

# Avaliação de similaridade e estruturação genética em *Spodoptera frugiperda* através de marcadores moleculares de microssatélites

Silvério, J. M. M.<sup>1</sup>; Husch, P. E.2; Ferreira, D. G.<sup>3</sup> Sosa-Gómez, D.R.<sup>4</sup>,

<sup>1</sup>Universidade Norte do Paraná, Bolsista CNPQ/PIBIC; <sup>2</sup>Universidade Federal do Paraná; <sup>3</sup>Universidade

Estadual de Londrina, <sup>4</sup>Embrapa Soja | [jessika.silverio@colaborador.embrapa.br](mailto:jessika.silverio@colaborador.embrapa.br)

## Introdução

A lagarta-do-cartucho-do-milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) é uma das principais pragas da cultura do milho, mas pode ocasionar danos também em outras culturas (BOREGAS et al., 2013). Ocasionalmente, causa danos em soja atuando como lagarta cortadeira ou destruindo vagens (SOSA-GÓMEZ et al., 2014). Este inseto ocorre em todo o continente americano, causando consideráveis prejuízos econômicos, de modo que para o manejo adequado desta praga é interessante entender aspectos relacionados a migração, diversidade genética e potencial de desenvolvimento (ARIAS et al., 2011).

O avanço da biologia molecular, a descoberta da reação em cadeia da polimerase (PCR) e o uso de marcadores moleculares de DNA, tais como microssatélites, possibilitaram a identificação de polimorfismos em genomas animais, revolucionando o monitoramento e a caracterização genética de suas populações (SILVA, 2007). Microssatélites são sequências simples repetidas, geralmente de um a seis nucleotídeos dispostos em tandem em regiões não-codificantes do DNA, os quais possuem a vantagem de serem codominantes, multi-alelicos e amplamente distribuídos no genoma, o que pode proporcionar resolução adequada para estudos de variabilidade intraespecífica (OLIVEIRA et al., 2006). A obtenção destes marcadores envolve a amplificação de *loci* de SSRs via PCR (Polimerase Chain Reaction) utilizando iniciadores específicos (geralmente de 20 a 25 pb) para as regiões de DNA que flanqueiam os SSRs (FALEIRO, 2007).

Embora o uso de microssatélites como marcadores em Lepidópteros seja complexo, principalmente devido à ocorrência de locus com múltiplas cópias no genoma e regiões flangeadoras semelhantes entre diferentes locus, estudos têm demonstrado um grande potencial para estas ferramentas na obtenção de conhecimentos genéticos sobre a população de espécies de Lepidópteros (ZHANG, 2004). Deste modo, o presente estudo empregou microssatélites na análise genética de populações de *S. frugiperda*, buscando avaliar níveis de similaridade genética, estrutura genética e fluxo gênico desta espécie ao longo de regiões produtoras de soja do Sul do Brasil.

## Material e métodos

A análise molecular de microssatélites foi realizada utilizando 95 amostras de DNA de *S. frugiperda* coletadas na safra 2010/2011 (Tabela 1), extraídas no ano de 2012.

O programa touchdown PCR foi utilizado para amplificação no termociclador Veriti® Thermal Cyclor, em um volume total de 15 microlitros, sendo 3  $\mu$ L de amostra de DNA diluídos em uma concentração de (2ng/ $\mu$ L) e 12  $\mu$ L de mix [1,5  $\mu$ L de tampão (10x), 2,0  $\mu$ L de BSA, 0,45  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50MM), 0,80  $\mu$ L de dNTP's (2,5

MM], 1,5  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (2 $\mu\text{M}$ ) (Stv\_Spf670-F e Stv\_Spf670-R; Stv\_Spf00997-F e Stv\_Spf00997-R; Stv\_Spf00789-F e Stv\_Spf00789-R; Stv\_Spf01592-F e Stv\_Spf01592-R; Stv\_Spf01706-F e Stv\_Spf01706-R; Stv\_Spf00918-F e Stv\_Spf00918-R; Stv\_Spf00343-F e Stv\_Spf00343-R; Stv\_Spf00658-F e Stv\_Spf00658-R; Stv\_Spf00544-F e Stv\_Spf00544-R, ver Arias et al., 2011 ), 0,2  $\mu\text{L}$  Taq Polimerase (SU/ $\mu\text{L}$ ) e 4,05  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli Q.

