

Capítulo 11

A BIOTECNOLOGIA, O MELHORAMENTO E O MANEJO DE PRAGAS DA SOJA

*Daniel Ricardo Sosa-Gómez
Mayra Costa da Cruz Gallo de Carvalho
Francismar Corrêa Marcelino-Guimarães
Clara Beatriz Hoffmann-Campo*

1. INTRODUÇÃO

As ferramentas aplicadas em Biotecnologia possuem grande potencial de utilização em diversos campos da Entomologia. Neste capítulo, serão tratadas algumas das técnicas da biologia molecular que possuem aplicação no manejo de pragas da soja.

Provavelmente uma das descobertas de maior impacto dentro da biologia, na década de 1980, corresponde ao desenvolvimento da técnica de amplificação de DNA, através da reação em cadeia da polimerase (*Polimerase Chain Reaction* - PCR). Esta técnica permite a amplificação de DNA a partir de pequenas quantidades de tecido, na ordem de miligramas ou mesmo em menores quantidades, possibilitando a obtenção de DNA suficiente para sua manipulação, isto é, para sua purificação, clonagem, sequenciamento e uso posterior em outras técnicas complementares.

Assim como em diversas áreas da biologia, os estudos entomológicos e as ciências relacionadas têm se beneficiado desta técnica. A utilização da PCR tem permitido avanços nos estudos de taxonomia, filogenia, ecologia e estrutura geográfica de populações (RODERICK, 1996).

Os estudos de estrutura genética de populações consistem na determinação da distribuição de variabilidade genética entre e dentro de populações geográficas (demes ou subpopulações). Tais estudos esclarecem sobre a distribuição dos genótipos em uma determinada região, permitindo inferir taxas migratórias ou de fluxo gênico e variações genéticas decorrentes de seleção, mutação e deriva genética. Também possibilita, nos estudos de ecologia, um melhor entendimento das inter-relações entre inimigos naturais e artrópodes-praga, sejam parasitoides, predadores, simbiossiontes ou organismos entomopatogênicos. Trabalhos realizados com base na PCR possibilitam diferenciar espécies crípticas, biótipos, raças e haplótipos, esclarecendo relações filogenéticas e facilitando a diferenciação de espécies.

Técnicas de biologia molecular podem ser utilizadas para facilitar a identificação de insetos ou artrópodes-praga e benéficos. O conhecimento gerado através do sequenciamento de alguns genes pode proporcionar informações importantes na identificação de espécies a partir de um único ovo, pedaços de tecidos ou partes do corpo. Assim, ovos de lepidópteros filogeneticamente próximos podem apresentar características muito semelhantes, dificultando a identificação das espécies. Mediante técnicas apropriadas, é possível realizar a extração de DNA de um único ovo, amplificar parte do seu DNA mediante PCR e realizar o corte do DNA amplificado com enzimas de restrição.

Os produtos quando separados em géis de eletroforese geram um padrão de bandas de DNA, que pode ser o diagnóstico

da espécie. Da mesma maneira, as técnicas de biologia molecular podem auxiliar na identificação de insetos cujas fases imaturas apresentam pouca diferenciação ou nenhuma caracterização morfológica descrita. Estudos de caracterização morfológica de espécies novas podem ser complementados com a caracterização molecular de genes ou parte deles, de forma a enriquecer a descrição da espécie e facilitar estudos posteriores (CABRERA et al., 2008).

Para a realização de estudo de cadeias tróficas podem ser aplicadas técnicas moleculares. A aplicação de tais técnicas para estudos ecológicos depende do desenvolvimento de iniciadores específicos e sensíveis. Harwood et al. (2007) acompanharam a predação do pulgão-da-soja, *Aphis glycines* Matsumura, 1917, por *Orius insidiosus* (Say, 1832), e encontraram que 32% dos predadores alimentaram-se de *A. glycines*. Entretanto, a técnica apresenta algumas limitações, como declínio na detecção do DNA alvo após o consumo da presa pelo predador. Este fato pode ser devido a períodos sem alimentação, que favorecem uma taxa de digestão maior do conteúdo intestinal do predador, ou a casos de predação secundária que também podem ser fontes de erro, já que, pela técnica de PCR, não é possível discriminar predação primária de secundária, que ocorre quando o predador alimenta-se de outro predador que recentemente consumiu a presa-alvo (SHEPPARD et al., 2005).

As transformações realizadas pela tecnologia do DNA recombinante têm e terão profundo impacto no manejo de pragas, tendo em vista que culturas transformadas geneticamente podem alterar a composição e abundância de pragas e inimigos naturais, como tem sido observado com culturas como milho (*Zea mays* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.), seja pelo efeito indireto pela redução do uso de inseticidas e/ou pela redução da disponibilidade da presa (inseto-praga) ou hospedeiros impactados

direta ou indiretamente pelas toxinas (DALY; BUNTIN, 2005; McMANUS et al., 2005; NARANJO, 2005, 2011). Portanto, é possível que as mesmas alterações ocorram na cultura da soja, com provável redução das populações de *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) e *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818, entre outras espécies-praga e inimigos naturais.

2. TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS AO ESTUDO DE INSETOS-PRAGA DA SOJA

2.1. Estudos de variabilidade inter e intraespecífica

Estudos de variabilidade interespecífica são de utilidade para diferenciar espécies próximas e morfologicamente semelhantes. Para isso, sequências com caracteres constantes devem ser utilizadas. Entretanto, os estudos de variabilidade intraespecífica devem ser realizados com regiões do genoma que apresentam taxas de mutação elevadas na história recente de evolução da espécie e, portanto, são mais variáveis. A variabilidade intraespecífica pode proporcionar informações para diferenciar raças e/ou haplótipos. Por exemplo, estudos de distribuição de haplótipos são úteis para entender a distribuição geográfica da variabilidade em *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) e *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781) (ALBERNAZ et al., 2012; NAGOSHI; MEAGHER, 2008; NAGOSHI et al., 2007). Esses estudos também possibilitam determinar o isolamento geográfico, fluxo gênico e avaliar se a expansão demográfica de uma espécie é relativamente recente (ALBERNAZ et al., 2012).

As técnicas para estudos de variabilidade interespecífica mais utilizadas são o sequenciamento de genes conservados e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), já nos estudos de intraespecífica são utilizados sequenciamento de genes que apresentam variabilidade, marcadores de microssatélites, RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), SCAR

(*Sequenced Characterized Amplified Regions*) ou técnicas envolvendo enzimas de restrição como PCR-RFLP.

2.2. Marcadores moleculares

Marcadores moleculares são marcas genéticas (sequências de DNA *per se* ou sequências de DNA evidenciadas por padrões em géis de eletroforese) estabelecidas empiricamente, que podem estar relacionadas a características de interesse. Essas marcas são acompanhadas em estudos de melhoramento, relacionadas com determinados táxons (espécies, gênero, famílias), e relacionadas com respostas fisiológicas (*i.e.*, resistência a inseticidas). As características que definem um bom marcador são a reprodutibilidade, elevados níveis de polimorfismo para identificar as diferenças entre amostras, associação estreita com o caráter em estudo, custo reduzido e facilidade de uso. Entre os diferentes tipos de marcadores moleculares disponíveis, os mais frequentemente utilizados nos insetos associados à cultura da soja são os marcadores RAPD, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Single Sequence Repeat*) e RFLP.

A procura de marcadores moleculares ou a identificação de sequências genômicas associadas ao fenômeno de resistência de insetos poderá ser de grande utilidade para o monitoramento dessas populações, principalmente em materiais provenientes de regiões distantes em que os bioensaios sofrem a interferência do estresse nas populações coletadas, aumentando a variabilidade da resposta ao inseticida. Técnicas moleculares aplicadas ao monitoramento de resistência a inseticidas tem sido desenvolvidas para espécies de insetos não associados a soja (CERUTI; LAZZARI, 2003, REDDY et al., 2012). Essas técnicas também apresentam a vantagem de permitir o trabalho com porções de tecidos, mas não são isentas de dificuldades, tais como custo, tamanho de amostra e complicações quando a resistência deve-se a múltiplas origens.

2.2.1. Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD)

A técnica de RAPD consiste na amplificação de regiões genômicas com iniciadores curtos, normalmente de dez bases, que geram fragmentos de DNA entre 300 a 2.500 pb (par de bases). Esses fragmentos são visualizados por meio da técnica de eletroforese em géis de agarose, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. A presença e ausência de bandas geradas com um mesmo iniciador definem padrões de bandas diferentes entre amostras. As diferenças observadas entre diferentes genótipos de uma mesma espécie são indicadores de variabilidade intraespecífica. Essa variabilidade é codificada em caracteres binários (presença e ausência da banda) e utilizada em estudos comparativos que analisam coeficientes de similaridade e distância genética. Apesar de suas limitações devido à baixa repetibilidade entre laboratórios diferentes, a técnica de RAPD, por ser de custo menor quando comparada com as demais, tem sido muito utilizada para estudos de diferenciação de raças. No caso da mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889), essa técnica foi determinante para separar os biótipos A e B, chegando este último a ser definido temporariamente como uma nova espécie, *B. argentifolii* Bellows & Perring, 1994 (BARRO; DRIVER, 1997; BELLOWS JUNIOR et al., 1994), atualmente conhecida como *B. tabaci* biótipo B.

O uso de marcadores RAPD permite ainda inferir sobre taxas de migração entre populações e sobre o fluxo gênico entre populações. Fazendo uso dessa técnica, foi possível demonstrar que determinados genótipos do percevejo-marrom, *Euschistus heros* (Fabricius, 1798), encontravam-se restritos a uma mesma localidade geográfica e, conseqüentemente, apresentavam reduzidas taxas de migração (SOSA-GÓMEZ et al., 2004). Estudos semelhantes têm sido realizados com o percevejo *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758), constando-se que esta espécie também

apresenta reduzida migração, porém ligeiramente superior ao percevejo-marrom (SOSA-GÓMEZ et al., 2005).

