

Notas Científicas

Diversidade molecular entre populações de *Spodoptera frugiperda* no Brasil avaliada por marcadores AFLP

Carolina Custódio Pinto⁽¹⁾, Anderson Dionei Grützmacher⁽¹⁾, Ana Paula Schneid Afonso da Rosa⁽²⁾, Roberta Manica-Berto⁽¹⁾, Simone Martins Mendes⁽³⁾, Luis Willian Pacheco Arge⁽¹⁾ e Carolina Terra Borges⁽¹⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Campus Universitário, s/nº, CEP 96010-900 Pelotas, RS, Brasil. E-mail: krolyna_21@yahoo.com.br, adgrutzm@ufpel.edu.br, robertamanica@yahoo.com.br, l.willianpacheco@yahoo.com.br, carol_tborges@hotmail.com ⁽²⁾Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Terras Baixas, Caixa Postal 403, CEP 96001-970 Pelotas, RS, Brasil. E-mail: ana.afonso@embrapa.br ⁽³⁾Embrapa Milho e Sorgo, Caixa Postal 151, CEP 35701-970, Rodovia MG-424, Km 45, Sete Lagoas, MG, Brasil. E-mail: simone.mendes@embrapa.br

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade molecular, por meio de marcadores AFLP, de seis populações de *Spodoptera frugiperda* coletadas na cultura do milho, em diferentes regiões geográficas do Brasil. O DNA foi extraído de lagartas de quarto instar, e as reações de AFLP foram realizadas com sete combinações de oligonucleotídeos iniciadores. A partir das seis populações de *S. frugiperda* estudadas, foi identificado um grupo principal formado por três populações geneticamente mais relacionadas. As populações de *S. frugiperda* analisadas mostram alta variabilidade genética, com máximo de 58% de similaridade.

Termos para indexação: biótipo, distância genética, lagarta-do-cartucho, marcadores moleculares.

Molecular diversity among populations of *Spodoptera frugiperda* in Brazil evaluated by AFLP markers

Abstract – The objective of this work was to evaluate the molecular diversity, by AFLP markers, of six *Spodoptera frugiperda* populations collected in maize crops in different geographical regions of Brazil. DNA was extracted from fourth-instar larvae, and AFLP reactions were performed with seven oligonucleotide primer combinations. From the six studied *S. frugiperda* populations, a major group was identified, formed by three more genetically-related populations. The evaluated *S. frugiperda* populations show high genetic variability, with a maximum of 58% similarity.

Index terms: biotype, genetic distance, fall armyworm, molecular markers.

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é praga-chave da cultura do milho no Brasil (Cruz, 2008). A espécie tem hábito alimentar polífago, com uma variedade de hospedeiros, principalmente milho, arroz e algodão (Busato et al., 2004; Martinelli et al., 2006). Também apresenta grande capacidade de dispersão e rápida disseminação nas plantas hospedeiras, o que determina a complexidade dos seus padrões genéticos e migratórios (Nagoshi & Meagher, 2008).

Para desenvolver práticas de manejo eficientes desse inseto-praga, torna-se necessário compreender a diversidade genética existente nas populações e o potencial de desenvolvimento de novas populações (Martinelli et al., 2006). Por essas razões, a caracterização molecular de indivíduos dessa espécie

é essencial na compreensão de fluxos gênicos e derivas genéticas. Nesse contexto, o uso de marcadores moleculares tem se mostrado como ferramenta eficiente para caracterizar populações, uma vez que certos marcadores apresentam baixa interferência ambiental, alta taxa de reprodutibilidade e ampla distribuição nos genomas (Borém & Caixeta, 2009). Em relação a *S. frugiperda*, estudos de caracterização molecular são raros e não há disponibilidade de marcadores específicos para a espécie. Portanto, devem-se utilizar marcadores que não requeiram conhecimento prévio sobre o genoma. Entre estes, o "amplified fragment length polymorphism" (AFLP) possibilita caracterizar biótipos e detectar a variabilidade genética de *S. frugiperda* (Busato et al., 2004; Clark et al., 2007; Martinelli et al., 2007; Belay et al., 2012), por ser

multilocos, com alta cobertura sobre o genoma, e por apresentar excelente reprodutibilidade.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade molecular, por meio de marcadores AFLP, de seis populações de *S. frugiperda* coletadas na cultura do milho, em diferentes regiões geográficas do Brasil.