A separação dos fragmentos de microssatélite foi realizada em géis de poliacrilamida, na parte inferior do gel foi utilizado 8,9 ml de poliacrilamida (40% 29:1), 3,3 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, 4,2 ml de TRIS HCL (1,5 m pH 8,8), 15,8  $\mu\text{L}$  de TEMED e 63,8  $\mu\text{L}$  de persulfato de amônia. Para a segunda parte do gel foi adicionado 0,6 ml de poliacrilamida (40%, 29:1), 2,04 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, 0,98 ml de TRIS HCL (0,5 m pH 6,8), 4  $\mu\text{L}$  de TEMED 30  $\mu\text{L}$  de persulfato de amônia. Foi acrescentado, 2  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra (40% sacarose) em cada amostra e também foi utilizado em todos os géis, para comparar 2 $\mu\text{g}$  de marcador de peso molecular de 100 pb DNA ladder (Invitrogen, SP). A eletroforese foi realizada durante sete horas, após a qual o gel foi corado por 10 minutos em brometo de etídio e lavado em água pelo mesmo tempo para retirar seu excesso. A digitalização da imagem foi realizada no sistema de fotodocumentação, com uso de luz ultravioleta (Loccus biotecnologia, L-PIX EX). As imagens foram processadas e os dados analisados mediante os programas TFGPA (<http://www.marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>) utilizando o método de UPGMA (Unweighted Pair-group Method Arithmetic Averages) e o índice de Nei 1972. A diversidade genética foi estimada a partir do programa POPGEN v. 1.31 (YEH et al. 1997), utilizando o cálculo da heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ), número de alelos por *locus* ( $N_A$ ) e número de alelos efetivos ( $N_e$ ). A estrutura genética foi estimada a partir da análise da variância molecular (AMOVA) e do índice  $\Phi_{ST}$  par a par, usando o programa Arlequin 3.11 (EXCOFFIER et al., 2005). O fluxo gênico foi estimado a partir do programa BayesAss 1.3 (WILSON & RANNALA, 2003).

## Resultados e discussão

Os níveis de diversidade genética obtidos entre as populações de *S. frugiperda* do presente estudo,  $H_E$  variando de 0,506 na Pop1 (Vacaria, RS) a 0,630 na Pop6 (Maringá, PR) e  $N_A$  variando de 2,111, Pop1 (Vacaria, RS) a 4,889 na Pop3 (Goioerê, PR), foram abaixo dos valores anteriormente reportados para a espécie em outras regiões do Brasil,  $H_E = 0,742$  e  $N_A = 10,8$  (PAVINATO et al., 2013) ou outras espécies do gênero no continente africano,  $HE = 0,782$  e  $N_A = 12,6$  (IBRAHIM et al., 2004).

A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou que a maior parte da variação genética das amostras de *S. frugiperda* aqui estudadas encontra-se dentro de populações (89,96%). Contudo, esta análise também indicou uma parcela significativa (valor de  $P < 0,05$ ) de variação entre as populações (10,04%). Do mesmo modo, os resultados significativos de  $\Phi_{ST}$  par a par indicaram níveis de diferenciação genética que variaram (segundo Wright) de baixa ( $\Phi_{ST} < 0,05$ ) a alta ( $\Phi_{ST} > 0,15$ ), com o menor valor entre Campo Mourão e Maringá, PR ( $\Phi_{ST} = 0,002$ ) e o maior entre Vacaria e Goioerê ( $\Phi_{ST} = 0,249$ ) (Tabela 2).

A análise bayesiana de fluxo gênico apresentou poucos valores significativos de migrações entre as populações estudadas (Tabela 3). A maioria das populações apresenta constituição genética determinada por não migrantes ou amostras não incluídas nesta análise. Contudo, de modo distinto, as populações de Campo Mourão e Maringá apresentaram uma grande proporção de migrantes provenientes da população de Goioerê, 14,9% e 18,3%. Do mesmo modo, a população de Telêmaco Borba apresentou importantes contribuições dentro da População de Maringá (7%) e da População de Candido Mota (6%). Estes resultados, juntamente com o padrão observado na análise de estruturação genética ( $\Phi_{ST}$  par a par), corroboram o dendrograma de similaridade obtido a partir a distância genética de Nei (Nei, 1972), onde são formados três grupos, um englobando as populações Goioerê, Campo Mourão, e Maringá, outro englobando Warta, Telêmaco Borba e Candido Mota e a população de Vacaria, RS mais afastada (Figura 1).

## Conclusão

Os valores de  $\Phi_{ST}$  (análogo de  $F_{ST}$ ) indicam que ocorre reduzida estruturação das populações de *S. frugiperda* da região central do Paraná. As populações provenientes de Vacaria, RS foram as que tiveram maior diferenciação genética quando comparadas com as populações do Paraná. Os índices de fluxo gênico indicam migração na região central do Paraná.