Os estudos de fluxo gênico são importantes porque populações residentes e relativamente isoladas em um determinado local podem desenvolver resistência a inseticidas com maior facilidade, em caso de exposição frequente a um mesmo grupo químico (GUSE et al., 2002) ou a toxinas, como tem ocorrido recentemente com as populações e *S. frugiperda* (STORER et al., 2010).

2.2.2. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

A técnica de AFLP consiste em amplificar regiões próximas a sítios de restrição de enzimas de corte raro e corte frequente. Aos fragmentos gerados pelos cortes com as enzimas são adicionados adaptadores específicos com 20 a 30 pares de bases que são utilizados no anelamento de iniciadores durante a etapa de PCR. Os fragmentos amplificados via PCR são visualizados em géis de poliacrilamida, o que permite o isolamento de fragmentos polimórficos para sequenciamento. Esta técnica apresenta a vantagem de aferir elevado polimorfismo, mas seu custo é relativamente alto quando comparado aos demais marcadores. Os marcadores de AFLP têm sido aplicados no estudo de populações de *B. tabaci* provenientes de diferentes continentes, assim como para diferenciar biótipos (CERVERA et al., 2000). Essa mesma técnica tem sido utilizada para entender as relações de parentesco entre isolados do fungo *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, um importante patógeno de diversas espécies de lepidópteros na cultura da soja (ver Capítulo 8 - Inimigos Naturais das Pragas da Soja), e a estabilidade de genótipos através de diferentes ciclos agrícolas na Flórida (BOUCIAS et al., 2000).

2.2.3. Microssatélites, *Simple Sequence Repeats* (SSRs) ou *Short Tandem Repeats* (STRs), e Minissatélites

Estes marcadores consistem em sequências nucleares curtas, repetidas em tandem, que apresentam elevado polimorfismo e que

podem ser utilizadas como marcadores moleculares codominantes nos estudos de genética de populações. Quando os segmentos repetidos são curtos, de um a seis pb, o marcador é denominado de microssatélite; quando esses segmentos são maiores que 10 bp e são repetidos em blocos de tamanho intermediário (0,5 a 30 kb), o marcador é denominado minissatélite (ARMOUR et al., 2000). Estes últimos são pouco utilizados em insetos associados com a cultura da soja, mas têm sido isolados em inimigos naturais, como o fungo *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin, conhecido patógeno de diversas espécies de coleópteros (COATES et al., 2002). Entre as vantagens dos marcadores SSR, estão sua elevada sensibilidade e polimorfismo detectado, as quais, associadas ao caráter codominante do marcador, possibilitam a discriminação de genótipos, a associação genótipo-hospedeiro e a definição de limites (distâncias) entre subpopulações (SUBRAMANIAN; MOHANKUMAR, 2006). Estes marcadores apresentam algumas limitações de alto custo, quando há necessidade de desenvolver bibliotecas genômicas, e da determinação de falsos alelos homozigotos, pela presença de alelos nulos devidos a variações nas sequências nos sítios de anelamento dos iniciadores, entre outras (CHAPUIS; ESTOUP, 2007; OSTERHOUT et al., 2004).

Marcadores microssatélites têm sido aplicados em estudos de genética de populações de *Diabrotica virgifera virgifera* Le Conte, 1868, praga de importância econômica nos Estados Unidos. Constatou-se que as subpopulações provenientes de nove Estados diferentes apresentaram reduzida diferenciação genética, o que indicaria expansão demográfica relativamente recente de suas populações ou um elevado fluxo gênico entre elas (KIM; SAPPINGTON, 2005).

No Brasil, estão sendo realizados estudos para obter marcadores de microssatélites para as espécies pragas mais importantes da cultura da soja, como os percevejos *E. heros*,

Piezodorus guildinii (Westwood, 1837) e algumas espécies de lepidópteros noctuídeos (MÖLLER et al., 2009; SANTOS et al., 2009; ZUCCHI, M.I., comunicação pessoal). Entretanto, na literatura internacional, são relacionados iniciadores para espécies de menor importância na cultura da soja, como *S. frugiperda* (ARIAS et al., 2011).

2.2.4. PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Através desta técnica podem ser amplificados genes de interesse a partir de diferentes indivíduos para os quais se supõe identificar variabilidade de sequências. Os amplicons são digeridos por endonucleases específicas, produzindo um padrão de fragmentos visualizados por eletroforese. Quando os sítios de restrição são diferentes ou estão localizados em locais diferentes nas fitas de DNA, é possível visualizar fragmentos de tamanhos diferentes. PCR-RFLP tem sido utilizada, por exemplo, para diferenciar espécies, raças e haplótipos. Esta técnica tem sido muito explorada para estudar a distribuição de raças e haplótipos de *S. frugiperda* em países como Estados Unidos, México, Brasil e Argentina (BUSATO et al., 2004; LEWTER et al., 2006; LOPEZ-EDWARDS et al., 1999; VIRLA et al., 2008). Na Figura 1, está representado o corte do gene de citocromoxidase de diferentes espécies do percevejo *Scaptocoris* diferenciadas pelo perfil de restrição com a enzima endonuclease *Alu I*.

2.2.5. Polimorfismo de um nucleotídeo SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*)

São variações de um único nucleotídeo que ocorrem em regiões codantes e não codantes do genoma. Podem ser utilizados como marcadores biológicos ou genéticos. Como marcadores biológicos, podem estar associados com doenças genéticas e com resistência a inseticidas ou respostas a certas toxinas, por exemplo. As dificuldades de trabalhar com SNP consistem

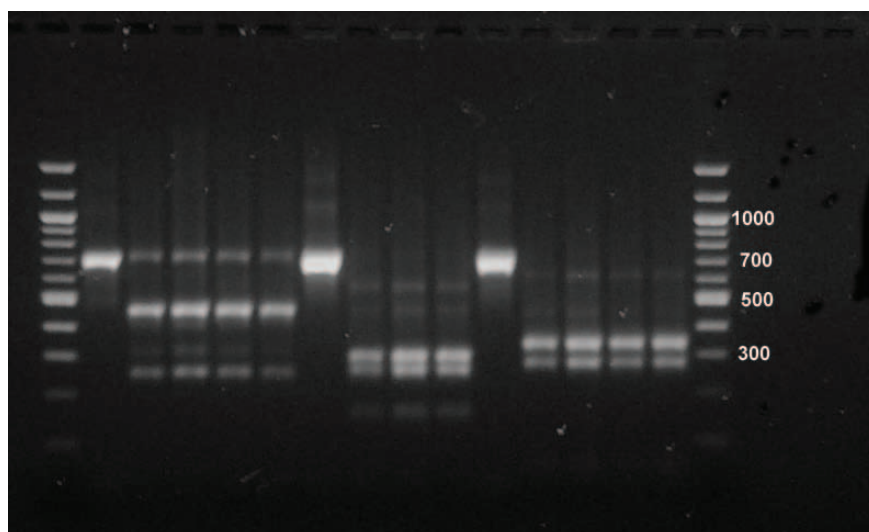


Figura 1. Digestão do produto de amplificação COI utilizando a enzima *Alu I*; linha 1: peso molecular: 100 bp; linha 2: produto de PCR *Scaptocoris buckupi*; linha 3 a 6: digestão do amplicon de *S. buckupi*; linha 7: produto de PCR de *Scaptocoris carvalhoi*; linha 8 a 10 digestão do amplicon de *S. carvalhoi*, linha 11: produto de PCR de *Scaptocoris castanea*; linha 12 a 15: digestão do amplicon de *S. castanea*. Linha 16: Peso molecular: 100 bp.

Fonte: D.R. Sosa-Gómez, dados não publicados.

na diferenciação por interferência dos erros de sequenciamento e a complexidade crescente quando se trabalha com uma amostragem ampla do genoma (BEHURA, 2006). Até o presente, poucas espécies associadas com soja tem sido estudadas utilizando marcadores SNP, podendo ser mencionados as publicações de Park e Brown (2002) com *H. virescens* e de Papanicolaou et al. (2008) com *S. frugiperda*.

2.3. Estudos envolvendo sequenciamento de DNA

O estudo de determinados genes pode fornecer importantes informações para diferenciar espécies, genótipos ou ainda estabelecer relações filogenéticas entre espécies de um mesmo gênero e de gêneros diferentes. Possivelmente, os genes mais

estudados para este fim em insetos são genes mitocondriais. Os genes mitocondriais (mtDNA) possuem a vantagem de apresentar altas taxas de evolução quando comparados com o DNA nuclear e possuem regiões relativamente conservadas que permitem a amplificação do DNA de espécies pouco relacionadas geneticamente, facilitando a obtenção dos fragmentos de DNA cujas sequências não são conhecidas, para seu posterior sequenciamento (MEYER, 1994). Outra vantagem do mtDNA é sua facilidade de isolamento e amplificação, já que está presente em um elevado número de cópias por célula. Os genes mais estudados são os do sistema da citocromo b e das subunidades do sistema da citocromo-oxidase (subunidades I e/ou II). Entre as espécies de importância para soja, no Brasil, cujas sequências gênicas mitocondriais são conhecidas parcialmente, podem ser mencionadas as espécies pragas *B. tabaci*, *Sternechus subsignatus* Boheman, 1836, *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824), *D. viridula* (Fabricius, 1801) *D. wartensis* Cabrera & Sosa-Gómez, 2007, *H. virescens*, *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) e as espécies benéficas *Trissolcus basalís* (Wollaston, 1858), *Trichogramma* spp. (ALBERNAZ et al., 2012; CABRERA et al., 2008; MARGONAR et al., 2008; NAVAJAS et al., 1998; SOSA-GÓMEZ et al., 2008).