O DNA foi extraído de cinco lagartas de quarto instar de populações coletadas na cultura do milho (*Zea mays* L.), em seis regiões geográficas do Brasil. As populações foram coletadas em: Pelotas, RS (31°38'12"S, 52°28'15.1"W, a 135 m de altitude); Vacaria, RS (28°30'23"S, 50°53'04"W, a 961 m de altitude); Inhaúma, MG (19°28'48"S, 44°23'41"W, a 753 m de altitude); e Varjão de Minas, MG (18°23'32"S, 46°01'59"W, a 956 m de altitude); Morrinhos, GO (17°47'58"S, 49°10'40"W, a 827 m de altitude); Brasília, DF (15°44'51"S, 47°54'49"W, a 1.069 m de altitude). As lagartas foram mantidas no Laboratório de Manejo Integrado de Pragas da Universidade Federal de Pelotas, no Município de Capão do Leão, RS, em sala climatizada a 25±1°C, com umidade relativa de 70±10% e fotofase de 14 horas. As lagartas foram alimentadas com dieta artificial de acordo com Greene et al. (1976), e a criação seguiu o método descrito por Parra (2001).

Para a extração de DNA, foi utilizado o protocolo fornecido pelo kit Dneasy Blood & Tissue (Qiagen, Valencia, CA, EUA). A quantificação do DNA das amostras foi feita em espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, Piscataway, NJ, EUA). As reações de AFLP foram realizadas por meio do kit AFLP Analysis System I, de acordo com o protocolo do fabricante (Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo, SP). Para isso, 125 ng de DNA genômico de cada amostra foram submetidos à digestão com enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI* e ligação de oligonucleotídeos adaptadores. Foram usados os seguintes adaptadores:

EcoRI-A1 (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'), *EcoRI*-A2 (5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'), *MseI*-A1 (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3') e *MseI*-A2 (5'-TACTCAGGACTCAT-3'). O DNA foi amplificado por meio de sete combinações de oligonucleotídeos iniciadores:

EcoRI+AC/*MseI*+CAC, *EcoRI*+AC/*MseI*+CTC, *EcoRI*+AC/*MseI*+CAT, *EcoRI*+AC/*MseI*+CAG, *EcoRI*+AC/*MseI*+CTA, *EcoRI*+AC/*MseI*+CTT

e *EcoRI*+AC/*MseI*+CTG. Os fragmentos foram visualizados em gel desnaturante de poliacrilamida (6%) e corados com nitrato de prata, como descrito por Creste et al. (2001). A separação dos fragmentos foi realizada em eletroforese por 2 horas, a 60 W.

A diversidade gênica foi estimada por combinação do oligonucleotídeo inicializador, pela seguinte equação: $D = 1/n \sum \pi_i^2$, em que n é o número de locos polimórficos avaliados; e π_i é a frequência alélica por indivíduo (Shete, 2003). Para a análise dos dados, utilizou-se o sistema binário, em que foi identificada a presença ou a ausência de bandas, representada pelos números 1 e 0, respectivamente. A partir dessa matriz de dados e com uso do coeficiente de Jaccard, para análise de similaridade genética entre as populações de *S. frugiperda*, foi gerada a matriz de similaridade. Posteriormente, a partir dos dados de similaridade, foi realizada a análise de agrupamento no módulo "sequential, agglomerative, hierarchical and nested clustering" (SAHN), com auxílio do programa NTSYS-pc (Rohlf, 2000), por meio do método "unweighted pair group method using arithmetic averages" (UPGMA). O dendrograma de similaridade entre as populações foi construído conforme Hair Jr et al. (2009). Para verificar a consistência dos agrupamentos gerados no dendrograma, foi construída a matriz de distância cofenética. Em seguida, a matriz de similaridade original foi correlacionada à matriz de distância cofenética, com uso do módulo "matrix comparison-graphics" (MXCOMP) do mesmo programa, para mensurar a qualidade do ajuste da análise de agrupamento e obter o coeficiente de correlação cofenética (r), calculado com o teste de Mantel com 1.000 permutações. A estabilidade estatística dos agrupamentos foi estimada pela análise de "bootstrap" com 1.000 repetições, por meio do programa computacional Winboot, versão 1.0 (Yap & Nelson, 1996).

