPherson (eds.) *Evolution of insect pests: Patterns of variation*. John Wiley & Sons, New York, 496p.
- Pashley, D.P. & J.A. Martin. 1987.** Reproductive incompatibility between host strains of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 80: 731-733.
- Pashley, D.P., S.J. Johnson & A.N. Sparks. 1985.** Genetic

- population of migratory moths: The fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 78: 756-762.
- Pashley, D.P., S.S. Quisenberry & T. Jamjanya. 1987a.** Impact of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains on the evaluation of bermuda grass resistance. *J. Econ. Entomol.* 80: 1127-1130.
- Pashley, D.P., T.C. Sparks, S.S. Quisenberry, T. Jamjanya & P.F. Dowd. 1987b.** Two fall armyworm strains feed on corn, rice and bermuda grass. *Louis. Agric.* 30: 8-9.
- Pillar, V.P. 1997.** Multivariate exploratory analysis and randomization testing using Multiv. *Colnoses* 12: 145-148.
- Pillar, V.P. 1999.** How sharp are classifications? *Ecology* 80: 2508-2516.
- Porto, M.P., S.D.A. Silva, E.I.G. Winkler, C.A.S. Silva & J.M.B. Parfitt. 1998.** Milho em várzeas de clima temperado na região sul do Brasil: Cultivares e manejo de solo e água. Pelotas, Embrapa-CPACT, 31p. (Circular Técnica, 6).
- Rohlf, F.J. 1989.** NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York, Exeter Publishing Co. Ltda.
- Saghai-Marooif, M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen & R.W. Allard. 1984.** Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 1477-1481.
- Schluter, D. & L.M. Nagel. 1995.** Parallel speciation by natural selection. *Am. Nat.* 146: 292-301.
- Sokal, R.R. & F.J. Rohlf. 1962.** The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon* 11: 30-40.
- Takami, Y., C. Koshio, M. Ishii, H. Fugii, T. Hidaka & I. Shimizu. 2004.** Genetic diversity and structure of urban populations of *Pieris* butterflies assessed using amplified fragment length polymorphism. *Mol. Ecol.* 13: 245-258.
- Vekemans, X., T. Beauwens, M. Lemaire & I. Roldán-Ruiz. 2002.** Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Mol. Ecol.* 11: 139-151.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T.V. de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper & M. Zabeau. 1995.** AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Whitford, F., S.S. Quisenberry, T.J. Riley & J.W. Lee. 1988.** Oviposition preference, mating compatibility, and development of two fall armyworm strains. *Fla. Entomol.* 71: 234-243.
- Yan, G., J. Romero-Severson, M. Walton, D.D. Chadee & D.W. Severson. 1999.** Population genetics of the yellow fever mosquito in Trinidad: Comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Mol. Ecol.* 8: 951-963.
- Yap, I.V. & R.J. Nelson. 1996.** Winboot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. Manila, IRRI, 22p.

Received 10/08/04. Accepted 24/09/04.