Para as espécies de insetos que têm relação com soja, um dos grupos intensamente explorados é o das larvas-alfinete, do gênero *Diabrotica* e *Paranapiacaba*. Atualmente, são conhecidas as sequências deste gene para mais de 25 espécies de Diabroticites, a maior parte delas da região ártica. Entre as espécies neotropicais, são conhecidas *D. speciosa*, *D. viridula* (CABRERA WALSH, 2001) e uma nova espécie, *D. wartensis*, assim denominada por ter sido encontrada na região do Distrito de Warta, em Londrina-PR (CABRERA et al., 2008). A utilidade desse conhecimento consiste em diferenciar complexos de espécies morfologicamente indistinguíveis. Assim, por exemplo,

as suspeitas de ocorrência de um complexo de espécies de *B. tabaci* são devidas à variabilidade observada no gene da subunidade I da citocromo-oxidase (COI) (BERRY et al., 2004).

Os estudos de genes e de regiões não codificadoras têm demonstrado grande utilidade no esclarecimento do posicionamento taxonômico de diversas espécies. Assim, é possível distinguir espécies brasileiras de *Trichogramma* mediante a amplificação das regiões ITS (*internal transcribed spacer*) do DNA ribossômico, utilizando a técnica de PCR, e, posteriormente, obter diferentes padrões eletroforéticos após a digestão dos amplicons com enzimas endonucleases (CIOCIOLA JUNIOR et al., 2001).

A escolha da região a ser estudada depende do objetivo da pesquisa. Assim, por exemplo, genes que são conservados e apresentam pouca variabilidade intraespecífica podem ser a opção para estudar relações filogenéticas entre espécies de um mesmo grupo. Alternativamente, genes que possuem polimorfismo entre subpopulações de uma mesma espécie podem ser utilizados para diferenciar genótipos e esclarecer, por exemplo, que os surtos do tamanduá-da-soja ocorridos nas regiões do oeste da Bahia e sudeste do Maranhão eram constituídos por genótipos de ocorrência local e não introduzidos da Região Sul do Brasil, como chegou a ser sugerido (SOSA-GÓMEZ et al., 2008).

2.3.1. Identificação e diferenciação de espécies de artrópodes – *Barcoding*

Conhecido em inglês como *barcoding*, este método consiste no uso de sequências padrões relativamente curtas para caracterizar espécies (HAJIBABAEI et al., 2006). Para animais, é utilizada uma região de, aproximadamente, 650 pares de bases da subunidade um do sistema de citocromo-oxidase (HEBERT et al., 2003). A identidade da espécie é determinada mediante a comparação da sequência desconhecida com uma base de dados de sequências padrões, utilizando métodos semelhantes ao utilizado no

BLAST no GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Atualmente, existe um projeto global com base na identificação de espécies através de *barcoding* e sua disponibilidade na rede tem facilitado a identificação de diversas espécies (ver <http://www.barcodeoflife.org/>).

A técnica de *barcoding* tem sido utilizada para a identificação de pragas quarentenárias e monitoramento da introdução de pragas de outros países. As suas maiores vantagens residem no potencial dessas técnicas quando não há disponibilidade de muitos indivíduos, já que, nestas circunstâncias, normalmente a variabilidade morfológica da espécie não está bem representada. Além disso, na introdução de pragas quarentenárias, também é uma alternativa ante a carência de taxonomistas com profundo conhecimento da praga introduzida. A falta de taxonomistas é um fato muito frequente, o que impossibilita a identificação correta de diversas espécies ou, em outros casos, o processo de identificação pode ser excessivamente demorado pela pouca disponibilidade de tempo dos especialistas. Quanto mais conhecido é o grupo e sua variabilidade inter e intraespecífica, a utilização dessa técnica poderá ser mais confiável. Adicionalmente, o conhecimento de maior número de genes ou seus fragmentos pode oferecer maior segurança. Além disso, o processamento de alinhamento das sequências e verificação da sua veracidade não é uma tarefa difícil, por se tratar de uma região codificadora de proteína, e os erros de sequenciamento podem ser detectados através de sua tradução com programas disponíveis no Centro Nacional para Informação em Biotecnologia (NCBI) (JINBO et al., 2011). Para o registro nos bancos de *barcoding*, há necessidade de dispor de informações utilizadas no depósito de espécimes *vouchers*, tais como local de coleta, data de coleta, coletor, planta hospedeira, etc. Em alguns casos, as informações geradas por *barcoding* contribuem para revelar espécies crípticas.

A caracterização molecular complementa a caracterização morfológica, sendo muito útil para a descrição de novas espécies, abalizando e proporcionando elementos adicionais para uma identificação precisa e segura. Cabrera et al. (2008) descreveram uma nova espécie de *Diabrotica* associada à soja, entre outras culturas, utilizando sequenciamento parcial do gene da subunidade I do sistema citocromo-oxidase e parte da região ITS (*Internal Transcribed Spacer Region*).

Atualmente, as técnicas de biologia molecular direcionadas à identificação de espécies ou raças apresentam reduzida complexidade e podem ser utilizadas rapidamente. Assim, o processo todo, desde a extração de DNA até a obtenção de um perfil de RFLP, pode ser realizado em um dia, possibilitando identificação rápida e precisa, contando com os conhecimentos prévios básicos das espécies, alvo da identificação.

A precisão na identificação depende em grande parte da divergência interespecífica e da variabilidade intraespecífica. Outros fatores que interferem com o *barcoding* são a presença de múltiplos haplótipos mitocondriais no mesmo indivíduo e pseudogenes nucleares do genoma mitocondrial (JINBO et al., 2011).

Entre as espécies de maior importância econômica para a cultura da soja no Brasil, que foram caracterizadas na Embrapa Soja através de sequências de genes ou regiões, podem ser citadas *A. gemmatilis*, *C. includens* (S.A.Cavaguchi; D.R. Sosa-Gómez, dados não publicados), *Scaptocoris castanea* Perty, 1833, *S. buckupi* Becker, 1967 e *S. carvalhoi* Becker, 1967, e algumas espécies do complexo *Spodoptera*, tais como *Spodoptera albula* (Walker, 1857), *S. cosmioides* (Walker, 1858) e *S. eridania* (Cramer, 1784). A proximidade filogenética de algumas espécies torna a separação em alguns casos muito difícil, como ocorre com *S. albula* e *S. eridania*, cujos adultos apresentam

muita similaridade morfológica, dificultando sua separação, sem conhecimentos da morfologia de suas genitálias.

2.4. Análise genética de populações de insetos-praga da soja

Espécies distribuídas em grandes extensões geográficas podem ter suas subpopulações ou demes diferenciadas através do tempo. Se essas populações possuem certo nível de isolamento, as diferenças podem ser mais acentuadas. Assim, estudos da variabilidade genética dessas populações subdivididas podem fornecer informações importantes sobre a existência de conexões (fluxo gênico) entre os demes, assim como a possibilidade de ocorrência de espécies crípticas ou raças.

A utilização de técnicas de controle que podem ser aplicáveis em grandes áreas requer conhecimento estratégico da variabilidade de respostas que essas subpopulações podem oferecer e da determinação do tipo e intensidade da influência que uma subpopulação pode ter sobre outra. Especificamente, a introdução da soja-Bt gerou a necessidade de quantificar as diferenças de respostas entre subpopulações das espécies mais importantes de lagartas da soja, à toxina Cry1Ac, expressa na soja transgênica, bem como determinar a variabilidade genética entre tais subpopulações.

Na cultura da soja, estudos de *A. gemmatilis*, de *C. includens* e do complexo de espécies de *Spodoptera* com marcadores moleculares ou sequenciamento de genes são imprescindíveis para conhecer os níveis ou falta de estruturação de suas populações. Estudos iniciais com *A. gemmatilis* foram realizados com sistemas enzimáticos (PASHLEY; JOHNSON, 1986) e marcadores moleculares de RAPD (SOSA-GÓMEZ, 2004), indicando que esta espécie apresenta um elevado fluxo gênico. Em contraposição, pragas como os percevejos *E. heros* e *N. viridula* possuem suas populações mais estruturadas, ocorrendo

reduzido fluxo gênico entre suas populações (SOSA-GÓMEZ et al., 2004, 2005). Assim, é provável que os efeitos da seleção de inseticidas sobre a variação genética das populações de insetos sejam mais acentuados neste último caso, em que as populações não apresentam comportamento migratório e, por este motivo, estão continuamente sujeitas a pressão de seleção exercida pelas aplicações de inseticidas (Ver Capítulo 10 - Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja). Esta teoria pode ser evidenciada nos primeiros relatos de seleção de populações resistentes na cultura da soja, no Brasil, as quais têm ocorrido em populações de *E. heros*, uma das espécies que apresentam reduzido fluxo gênico, provavelmente devido à pouca capacidade de voo desta espécie. Como resultado da reduzida migração, indivíduos provenientes de locais distantes apenas poucos quilômetros, como entre as subpopulações de *E. heros* de Centenário do Sul e do distrito da Warta, em Londrina, no Estado do Paraná, são geneticamente distantes, embora a distância em linha reta entre os dois locais seja de, aproximadamente, 52 km (SOSA-GÓMEZ et al., 2004).

3. TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS AO ESTUDO DE INIMIGOS NATURAIS DE PRAGAS DA SOJA

3.1. Parasitoides e predadores

Uma das espécies de parasitoides de ovos de lepidópteros de ocorrência natural mais comum na cultura da soja é *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (FOERSTER; AVANCI, 1999; GOUVÊA et al., 2009), assim como tem demonstrado elevado potencial de controle para espécies como *C. includens* e *A. gemmatilis* (BUENO et al., 2009). Ciociola Junior et al. (2001) desenvolveram uma chave para diferenciação de oito espécies de *Trichogramma*, três delas associadas com soja, *T. pretiosum*,

T. atopovirila Oatmann & Platner, 1983 e *T. rojasi* Nagaraja & Nagarkatti, 1973 (FOERSTER; AVANCI, 1999), com base em caracteres moleculares da região ITS 2. Uma vez amplificado, o DNA da região ITS2 é digerido com endonucleases específicas, produzindo fragmentos diferentes para cada uma das oito espécies de *Trichogramma*. Para o parasitóide de ovos de percevejos *T. basalis*, estudos realizados com os genes da subunidade 1 do sistema COI desse parasitoide provenientes de diferentes localizações geográficas indicaram reduzida variabilidade na porção inicial desse gene (MARGONAR et al., 2008).