As sete combinações de oligonucleotídeos iniciadores utilizadas geraram 130 bandas de DNA, das quais 90,8% foram polimórficas (118 bandas). Entre essas combinações de iniciadores, apenas a combinação *EcoRI*+AC/*MseI*+CTC apresentou bandas monomórficas (12), num total de 30,8%. Todas as demais, *EcoRI*+AC/*MseI*+CAC (27), *EcoRI*+AC/*MseI*+CAT (8), *EcoRI*+AC/*MseI*+CAG (14), *EcoRI*+AC/*MseI*+CTA (11), *EcoRI*+AC/*MseI*+CTT (14) e *EcoRI*+AC/*MseI*+CTG (17) foram 100%

polimórficas. Esses dados caracterizaram elevado grau de polimorfismo molecular nas populações estudadas, o que evidencia que os marcadores AFLP foram eficientes na detecção da variabilidade presente nas populações.

Os valores de diversidade gênica das combinações de oligonucleotídeos iniciadores variaram de 0,02 a 0,22, com média de 0,10 entre as sete combinações avaliadas nas seis populações de *S. frugiperda*. As combinações *EcoRI*+AC/*MseI*+CAC, *EcoRI*+AC/*MseI*+CTC, *EcoRI*+AC/*MseI*+CAT, *EcoRI*+AC/*MseI*+CAG, *EcoRI*+AC/*MseI*+CTA, *EcoRI*+AC/*MseI*+CTT e *EcoRI*+AC/*MseI*+CTG obtiveram 0,22, 0,17, 0,10, 0,02, 0,11, 0,07 e 0,05, respectivamente, como valores de diversidade gênica. Essa diversidade foi eficaz em diferenciar as populações avaliadas.

O coeficiente de correlação cofenética (r) obtido foi de 0,98, o que indica a consistência dos agrupamentos gerados no dendrograma. Com o ponto de corte em torno de 0,29 de similaridade, obteve-se a formação de um grupo principal, pelas populações de Morrinhos, GO; Vacaria, RS; e Varjão de Minas, MG. As demais populações não foram agrupadas em nenhum grupo, o que mostra que são mais distantes geneticamente (Figura 1).

No grupo principal, ocorreu a formação de dois subgrupos com similaridade genética mais próxima: um formado pelas populações de Morrinhos, GO, e Vacaria, RS; e o outro, pela de Varjão de Minas, MG. A população de Brasília, DF, foi a que evidenciou maior distância genética entre todas as populações estudadas.

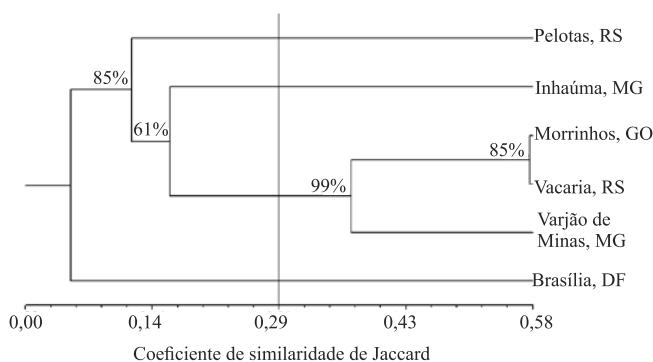


Figura 1. Dendrograma, com base em agrupamento UPGMA, do coeficiente de similaridade de Jaccard, de seis populações de *Spodoptera frugiperda*. Os valores em percentual indicam o número de vezes que os insetos foram agrupados juntos em 1.000 ciclos de análise de "bootstrap".

Contudo, as populações de Morrinhos, GO, e Vacaria, RS, apresentaram maior similaridade entre si, de 58%. A maior similaridade era esperada entre as populações de Vacaria e Pelotas, ambas do RS. No entanto, neste Estado, foram detectados os biótipos "arroz" e "milho" de *S. frugiperda* (Busato et al., 2004), o que justifica a distância genética apresentada entre Vacaria e Pelotas, RS, com similaridade inferior a 14%.

Foi observada alta variabilidade entre as populações de *S. frugiperda*, com apenas 58% de similaridade. Resultados semelhantes foram relatados por Clark et al. (2007), entre 23 populações advindas do México, do Brasil, dos Estados Unidos e da Argentina. Os autores, ao utilizar marcadores AFLP, verificaram que há grande variabilidade genética entre os organismos avaliados, e que a maior similaridade obtida foi de 73%, entre as populações do México (Jalisco) e da Argentina (Chaco). Nas demais populações, a similaridade genética foi, em média, de 44%, valor próximo ao encontrado no presente trabalho.