## Referências

- ARIAS, R. S.; BLANCO, C. A.; PORTILLA, M.; SNODGRASS, G. L.; SCHEFFLER, B. E. First microsatellites from *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and their potential use for population genetics. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, n. 3, p. 576-587, 2011.
- BOREGAS, K. G. B.; MENDES, S. M.; WAQUIL, J. M.; FERNANDES, G. W. Estádio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Bragantia**, v. 72, n. 1, p. 61-70, 2013.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 1, p. 47-50, 2005.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.
- IBRAHIM, K. M.; YASSIN, Y.; ELGUZOULI, A. Polymerase chain reaction primers for polymorphic microsatellite loci in the African armyworm, *Spodoptera exempta* (Lepidoptera: Noctuidae). **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 653-655, 2004.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

PAVINATO, V. A.; MARTINELLI, S.; LIMA, P. F. de, ZUCCHI, M. I.; OMOTO, C. Microsatellite markers for genetic studies of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 1, p. 370-380, 2012.

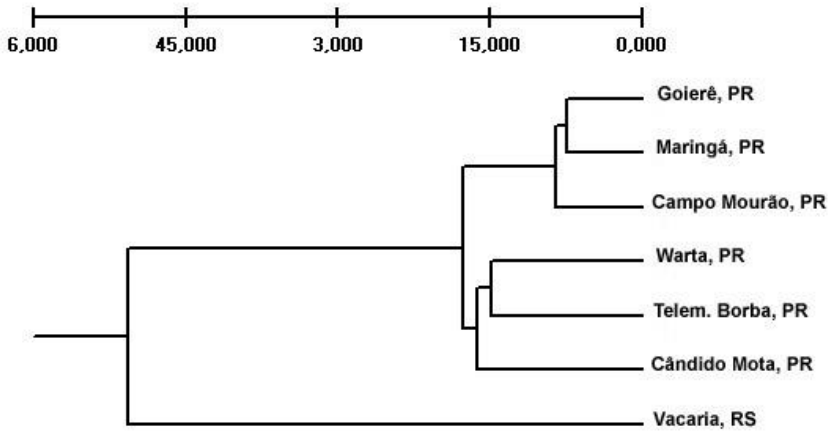
SILVA, P. V. C. **Caracterização genética de javalis por meio de marcadores microssatélites**. 2007. 46f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; CÔRREA-FERREIRA, B. S.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; CORSO, I. C.; OLIVEIRA, L. J.; MOSCARDI, F.; PANIZZI, A. R.; BUENO, A. de F.; HIROSE, E.; ROGGIA, S. **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja**. 3. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2014. 100 p. (Embrapa Soja. Documentos, 269).

WILSON, G. A.; RANNALA, B. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. **Genetics**, v.163, p. 1177-1191, 2003.

YEH, F.C.; BOYLE, T.J.B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. **Belgian Journal of Botany**, v.129, p.157, 1997.

ZHANG, D. Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 19, n. 10, p. 5607-509, 2004.



**Figura.1** Dendrograma obtido por UPGMAS e distância de Nei1972 das populações de *Spodoptera frugiperda* estudadas com marcadores de microssatélites.

**Tabela 1.** Dados das populações geográficas de *Spodoptera frugiperda*.

Localidade	Data de coleta	GPS	Cultura
Vacaria – RS	Safra 2010/2011	-	-
Warta – PR	Safra 2010/2011	S 23°11'41,3 WO 51°10'54,7"	Milho
Goioerê – PR	Safra 2010/2011	S 24°11'24,5" WO 52°59'29,6"	Milho
Campo Mourão – PR	Safra 2010/2011	S 24°03'26,5" WO 52°31'50,3"	Milho
Telêmaco Borba - PR	Safra 2010/2011	S 24°23'06,1" WO 50°41'35,8"	Milho
Maringá - PR	Safra 2010/2011	S 23°30'21,3" WO 52°00'55,2"	Milho
Cândido Mota – SP	Safra 2010/2011	S 22°43'04,5" WO 60°18'47,4"	Milho

**Tabela 2.** Valores de FSTs das populações de *S. frugiperda*.

	Vacaria	Warta	Goioerê	Campo Mourão	Telêmaco Borba	Maringá	Cândido Mota
<b>Vacaria</b>	0.00000						
<b>Warta</b>	0.09616	0.00000					
<b>Goioerê</b>	0.24956	0.08322	0.00000				
<b>Campo Mourão</b>	0.18600	0.07107	0.04858	0.00000			
<b>Telêmaco Borba</b>	0.16642	0.08564	0.17051	0.06844	0.00000		
<b>Maringá</b>	0.18532	0.08969	0.01102	0.00272	0.10643	0.00000	
<b>Cândido Mota</b>	0.14333	0.11252	0.16472	0.11962	0.10545	0.11053	0.00000

**Tabela 3.** Fluxo gênico estimado a partir de uma análise bayesiana, utilizando o programa BayesAss. Porcentagem de migrantes e não migrantes dentro de cada uma das sete populações estudadas. Vacaria = Pop1, Warta = Pop2, Goioerê = Pop3, Campo Mourão = Pop4, Telêmaco Borba = Pop5, Maringá = Pop6 e Cândido Mota = Pop7.