3.2. Microrganismos entomopatogênicos

As técnicas de biologia molecular são imprescindíveis nos estudos que visam à identificação de microrganismos, porque muitas das espécies associadas à soja não se diferenciam morfológicamente, ou a mesma espécie apresenta variações morfológicas de acordo com a disponibilidade de nutrientes, ou particularidades ambientais. São ferramentas úteis para caracterizar linhagens que diferem em aspectos comportamentais e que se destacam por suas características inerentes de um bom agente de controle biológico, tais como virulência, potencial de multiplicação e tolerância a estresses abióticos.

A biologia molecular tem se expandido com novas perspectivas na classificação, identificação e diferenciação de espécies de fungos benéficos que ocorrem na cultura da soja. Atualmente, é possível, através da análise multilocus, diferenciar espécies crípticas que anteriormente eram impossíveis diferenciar por estudos morfológicos. As espécies de fungos entomopatogênicos mais comuns e importantes na cultura da soja são os fungos *N. rileyi*, *Neozygites floridana* (Weiser & Muma), *Isaria fumosorosea* Wize, *I. tenuipes* Peck, *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (SOSA-GÓMEZ et al., 2009).

Aparentemente, sequências correspondentes ao DNA ribossômico do mitocôndrio proporcionam uma boa resolução para diferenciar gêneros e espécies de fungos entomopatogênicos (SOSA-GÓMEZ et al., 2008). De maneira geral, para fungos, tem sido proposta a região ITS (*internal transcribed spacer*) como potencial para ser usada como *barcoding* (SEIFERT, 2009; <http://www.fungalbarcoding.org/>). Porém, dependendo do nível taxonômico estudado, outros genes ou regiões que proporcionam uma melhor resolução interespecífica podem ser utilizados, tais como o fator de elongação 1-alpha (EF-1a) nas espécies de *Metarhizium* (BISCHOFF et al., 2009) ou regiões intergênicas nucleares como Bloc e os genes das subunidades de RNA polimerase, RPB1 e RPB2 (REHNER et al., 2011).

A evolução das técnicas de sequenciamento tem facilitado o estudo de genomas menores, tornando a análise de vírus de insetos uma atividade corriqueira. Atualmente, é possível sequenciar o genoma de um vírus em horas. São conhecidos genomas parciais ou inteiros de vírus de insetos de várias pragas de importância para a cultura da soja, como os vírus da lagarta da soja *A. gemmatilis* e da broca-das-axilas *Crociosema aporema* (Walsingham, 1914) (OLIVEIRA et al., 2006; PAROLA et al., 2002; SCIOCCO-CAP et al., 2001), entre outros.

Em relação às raças de fungos entomopatogênicos, atualmente é possível realizar o acompanhamento de sua introdução em um local, com a finalidade de controlar biologicamente uma praga, além de verificar a frequência de sua ocorrência, após o estabelecimento do agente de controle biológico. Tal acompanhamento depende da caracterização molecular das raças utilizadas como agentes controladores e da realização de amostragens da população de pragas, após sua introdução, para determinar sua presença ou frequência de ocorrência, utilizando os marcadores moleculares raça-específicos (GAUTHIER et al., 2007).

O comportamento inerente a cada espécie e sua relação com seu entorno poderá ser esclarecido. Existem indicações de que a partição da variabilidade genética de espécies dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae* obedece à localização geográfica ou habitat (BIDOCHKA et al., 2001; WANG et al., 2003). Entretanto, aparentemente, para o fungo *N. rileyi*, o componente mais importante para a diferenciação genética são as espécies de inseto hospedeiro (SUWANNAKUT et al., 2005; TIGANO; ALJANABI, 2000).

Até o ano 2000 eram conhecidos apenas seis genomas. Atualmente, o genoma de um baculovírus, que varia de 80 a 180 Kb (kilobases = 1.000 nucleotídeos), pode ser obtido rapidamente; em consequência, já são conhecidos genomas de 54 vírus entomopatogênicos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesGroup.cgi?taxid=10442>). Em 2006, foi finalizado o sequenciamento de um dos baculovírus mais importantes para cultura da soja, o vírus múltiplo de poliedrose nuclear de *A. gemmatilis* (AgMNPV) (OLIVEIRA et al., 2006).

O estudo dos genomas dos vírus entomopatogênicos auxilia no desenvolvimento de estratégias para melhorar seu potencial como agente controlador, uma vez que amplia o conhecimento sobre suas interações com o inseto hospedeiro. Por exemplo, essa informação pode ser utilizada na transformação genética dos vírus, tornando-os mais efetivos no controle de pragas. Entre os vírus transformados com potencial de aplicação na cultura da soja, encontram-se o AgMNPV modificado mediante a supressão do gene da ecdisteroide glucosiltransferase, que é responsável pela disrupção mediante a conjugação do hormônio ecdisteroide com os açúcares UDP (uridine 5 difosfato), acelerando a morte do inseto e reduzindo a concentração letal do vírus, portanto aumentando sua virulência (O'REILLY; MILLER, 1989; PINEDO et al., 2003).

Além da aplicação direta, o aperfeiçoamento e simplificação das técnicas têm facilitado a realização de estudos de microecologia. Por exemplo, é possível determinar a presença de fungos e vírus-patógenos de insetos no solo através da técnica de PCR (ENKERLI; WIDMER, 2010; MORAES; MARUNIAK, 1997; MORAES et al., 1999). Assim, é viável monitorar a liberação de agentes de controle microbiológico e a detecção da sua presença, assim como determinar sua massa e sua expressão gênica através de PCR quantitativo e EST (Expressed Sequence Tag) (PAVARIPOLL et al., 2011; PETEIRA et al., 2005).

4. TRANSFORMAÇÕES DE INSETOS-PRAGA E AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO

A maior parte das modificações genéticas em insetos tem sido realizada em insetos não associados à cultura da soja. As finalidades dessas transformações são múltiplas. Entre aquelas utilizadas para o manejo de pragas, constam a inserção de genes deletérios para manejo de populações de insetos de importância médica, assim como para entender os mecanismos de resistência a inseticidas através da super-expressão de genes envolvidos nos processos metabólicos de detoxificação de inseticidas (ALPHEY, 2002; JONES et al., 2010). Essas técnicas têm sido aplicadas a insetos utilizados como modelo para pesquisa.

A transformação do fungo entomopatogênico *M. anisopliae*, que teve como finalidade o aumento da sua virulência, foi uma das primeiras transformações genéticas realizadas em organismos associados com a cultura da soja. Essa transformação consistiu na inserção de cópias adicionais do gene Pr1 (*Pathogenesis related 1*), com consequente redução do tempo de mortalidade do hospedeiro, sem redução da concentração letal mediana do fungo (ST. LEGER et al., 1996). O transformante, entretanto, até o presente não alcançou a fase comercial. Fang et al. (2005) transformaram *B. bassiana* para superexpressão do

gene de uma endoquitinase (*BbchitI*) e conseguiram aumentar a virulência, reduzindo aproximadamente em dez vezes a concentração letal mediana em comparação ao fungo selvagem.

5. TÉCNICAS MOLECULARES APLICADAS AO MELHORAMENTO DA SOJA PARA RESISTÊNCIA A INSETOS

O desenvolvimento de cultivares de soja resistentes a insetos tem sido objetivo de muitos programas de melhoramento e iniciativas biotecnológicas. Em um curto período, espera-se que cultivares de soja contendo ambos os genes Bt (*Cry*) e RR (Roundup Ready) da Monsanto (tecnologia inédita para a cultura da soja, no mundo) sejam comercializadas no Brasil. Embora esta iniciativa deva certamente exercer um grande impacto sobre a cultura da soja, outras iniciativas igualmente importantes visam ao desenvolvimento de cultivares comerciais pelo melhoramento convencional, pela introgressão de genes de resistência identificados entre as introduções (PIs, *plant introduction*) resistentes.

O uso de marcadores moleculares destaca-se entre as ferramentas biotecnológicas utilizadas no desenvolvimento de cultivares resistentes, prestando importante contribuição aos programas de melhoramento, através da seleção assistida. Já as iniciativas biotecnológicas contribuem com o isolamento e transferência de novas fontes de resistência entre diferentes espécies. Pouco se conhece sobre os mecanismos e genes relacionados à resistência aos insetos praga, mas o uso recente de ferramentas moleculares de prospecção gênica juntamente com a genômica funcional (RNAi) no estudo da interação planta-inseto tem proporcionado novas perspectivas ao desenvolvimento de cultivares resistentes.

5.1. A contribuição dos marcadores moleculares aos programas de melhoramento para resistência a insetos

Os marcadores moleculares (RFLP, AFLP, RAPD, SSR, SNP e outros) são marcas genotípicas, ou seja, baseadas em sequências

de nucleotídeos, que podem ser associadas a características fenotípicas de interesse. Para mapear um locus de características quantitativas (*Quantitative Trait Locus* - QTL) de resistência a um inseto, as populações obtidas de um cruzamento entre um parental suscetível e um resistente são testadas, para averiguar a presença de associações não aleatórias entre o fenótipo de resistência e o genótipo de um marcador específico (lôcus). Quando uma marca molecular segrega simultaneamente uma característica de interesse, ela pode ser utilizada para seleção de indivíduos em populações de melhoramento. A seleção torna-se um processo muito mais preciso, já que, por se basear no genótipo, o efeito do ambiente sobre a determinação do fenótipo (principalmente importante na herança poligênica) é excluído, e os efeitos de cada locus são individualizados, reduzindo o tempo e recursos investidos no melhoramento.