Resultado similar também foi obtido por Martinelli et al. (2006), ao analisar a diversidade genética de dez populações de *S. frugiperda* coletadas em milho e algodão, com uso de marcadores RAPD, em que a maior similaridade encontrada foi de 38,5% entre as populações de cultivos de milho no Mato Grosso e no Mato Grosso do Sul. Na sequência, Martinelli et al. (2007) obtiveram similaridade genética média de 45% entre as populações estudadas, ao utilizar marcadores AFLP. Estes autores concluíram que, entre todas as populações, BR5 (algodão) e BR7 (milho) foram as mais semelhantes; porém, não foi detectada a ocorrência de biótipos entre essas culturas. Este resultado foi atribuído à sobreposição espacial e temporal das culturas de milho e algodão, em algumas regiões do Brasil. Essa sobreposição não ocorreu no presente trabalho, em razão da presença de biótipos "milho" e "arroz" (Busato et al., 2004), caracterizados pela similaridade inferior a 14% entre Vacaria, RS, e Pelotas, RS (Figura 1).

A partir das seis populações de *S. frugiperda* avaliadas, foi identificado um grupo principal formado pelas três populações mais geneticamente relacionadas: de Morrinhos, GO; de Vacaria, RS; e de Varjão de Minas, MG. As populações de *S. frugiperda* analisadas mostram alta variabilidade genética no Brasil, com máximo de 58% de similaridade entre Morrinhos, GO, e Vacaria, RS.

Referências

- BELAY, D.K.; CLARK, P.L.; SKODA, S.R.; ISENHOUR, D.J.; MOLINA-OCHOA, J.; GIANNI, C.; FOSTER, J.E. Spatial genetic variation among *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) sampled from the United States, Puerto Rico, Panama, and Argentina. **Annals of the Entomological Society of America**, v.105, p.359-367, 2012. DOI: 10.1603/AN11111.
- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. (Ed.). **Marcadores moleculares**. 2.ed. Viçosa: Ed. UFV, 2009. 532p.
- BUSATO, G.R.; GRÜTZMACHER, A.D.; OLIVEIRA, A.C. de; VIEIRA, E.A.; ZIMMER, P.D.; KOPP, M.M.; BANDEIRA, J. de M.; MAGALHÃES, T.R. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas do milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v.33, p.709-716, 2004. DOI: 10.1590/S1519-566X2004000600008.
- CLARK, P.L.; MOLINA-OCHOA, J.; MARTINELLI, S.; SKODA, S.R.; ISENHOUR, D.J.; LEE, D.J.; KRUMM, J.T.; FOSTER, J.E. Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in the Western Hemisphere. **Journal of Insect Science**, v.7, article 5, 2007. DOI: 10.1673/031.007.0501.
- CRESTE, S.; TULMANN NETO, A.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. **Plant Molecular Biology Reporter**, v.19, p.299-306, 2001. DOI: 10.1007/BF02772828.
- CRUZ, I. (Ed.). **Manual de identificação de pragas do milho e de seus principais agentes de controle biológico**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. 192p.
- GREENE, G.L.; LEPLA N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, v.69, p.488-497, 1976. DOI: 10.1093/jee/69.4.487.
- HAIR JR, J.F.; BLACK, W.C.; BABIN, B.J.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L. **Análise multivariada de dados**. 6.ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 688p.
- MARTINELLI, S.; BARATA, R.M.; ZUCCHI, M.I.; SILVA-FILHO, M. de C.; OMOTO, C. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v.99, p.516-526, 2006. DOI: 10.1093/jee/99.2.519.
- MARTINELLI, S.; CLARK, P.L.; ZUCCHI, M.I.; SILVA-FILHO, M.C.; FOSTER, J.E.; OMOTO, C. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. **Bulletin of Entomological Research**, v.97, p.225-231, 2007. DOI: 10.1017/S0007485307004944.
- NAGOSHI, R.N.; MEAGHER, R.L. Review of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) genetic complexity and migration. **Florida Entomologist**, v.91, p.546-554, 2008. DOI: 10.1653/0015-4040-91.4.546.
- PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: ESALQ: FEALQ, 2001.134p.
- ROHLF, F.J. **NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: Applied Biostatistics, 2000. 38p.
- SHETE, S. Uniformly minimum variance unbiased estimation of gene diversity. **Journal of Heredity**, v.94, p.421-424, 2003. DOI: 10.1093/jhered/esh078.
- YAP, I.V.; NELSON, R.J. **Winboot: a program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms**. Manila: International Rice Research Institute, 1996. 22p. (IRRI. Discussion Paper Series, 14).

Recebido em 7 de agosto de 2014 e aprovado em 18 de março de 2015