Nº não migrantes (95% IC)						
Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	Pop5	Pop6	Pop7
0,900	0,967	0,922	0,693	0,962	0,688	0,893
(0,689-	(0,888-	(0,824-	(0,667-	(0,873-	(0,667-	(0,670-
0,996)	0,999)	0,989)	0,767)	0,999)	0,742)	0,999)



N° migrantes (95% IC)						
Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	Pop5	Pop6	Pop7
<b>Pop2</b> – 0,021	<b>Pop1</b> – 0,005	<b>Pop1</b> – 0,008	<b>Pop1</b> – 0,012	<b>Pop1</b> – 0,006	<b>Pop1</b> – 0,010	<b>Pop1</b> – 0,007
(4,50 <sup>-8</sup> – 0,125)	(4,90 <sup>-9</sup> – 0,031)	(5,58 <sup>-7</sup> – 0,043)	(2,94 <sup>-5</sup> – 0,053)	(1,30 <sup>-8</sup> – 0,039)	(2,74 <sup>-5</sup> – 0,045)	(2,50 <sup>-8</sup> – 0,038)
<b>Pop3</b> – 0,021	<b>Pop3</b> – 0,009	<b>Pop2</b> – 0,037	<b>Pop2</b> – 0,023	<b>Pop2</b> – 0,006	<b>Pop2</b> – 0,014	<b>Pop2</b> – 0,016
(1,52 <sup>-8</sup> – 0,129)	(8,29 <sup>-9</sup> – 0,058)	(0,0001 – 0,114)	(9,85 <sup>-5</sup> – 0,089)	(7,13 <sup>-9</sup> – 0,043)	(5,67 <sup>-5</sup> – 0,064)	(5,02 <sup>-8</sup> – 0,105)
<b>Pop4</b> – 0,015	<b>Pop4</b> – 0,005	<b>Pop4</b> – 0,007	<b>Pop3</b> – 0,149	<b>Pop3</b> – 0,006	<b>Pop3</b> – 0,183	<b>Pop3</b> – 0,011
(9,21 <sup>-9</sup> – 0,089)	(8,29 <sup>-9</sup> – 0,058)	(7,36 <sup>-7</sup> – 0,04)	(0,039 – 0,267)	(4,37 <sup>-9</sup> – 0,038)	(0,077 – 0,278)	(7,89 <sup>-9</sup> – 0,077)
<b>Pop5</b> – 0,021	<b>Pop5</b> – 0,005	<b>Pop5</b> – 0,007	<b>Pop5</b> – 0,088	<b>Pop4</b> – 0,006	<b>Pop4</b> – 0,010	<b>Pop4</b> – 0,006
(4,17 <sup>-9</sup> – 0,127)	(6,47 <sup>-9</sup> – 0,035)	(5,72 <sup>-7</sup> – 0,046)	(0,007 – 0,200)	(1,70 <sup>-8</sup> – 0,043)	(2,18 <sup>-5</sup> – 0,048)	(3,90 <sup>-8</sup> – 0,040)
<b>Pop6</b> – 0,015	<b>Pop6</b> – 0,004	<b>Pop6</b> – 0,008	<b>Pop6</b> – 0,012	<b>Pop6</b> – 0,006	<b>Pop5</b> – 0,072	<b>Pop5</b> – 0,060
(1,37 <sup>-8</sup> – 0,095)	(7,89 <sup>-9</sup> – 0,029)	(3,50 <sup>-7</sup> – 0,048)	(3,07 <sup>-5</sup> – 0,055)	(1,27 <sup>-8</sup> – 0,039)	(0,016 – 0,156)	(1,90 <sup>-8</sup> – 0,282)
<b>Pop7</b> – 0,014	<b>Pop7</b> – 0,005	<b>Pop8</b> – 0,011	<b>Pop7</b> – 0,023	<b>Pop7</b> – 0,008	<b>Pop7</b> – 0,022	<b>Pop6</b> – 0,008
(1,06 <sup>-8</sup> – 0,082)	(1,11 <sup>-8</sup> – 0,030)	(1,53 <sup>-6</sup> – 0,055)	(0,0002 – 0,082)	(1,63 <sup>-8</sup> – 0,055)	(5,91 <sup>-5</sup> – 0,111)	(2,45 <sup>-8</sup> – 0,049)