Na década de 1960, foram identificadas as primeiras plantas introduzidas (PI171451, PI229358 e PI227687) resistentes ao ataque do besouro desfolhador *Epilachna varivestris* Mulsant, 1850 (VAN DUYN et al., 1971, 1972). Posteriormente, tais PIs foram identificadas como resistentes ao ataque de outras várias espécies de insetos praga da soja (BOERMA; WALKER, 2005). Kilen e Lambert (1986) demonstraram que elas deveriam possuir pelo menos um gene de resistência. Desde então, muitos programas de melhoramento foram conduzidos com o objetivo de transferir os genes de resistência das PI171451, PI229358 e PI227687 às cultivares comerciais, mas todos sem resultados significativos (LAMBERT; TYLER, 1999). Entre os problemas encontrados pelos melhoristas pode-se citar o fato de que os genes de resistência eram transferidos junto com características agrônomicas indesejadas, que, na maioria das vezes, conferiam baixa produtividade e suscetibilidade a doenças, além da herança quantitativa da resistência e a dificuldade de seleção simultânea para resistência a diferentes insetos (BOERMA; WALKER, 2005).

O sucesso no desenvolvimento de linhas com resistência a insetos depende do desenvolvimento de marcadores moleculares que possam ser utilizados na seleção assistida da resistência a insetos em soja. Narvel et al. (2001) utilizaram com sucesso marcadores RFLP em associação com SSR, para identificar SIR-QTLs (*Soybean Insect Resistance Quantitative Trait Loci*) nas PIs resistentes (229358 e 171451) e rastrear a introgressão desses QTLs entre as cultivares, germoplasmas e linhagens de soja produzidas a partir das PIs 229358 e 171451. Do total de 15 genótipos avaliados, 13 foram positivas para a introgressão do QTL mapeado no cromossomo LG M (gene de efeito maior), alguns genótipos apresentaram os QTLs mapeados nos cromossomos LG G ou H e nenhum foi positivo para o cromossomo D1b. Assim, tem-se que, em 30 anos de melhoramento da resistência a insetos na soja, não foi possível introgridir os genes de menor efeito sobre a resistência nas cultivares elite, utilizando unicamente as ferramentas do melhoramento clássico.

No decorrer dos anos, marcadores moleculares continuaram a ser associados a *loci* quantitativos (QTLs) que determinam a resistência a insetos-praga. Dos 233 QTLs mapeados em seis espécies cultivadas até 2000, trinta representavam QTLs de efeito maior sobre a resistência a diferentes insetos-praga, sendo três mapeados na soja (YENCHO et al., 2000).

O uso de marcadores moleculares nos programas de melhoramento representa uma das mais importantes contribuições da biotecnologia à produção de cultivares elite. Isso porque o seu uso tem proporcionado formas mais eficientes para seleção de indivíduos superiores através da seleção assistida por marcadores moleculares, reduzindo o investimento necessário em tempo e recursos para obtenção de cultivares melhoradas e facilitando o rastreamento de genes de interesse. Nos programas de introgressão gênica, o uso de marcadores moleculares para seleção

dos indivíduos que carregam o gene de interesse entre as populações de retrocruzamento aumenta a eficiência no processo. De forma semelhante, marcadores moleculares comprovadamente associados à resistência aos insetos-praga podem ser utilizados para seleção genotípica simultânea dos indivíduos resistentes a diferentes pragas e/ou doenças nas populações em processo de melhoramento, tornando desnecessária a infestação artificial com as pragas.

O grande desafio no uso da seleção assistida por marcadores moleculares está em encontrar QTLs cuja segregação explique uma porção da variação fenotípica suficientemente grande para justificar seu uso. Além disso, os QTLs devem ser mapeados, utilizando marcadores moleculares que possam ser mais facilmente aplicados a grandes populações. Os primeiros QTLs de soja relacionados à resistência a insetos (SIR-QTLs) foram estudados utilizando marcadores RFLP polimórficos mapeados nos grupos de ligação M (LG M) e H (LG H), sendo o primeiro o de maior efeito sobre a resistência (RECTOR et al., 2000). Estes primeiros SIR-QTLs eram suficientes para explicar grande parte da variação na resistência nas populações de mapeamento, mas seu uso na seleção assistida por marcadores moleculares em larga escala é impossibilitado, devido às características intrínsecas dos marcadores RFLP, de baixo polimorfismo e elevada dificuldade técnica de obtenção. Os marcadores SSR, por outro lado, são abundantes, altamente polimórficos e mais facilmente aplicados em larga escala, características que fizeram desses marcadores os mais utilizados nos experimentos de mapeamento.

Os estudos de QTLs associados à resistência a insetos em soja estão principalmente relacionados à lagarta da espiga do milho [*Helicoverpa zea* (Boddie, 1850)], afídeos, larvas de traças e cigarrinhas; e à associação de QTLs de resistência à estratégia Bt (BAUR; BOETHEL, 2004; KILEN; LAMBERT, 1986; NAKAZAWA, 2005; NARVEL et al., 2001).

A resistência aos pulgões ou afídeos na soja (*A. glycines*) foi particularmente bem estudada, devido a sua importância para a soja nos Estados Unidos da América. Todas as cultivares americanas de soja eram suscetíveis ao pulgão, e os produtores controlavam a sua infestação, utilizando inseticidas químicos, os quais oneravam o custo da produção (PAUL, 2004). A resistência aos afídeos na soja apresenta herança qualitativa nas cultivares Dowling e Jackson, sendo controlada por um único gene dominante (HILL et al., 2006a, 2006b). Esse gene foi denominado *Rag1* em 'Dowling' e está localizado no cromossomo 7, grupo de ligação LG M. O gene de resistência na cultivar Jackson foi também mapeado no LG M, o que sugere que, ao invés de dois genes distintos, a resistência nas duas cultivares seja condicionada por formas alélicas de um único gene (LI et al., 2007). Ambas as cultivares Dowling e Jackson são resistentes através do mecanismo de antibiose (MENSAH et al., 2005).

O uso de marcadores SNPs no mapeamento fino do gene *Rag1* possibilitou a identificação de uma região de 115Kb no genoma da cultivar Williams onde estão anotados 13 genes (KIM et al., 2010). Entre esses genes, há dois contendo os domínios NBS-LRR (*nucleotide binding leucine-rich repeat*), que se acredita serem potenciais candidatos para *Rag1*; isso porque são homólogos a genes de resistência presentes em *Arabidopsis thaliana* Linnaeus, *Medicago* sp., tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill), batata (*Solanum tuberosum* L.) e melão (*Cucumis melo* L.) (KIM et al., 2010).

De outra forma, os estudos sobre a resistência ao pulgão nas introduções PI 567541B, PI 567598B, PI 567543C e PI 567597C indicam a ocorrência de um controle quantitativo da resistência, determinado por dois genes recessivos nas introduções PI 567541B, PI 567598B (CHEN et al., 2006; MENSAH et al., 2005, 2006) e por fatores ainda não conhecidos nas

introduções PI 567543C e PI 567597C. Sabe-se, entretanto, que as introduções PI 567541B e PI 567598B, assim como as cultivares Dowling e Jackson, possuem resistência por antibiose, enquanto as introduções PI 567543C e PI 567597C possuem resistência por antixenose (MENSAH et al., 2005). Zhang et al. (2009) demonstraram que um único QTL mapeado no LG M era suficiente para explicar mais de 94% da variação fenotípica na resistência a afídeos na PI 567541B. Este QTL foi mapeado nas proximidades dos marcadores Satt299 e Satt435, sendo o último muito próximo ao gene de resistência (*Rag1*) identificado nas cultivares Dowling e Jackson (LI et al., 2007).

Posteriormente, Mian et al. (2008a) identificaram outros três germoplasmas com resistência a afídeos, sendo dois resistentes por antixenose e a introdução PI 243540, por antibiose. Kang et al. (2008) demonstraram que, assim como nas cultivares Dowling e Jackson, a resistência na PI 243540 é determinada por um único gene dominante mapeado no cromossomo 13 (LG F) denominado de *Rag2* (MIAN et al., 2008b). Há um grande interesse na determinação da base genética da resistência da introdução PI 567543C, já que ela possui resistência aos afídeos de Michigan e Ohio (USA). Recentemente, Zhang et al. (2010) identificaram um QTL de efeito maior sobre a resistência ao afídeo mapeado no cromossomo 16 (LG J), que explica cerca de 85% da variação fenotípica na PI 567543C. Esse gene foi mapeado em um cromossomo distinto aos genes *Rag1* e *Rag2*, revelando uma nova fonte de resistência ainda não identificada nos estudos anteriores e foi denominado *Rag3*.

Os trabalhos desenvolvidos sobre a base genética da resistência ao pulgão nas cultivares Dowling e Jackson e nas introduções PI 567541B, PI 567598B, PI 243540 e PI 567543C são exemplos claros da importância que os estudos realizados em grupos genéticos distantes possuem na identificação de

fontes de resistência diferentes (KANG et al., 2008). Uma vez colocados em uma mesma planta, esses genes podem retardar a evolução da resistência entre os insetos-alvo, mantendo a resistência das plantas funcional por um período mais longo, ou podem funcionar como fontes alternativas de resistência. Além disso, o uso de SNPs, principalmente, no mapeamento fino de QTLs já identificados deverá auxiliar na otimização do processo de seleção assistida, tornando-o muito mais eficiente, possibilitando a clonagem posicional de genes envolvidos na resistência e, conseqüentemente, facilitando sua introgressão nas cultivares comerciais.

5.2. O programa de melhoramento da soja para resistência a insetos no Brasil

No Brasil, trabalhos de melhoramento genético já levaram ao lançamento, pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC), de materiais resistentes a pragas, por exemplo, as cultivares IAC-100 e IAC-24 (MIRANDA et al., 2003), que apresentam característica de resistência a percevejos fitófagos e desfolhadores da soja. Sua resistência é, provavelmente, herdada, em sua maioria, das introduções PI 274454 e PI 229358 (ROSSETTO et al., 1990; ROSSETTO et al., 1995; VEIGA et al., 1999).

Existe variabilidade genética para resistência da soja ao ataque de insetos e as PI 227687, PI 229358 e PI 171451 (TURNIPSEED; SULLIVAN, 1976), PI 274454 (ROSSETTO et al., 1989) e a PI 171444 (GILMAN et al., 1982) foram descritas como fontes de genes para resistência. Diversas linhagens têm sido desenvolvidas no Brasil a partir de cruzamentos envolvendo essas PIs e cultivares comerciais de soja (LOURENÇÃO et al., 1989; PANIZZII; SLANSKY JR., 1985; ROSSETTO, 1989; ROSSETTO et al., 1984, 1986). Entretanto, Lourenção et al. (1985) e Hoffmann-Campo (1995), comparando as linhagens existentes com as PIs que lhes deram origem, reportaram que

as PIs possuem resistência a insetos superior às suas descendentes. Isso, de certo modo, era esperado, considerando o grande número de genes envolvidos no mecanismo de controle da resistência a insetos e a consequente dificuldade de sua transferência ao material adaptado.

A baixa herdabilidade conjunta das características de produtividade de grãos e resistência a insetos dificulta o desenvolvimento de cultivares resistentes. Apesar disso, algumas das linhagens resistentes têm apresentado bons níveis de produtividade, quando comparadas às melhores cultivares comerciais. Ainda não se sabe, claramente, até que ponto é viável para o agricultor abrir mão de produtividade para usar cultivares resistentes, considerando-se que, na prática, elevado potencial produtivo é uma característica essencial das cultivares. Porém, além da produtividade, atualmente uma cultivar de soja tem que ser resistente a doenças como a mancha olho-de-rã, a pústula bacteriana, o cancro-da-haste, por serem fatores altamente restritivos para a produção de grãos. No Brasil Central, também a resistência ao nematoide de cisto da soja a cada ano tem aumentado a demanda por cultivares resistentes.

Neste contexto, o programa de melhoramento para resistência a insetos precisa trabalhar com populações grandes para permitir o aparecimento das combinações gênicas que atendam a todas essas exigências nas futuras linhagens. Como a herança para resistência a insetos também é complexa (SOUZA; TOLEDO, 1995), é muito difícil encontrar linhagens com elevado nível de resistência e alto potencial produtivo, em um único ciclo de recombinação e seleção. Assim, uma programação seguindo os moldes da seleção recorrente é necessária. Outro problema importante a ser considerado é a natureza não uniforme do ataque dos percevejos, que pode mascarar os resultados de testes de resistência realizados no campo experimental (ARIAS et al., 1999).

Todos os anos, na Embrapa Soja, são realizados cruzamentos envolvendo cultivares e linhagens adaptadas às diversas regiões onde se cultiva a soja e linhagens com característica de resistência e/ou tolerância a insetos que se destacam nos ensaios de adaptação regional. Todas as populações (bulks) são mantidas durante a fase de avanço de gerações com pelo menos 3.000 plantas. As populações segregantes e as progênies extraídas de populações avançadas são submetidas à pressão de percevejos (até oito percevejos por metro linear) no campo, com população natural, para aumentar a frequência dos genes de resistência. A presença de populações adequadas de percevejos e a distribuição uniforme desta população ao longo do ensaio são estimuladas através do manejo das épocas de semeadura e pelo uso de bordaduras suscetíveis de diferentes ciclos. Além disso, os genótipos selecionados a cada ano são testados em gaiolas e telados, no campo, com o mesmo número de percevejos (8 percevejos/m). As progênies que chegam à maturação normal são colhidas, as sementes dessas progênies são examinadas, e uma seleção visual para qualidade de semente é realizada. As progênies selecionadas são submetidas a testes de produtividade e adaptação às diferentes regiões brasileiras, durante pelo menos três anos. As progênies que reúnem as características desejadas são indicadas, se apresentarem mérito, para participar da rede de ensaios finais, em que se obtém o VCU (valor de cultivo e uso) necessário para a indicação de uma nova cultivar. Paralelamente, essas progênies voltam a participar nos cruzamentos, começando um novo ciclo de seleção recorrente (C.A.A. Arias, comunicação pessoal).

Na Tabela 1, é possível observar como o programa de melhoramento para resistência a insetos tem evoluído nos últimos seis anos. Até a safra 2000/01, nenhuma linhagem derivada desse programa obteve mérito para participar da avaliação

Tabela 1. Programa específico de resistência a insetos, em números de combinações e de populações segregantes, número de genótipos participando dos ensaios, teste de progênes (TP), avaliações preliminares 1 até 3 (AP1 a AP3) e avaliações finais (AF), durante o período de 1999 a 2008.

Atividade	1999/2000	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	2005/06	2006/07	2007/08	Total
Combinações	47	72	110	156	103	120	80	100	131	919
Populações	55	75	147	287	385	308	651	550	500	2.958
TP	2.300	16.927	-	21.273	22.500	19.000	21.000	23.000	15.000	141.000
AP1	1.812	376	1.828	149	1.900	1.391	1.854	1.100	1.510	11.920
AP2	-	150	62	196	206	61	320	300	250	1.545
AP3	-	-	8	10	8	2	16	29	11	84
AFinal	0	0	0	0	0	2	0	8	15	25

Fonte: C.A. Arias, dados não publicados.

preliminar de terceiro ano (AP3). A partir da safra seguinte, linhagens desse programa específico passaram a participar com frequência do AP3 e, em 2004/05, pela primeira vez, duas linhagens participaram das avaliações finais, indicando que os ganhos genéticos com esse processo de seleção têm permitido atender aos objetivos do programa (C.A. Arias, comunicação pessoal).

5.3. A transgenia e a resistência a insetos

5.3.1. História e perspectivas

O controle de insetos-praga é rotineiramente realizado através da aplicação de inseticidas químicos de amplo espectro de ação, os quais, além de causar danos ao meio ambiente e à saúde humana, acabam afetando outros artrópodes e inimigos naturais dos insetos-alvo. Outro importante fator a ser considerado na aplicação de inseticidas químicos é o provável desenvolvimento de resistência dos lepidópteros aos agentes químicos utilizados no seu controle (TERÁN-VARGAS et al., 2005). Uma das alternativas que se mostrou possível ao uso de inseticidas químicos foi o uso dos bioinseticidas. Os bioinseticidas são utilizados há mais de 50 anos, mas até hoje não são uma alternativa comercialmente importante, porque ainda apresentam problemas quanto a sua estabilidade, além de elevada especificidade (NAVON, 2000).

A possibilidade de produzir plantas geneticamente modificadas com genes que conferem resistência aos insetos-praga passou a ser considerada a partir de 1981, quando a primeira toxina δ -endotoxina de resistência foi clonada e purificada a partir de *Escherichia coli* (SCHNEPF; WHITELEY, 1981).

As δ -endotoxinas ou proteínas Cry são produzidas durante a fase de esporulação das bactérias *Bacillus thuringiensis* Berliner e se acumulam na forma de cristais na periferia dos esporos (PEFERÖEN, 1997), sendo por isso conhecidas como cristais de proteínas inseticidas (ICP). Essas proteínas Cry são tóxicas

para larvas de lepidópteros, dípteros e coleópteros (HONGYU et al., 2000), porque, quando digeridas pelas proteases liberadas no intestino do inseto, liberam pequenos peptídeos (toxinas) capazes de se associar às microvilosidades apicais das células do intestino do inseto, levando à formação de poros na membrana e consequente morte celular por choque osmótico. Acredita-se que as lesões provocadas no intestino do inseto favoreçam a colonização de sua hemolinfa por enterobactérias, provocando morte por infecção generalizada (BRAVO et al., 2004; BRODERICK et al., 2006). Além das proteínas ICP de δ -endotoxinas, as proteínas VIP (proteínas vegetativas inseticidas), que pertencem ao grupo de δ -endotoxinas (DONOVAN et al., 2001; SCHNEPF et al., 1998), possuem um modo de ação inseticida distinto das proteínas ICP, podendo ser utilizadas nos programas integrados de manejo da resistência Bt.

A história das plantas transgênicas Bt teve início com o tomate (FISCHHOFF et al., 1987), seguido pelo plantio comercial em 1995-1996 do primeiro milho Bt Maximizer™ da Novartis, o algodão Bollgard™ e a batata Newleaf™ da Monsanto (JOUANIN et al., 1998). No Brasil, a primeira liberação de plantio comercial de plantas Bt ocorreu em 2005, com a liberação do algodão Bollgard™ 531. O uso comercial das plantas Bt causou uma importante redução na aplicação de defensivos agrícolas. Somente para a cultura do algodão, foi registrado um decréscimo de 22,9% no uso de inseticidas entre os anos de 1996 a 2008 em todo o mundo (BROOKES; BARFOOT, 2010).

A estratégia Bt consiste na expressão de proteínas (NARANJO, 2011) em associação ao manejo da resistência. O manejo da resistência é uma prática que tem como objetivo retardar a evolução da resistência nas populações de insetos-alvo, sendo que a principal estratégia adotada pelos países produtores de plantas Bt é o uso de alta dose da toxina associada

a refúgios estruturados (ILSI, 1998). Nesta estratégia, as áreas de plantio com plantas que expressam a proteína Bt em elevada concentração são intercaladas com áreas com plantas hospedeiras (suscetíveis), denominadas de áreas de refúgio. As populações de insetos suscetíveis a proteína Bt são mantidas nas áreas de refúgio e podem se acasalar com os insetos da área de plantio transgênico. Assim, quando a resistência for conferida por um alelo recessivo, o acasalamento cruzado entre as duas populações favorecerá a manutenção da heterozigose, ou seja, da suscetibilidade, retardando a evolução da resistência (TABASHNIK et al., 2008).

Entre as plantas Bt mundialmente comercializadas estão a soja (principal cultura biotecnológica em 2009), milho, algodão e canola (*Brassica napus* L.), e mais recentemente o arroz (*Oryza sativa* L.) Bt, desenvolvido na China, e a berinjela (*Solanum melongena* L.) Bt, na Índia (CLIVE, 2010). O relatório anual sobre o *status* global das cultivares GMs, publicado em 2010 pelo ISAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications), relata que as plantas GM para resistência a insetos formaram o grupo que mais cresceu em 2009-2010 entre as lavouras GM, representando 17% da área mundial cultivada com produtos biotecnológicos (CLIVE, 2010).

No Brasil, as plantas geneticamente modificadas Bt com comercialização autorizada representam 13 de um total de 21 eventos, sendo elas: algodão Bollgard™ 531 (toxina Cry1Ac, 2005), milho MON™ 810 (toxina Cry1Ab, 2007), milho Bt11™ (toxina Cry1Ab, 2008), Milho TC™ 1507 (toxina cry1F, 2008), Algodão Widestrike™ (toxina cry1F e cry1Ac, 2009), Algodão MON™ 15985 ou Bollgard II™ (toxina Cry1Ac e Cry2Ab2, 2009), Milho MIR™ 162 (toxina Vip3Aa, 2009), Milho Bt11™ (toxina cry1Ab) x GA21™ (2009), Milho MON™ 810 (toxina Cry1Ab) x NK603™ (2009), Algodão MON™ 531 (toxina cry1Ac)

x MON 1445TM (2009), Milho MON 89034TM (toxina cry1A. 105 e cry2Ab2, 2009) e Milho TC 1507TM (toxina cry1F) x NK603TM (2009), e a soja resistente a insetos e tolerante a herbicida MON 87701 (Cry1Ac) x MON 89788 (cp4 epsps) (<http://www.ctnbio.gov.br>).

As plantas Bt já completam mais de uma década no controle de espécies de lepidópteros, tendo prestado contribuição na redução dos impactos causados pela aplicação de inseticidas químicos sobre o meio ambiente e, muito importante, no auxílio ao controle de outras pragas que eram favorecidas pela eliminação de seus inimigos naturais pelos inseticidas químicos.

O primeiro caso de resistência à toxina Bt foi documentado através de bioensaios e experimentos conduzidos em casa de vegetação em populações de *H. zea*, coletadas em plantios de algodão transgênico nos Estados Unidos (TABASHNIK et al., 2008). Os indivíduos analisados evoluíram resistência dominante à toxina Cry1Ac, mas não se tornaram um problema por não serem resistentes à outra toxina, Cry2Ab, utilizada no algodão híbrido, e também devido ao controle realizado com inseticidas químicos no local. Segundo os autores, a estratégia dos refúgios estruturados é eficiente no controle da evolução da resistência às toxinas Bt quando a resistência é recessiva. Ficou evidente também que a abundância de refúgios exerce importante influência sobre a evolução da resistência. Quando a resistência é recessiva, refúgios contemplando $\geq 5\%$ da área de cultivo com variedades Bt devem evitar o aparecimento de indivíduos resistentes em, pelo menos, 20 anos. No entanto, quando os indivíduos apresentam algum grau de resistência (frequência mais elevada do alelo resistente na população original), refúgios com cerca de 50% da área de cultivo com variedades Bt são necessários para retardar o aparecimento de populações resistentes pelo mesmo período (TABASHNIK et al., 2008).

Nesta perspectiva, outras fontes de resistência aos insetos-praga devem ser conquistadas e combinadas às estratégias já existentes. A associação de QTLs relacionados à resistência a insetos-praga da soja às plantas Bt, por exemplo, tem se mostrado uma importante estratégia para a manutenção da resistência Bt. Os QTLs SIR-M e SIR-H mapeados na PI 229358 foram introgridos na cultivar Bt BenningTM sem qualquer alteração de produtividade (ZHU et al., 2008).

Outros estudos revelam que os inibidores de protease são também bons candidatos aos novos eventos de transgenia para resistência a insetos porque são capazes de prevenir a predação (BOLTER; JONGSMA, 1997). Eles são frequentemente produzidos pela planta como uma resposta de defesa ao ataque de insetos. No intestino dos insetos, os inibidores de protease inativam, de forma específica, diferentes classes de proteases e, como consequência, a digestão é impedida, havendo inibição do crescimento em função da má nutrição, retardamento do desenvolvimento do inseto e consequente redução na predação. No entanto, quando um único inibidor é expresso na planta transgênica, consegue-se apenas uma pequena resposta contra a predação, que é facilmente revertida. Isso ocorre porque os insetos possuem diferentes classes de proteases (que atuam sobre serina, cisteína, ácido aspártico e metalo-proteinases) que atuam conjuntamente na digestão. Por exemplo, nos insetos coleópteros em que o lúmen intestinal é ácido, a digestão é preferencialmente realizada por cisteína-proteases. Mas, se um inibidor de protease específico para cisteína-proteases é utilizado, o inseto rapidamente se adapta a essa nova condição, ativando outras classes de proteases (BOLTER; JONGSMA, 1997).

Quando o inibidor de cisteína protease de soja scN foi incorporado à dieta do caruncho (*Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775), houve um retardamento de seu desenvolvimento larval

inicial, que foi prontamente recuperado em estágios posteriores, resultando em níveis idênticos de desenvolvimento entre aqueles que receberam e não receberam o inibidor em sua dieta. Posteriormente, demonstrou-se que os insetos que se alimentaram do inibidor scN puderam se adaptar rapidamente à nova condição, devido à ativação de proteases aspárticas insensíveis a scN (ZHU-SALZMAN et al., 2003). Assim, tem-se que o uso de um único inibidor reduz drasticamente as chances de sucesso de um evento transgênico. Uma alternativa recomendada nesse caso é a piramidação de vários genes que codificam inibidores de diferentes classes de proteases em uma única planta (SENTHILKUMAR et al., 2010). A piramidação dos genes que codificam para o scN, pepstatin A (inibidor de protease aspártica) e KI (inibidor de tripsina – Kunitz) em soja foi muito mais eficiente no retardamento do desenvolvimento do *C. maculatus* do que o efeito isolado de ambos (AMIRHUSIN et al., 2007). Alternativamente, pode-se aumentar o efeito inseticida das proteínas Cry com a expressão de inibidores de proteases (LOPEZ et al., 2009).

5.3.2. A contribuição do fenômeno de RNAi ao melhoramento da resistência

Os insetos foram o segundo grupo de animais para o qual demonstrou-se a ocorrência do fenômeno de interferência de RNA ou RNAi (KENNERDELL; CARTHEW, 1998). No processo de RNAi, moléculas dupla fita de RNA são reconhecidas por uma maquinaria proteica, comum aos eucariotos, que direciona o silenciamento de RNAm que apresentem homologia, ou seja, específicos. Nos organismos onde não há um sistema imunológico formado para proteção contra o ataque de patógenos, tais como as plantas e os insetos, o fenômeno de RNAi evoluiu como uma importante barreira imunológica (LI et al., 2002; VOINET, 2005). Em *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830), os RNAs dupla fita virais (dsRNA) são processados pela ribonuclease Dicer-2

(Dcr-2) em pequenos RNAs interferentes virais (v-siRNAs), os quais são capturados pelo complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). O complexo formado se hibridiza para RNAs homólogos desencadeando sua clivagem através da atividade de uma enzima encontrada no sítio catalítico do RISC, denominada Argonauta-2 (Ago-2). Mutantes de *D. melanogaster* que apresentam perda de função dos genes *Dcr-2* e *Ago-2* são hipersensíveis a infecção viral (WANG et al., 2006).

Desde a sua descoberta em 1998 (FIRE et al., 1998), o processo de RNAi foi rapidamente considerado como uma ferramenta alternativa ao *knockout* gênico e à tecnologia antissenso, devido à facilidade de manipulação da maquinaria de silenciamento e à elevada eficiência e especificidade do processo de silenciamento (BELLÉS, 2010). A função de vários genes foi identificada em *C. elegans* através do processo de interferência de RNA (<http://www.wormbase.org>), tornando-o uma metodologia extremamente útil aos estudos de genômica funcional. Mais recentemente, o RNAi tem se mostrado uma abordagem útil também à biotecnologia de plantas (MANSOOR et al., 2006). Podemos citar como exemplo as plantas transgênicas de soja que expressam o RNA dupla fita do gene *major sperm protein* do nematoide *Heterodera glycines* Ichinohe, 1952 nas raízes (STEEVES et al., 2006). Quando ingerido pelo nematoide, o RNA dupla fita produzido pela soja é reconhecido pela sua maquinaria de silenciamento desencadeando o silenciamento do gene no nematoide e promovendo redução de seu potencial reprodutivo (redução de 68% da massa de ovos por grama de tecido vegetal).

Alguns aspectos importantes tornam o processo de RNAi a ferramenta de escolha em determinados transgênicos: primeiramente, o seu efeito é sistêmico (dependendo do organismo-alvo), específico e muito eficiente no silenciamento gênico (MANSOOR et al., 2006), e, muito importante, a transformação genética de

plantas para síntese de dsRNAs que eliminam seus patógenos não envolve a produção de uma nova proteína; consequentemente, muitas preocupações relacionadas à biossegurança do produto podem ser amenizadas (LILLEY et al., 2007).

Nos nematoides e plantas, o sinal de silenciamento é sistêmico porque os pequenos RNAs silenciadores são amplificados por RNAs polimerases dependente de RNAs (RdRP) e transportados célula a célula por transportadores de membrana específicos (SIJEN et al., 2001; WINSTON et al., 2002). Já nos insetos acreditava-se, inicialmente, não ocorrer amplificação do sinal de silenciamento, porque o genoma do inseto modelo *D. melanogaster* e de alguns outros insetos não apresenta homólogos a RdRPs, ou ao transportador de membrana sid-1 (ROIGNANT et al., 2003). Ainda não se conhece RdRPs em insetos, mas ortólogos para sid-1 já foram encontrados em *Tribolium castaneum* Herbst, 1797, *Bombyx mori* Linnaeus, 1758 e *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 (GEORGE; GENE, 2006). Além disso, o efeito sistêmico do silenciamento via RNAi foi demonstrado em insetos, tais como *T. castaneum*, *Epiphyas postvittana* (Walker, 1863), *Helicoverpa armigera* (Hubner, 1805) e outros (BUCHER et al., 2002; MAO et al., 2007; TOMOYASU; DENELL, 2004; TURNER et al., 2006). Baum et al. (2007) também sugerem que haja amplificação do sinal de silenciamento em coleópteros já que uma baixa concentração de RNA interferente foi capaz de suprimir quase totalmente os genes analisados. Assim, acredita-se atualmente que, como demonstrado para os nematoides, nos insetos o sinal de silenciamento também é transmitido de forma sistêmica, podendo causar bloqueio na alimentação com inibição ou retardamento do crescimento, ou ainda levar à morte (HUVENNE; SMAGGHE, 2010).

Como a administração tópica de RNAs dupla fita a campo para controle de pragas é algo impraticável, os pesquisadores têm se dedicado à geração de plantas produtoras dos RNAs

silenciadores. Mao et al. (2007) produziram plantas de *A. thaliana*, *Nicotiana tabacum* Linnaeus e *G. hirsutum* eficientes no silenciamento de um gene essencial para *H. armigera*, resultando na redução do crescimento e retardamento do desenvolvimento do inseto. *H. armigera* é um inseto herbívoro resistente ao gossipol (composto polifenólico das plantas do gênero *Gossypium*, que pode ser utilizado como antioxidante, estabilizante ou inseticida) do algodão, que é tóxico para muitos outros organismos. Essa resistência, como demonstrada pelos autores, é em grande parte desempenhada pelo gene *CYP6AE14*, uma monoxigenase P450. Na presença do gossipol, os insetos que se alimentaram das plantas produtoras do RNA dupla fita para *CYP6AE14* sofreram uma redução drástica de seu crescimento, e forte retardamento no desenvolvimento. De outra forma, quando o gossipol esteve ausente na dieta de *H. armigera*, o silenciamento de *CYP6AE14* não teve efeito algum sobre seu crescimento e desenvolvimento. Os autores demonstraram que o silenciamento via RNAi, ocasionado pela ingestão de RNA dupla fita, ocorreu de forma gene-específica, sendo, portanto, uma estratégia segura para o controle de pragas a campo.

Entre os alvos possíveis para o silenciamento via RNAi, os que oferecem as maiores chances de sucesso no controle de pragas são os genes essenciais, ou seja, aqueles que, quando silenciados, prejudicam processos essenciais à vida, podendo causar a morte do organismo. Baum et al. (2007) testaram 290 RNAs dupla fita de genes essenciais e encontraram 67 com efeitos significativos sobre a mortalidade de coleópteros, mesmo em baixa concentração.

A eficiência do silenciamento parece ser muito variável em função da forma de administração do RNA silenciador e da espécie-alvo. Jaubert-Possamai et al. (2007) encontraram uma eficiência de silenciamento de 30-40% em experimentos de microinjeção de RNA dupla fita longos (precursores dos pequenos

RNAs silenciadores), que está próxima à encontrada por Mutti et al. (2006) em experimentos de microinjeção de pequenos RNAs dupla fita (siRNA). Já nos experimentos realizados por Mao et al. (2007), em que os insetos foram alimentados com plantas produtoras dos RNAs silenciadores, foi observada uma supressão total da expressão do gene-alvo do inseto após 4-7 dias de alimentação contínua com as plantas transgênicas. Uma supressão quase completa da expressão de genes alvo em coleópteros foi também conseguida em experimentos utilizando uma fonte artificial de alimento contendo RNAs dupla fita (BAUM et al., 2007). Quando a eficiência de silenciamento é comparada entre espécies de insetos observa-se que, em afídeos, a supressão máxima conseguida está em torno de 40-50% (JAUBERT-POSSAMAI et al., 2007), enquanto para *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) já se alcançou uma eficiência de 95% (RAJAGOPAL et al., 2002) e de 62% em *D. melanogaster* (GOTO et al., 2003).

Acredita-se, atualmente, que a produção de plantas transgênicas que produzam RNAs dupla fita homólogos a genes essenciais aos insetos herbívoros possa se tornar uma forma eficaz de controle de pragas a campo, já que os insetos-alvo seriam controlados de forma autônoma, isto é, através da própria alimentação. Essa perspectiva fundamenta-se nos muitos resultados obtidos em experimentos de aquisição de RNAs silenciadores por alimentação e na própria anatomia do intestino médio dos insetos, que, por ser revestido por uma única camada de células rica em vilosidades e canais transportadores (HAKIM et al., 2010; LEHANE; BILLINGSLEY, 1996), acaba promovendo a aquisição dos RNAs silenciadores. Outro fator favorável ao uso do processo de RNAi é que uma grande variável de transcritos-alvo podem ser utilizados no silenciamento o que reduziria a pressão de seleção sobre os insetos herbívoros e, conseqüentemente, as chances de aparecimento de indivíduos resistentes.

5.4. Prospecção de novas fontes de resistência

A interação plantas-insetos herbívoros se dá nas mais variadas combinações de genótipos e ambientes, o que torna o seu processo de coevolução amplo e diverso. Por esta razão, as plantas e os insetos podem apresentar uma variada gama de mecanismos que os torna resistentes ao ataque ou capazes de driblar a resistência adquirida. Assim, ao considerar a coevolução como um processo dinâmico, devemos estar certos de que a resistência natural ou artificialmente adquirida por um organismo pode ser pouco duradoura ou muito duradoura, mas dificilmente poderá ocorrer de forma definitiva. Já a duração da resistência da planta será tanto maior quanto menor for a velocidade de evolução da resistência no inseto-alvo, ou seja, devemos nos concentrar em estratégias que reduzam a pressão de seleção sobre o alvo. É justamente neste aspecto que a prospecção de novos genes, que possam conferir resistência aos insetos, se encaixa. Utilizando mais de um gene de resistência em uma planta geneticamente modificada, por exemplo, é possível prolongar o aparecimento de indivíduos resistentes, principalmente se estes genes se relacionarem a fontes distintas de resistência, como uma toxina e um composto que atraia um inimigo natural do alvo, por exemplo.

A prospecção de genes importantes na interação planta-inseto tem o objetivo fundamental de auxiliar na elaboração dessas novas alternativas, tanto com a identificação de genes que tornam plantas resistentes ou suscetíveis ao ataque de insetos, quanto com a identificação de genes que estão associados à habilidade do inseto em burlar as defesas de seus hospedeiros. O conhecimento da fisiologia dos insetos resistentes a toxinas Bt, por exemplo, é importante para o descobrimento de novos alvos (genes ou polimorfismos genéticos). De outra forma, outras proteínas toxinas de Bt ou de outros

inimigos naturais dos insetos herbívoros podem também representar novas alternativas à resistência.

Nesse sentido, os estudos que visam à prospecção de novos genes importantes na interação planta-inseto herbívoro podem se concentrar na planta, através da identificação de RNAm expressos (transcritomas) (SMITH et al., 2010), proteínas (proteomas) (WEI et al., 2009) ou metabólitos (metabolomas) sintetizados em tecidos e momentos específicos da interação, ou podem se concentrar no inseto, através do uso das mesmas ferramentas aplicadas a tecidos ou momentos fundamentais para o sucesso da interação, tais como o estudo das proteínas digestivas secretadas no intestino médio e que viabilizam a herbivoria (CHI et al., 2009), ou o estudo de elementos reguladores da metamorfose (FU et al., 2009). Alternativamente, os estudos de prospecção podem ter como foco a interação de organismos-modelo para os quais já há elevada quantidade de conhecimento gerado (conhecimento genômico e de ferramentas para produção de alterações genéticas), tal como a interação *Arabidopsis-Scaptomyza flava* (*Drosophila*) (WHITEMAN et al., 2011), ou podem focar no estudo isolado de uma via ou mecanismo de resposta específico, através, por exemplo, da aplicação de um composto que sabidamente causa uma resposta de defesa direta na planta (MATTHES et al., 2010).

Estratégias diferentes podem ser úteis à prospecção gênica, entre elas as análises comparativas de transcritomas, proteomas, metabolomas e o estudo funcional de genes através da mutagênese, superexpressão e silenciamento gênico. Certamente, as análises comparativas podem ser exploradas como estratégias ideais para a prospecção global de genes importantes na interação planta-inseto. Tais análises podem ser conduzidas de forma a comparar genes importantes na interação inseto-planta em diferentes condições ambientais (BROEKGAARDEN et al.,

2008), em plantas resistentes e suscetíveis (LI et al., 2008), em plantas injuriadas por insetos distintos (EHLTING et al., 2008) e outros. As estratégias globais de prospecção alcançaram destaque especial com o uso das novas tecnologias de sequenciamento de DNA na caracterização de transcritomas (RNA-seq). Com as estratégias de RNA-seq, é possível gerar informação de bilhões de bases em corridas únicas (a um custo muito inferior do sequenciamento de Sanger), o que permite o acesso a genes regulatórios, representados por um ou poucos RNAs (GILARDONI et al., 2010), e cobertura de cDNAs completos (PAUCHET et al., 2010).

Embora as estratégias globais de prospecção gênica sejam potencialmente ilimitadas, o sucesso da identificação de candidatos reais depende da elaboração de um delineamento experimental eficiente. No trabalho desenvolvido por Li et al. (2008), os mecanismos de defesa de duas cultivares de soja, uma resistente e outra suscetível a um afídeo, foram estudados utilizando microarranjos de cDNA, sendo o tempo de coleta após infecção determinado em função do tempo necessário para o inseto alcançar os elementos de vaso do xilema na planta, cerca de 8 horas na cultivar resistente e 3,5 horas na cultivar suscetível.

O estudo em larga escala de metabólitos produzidos pelas plantas na presença dos insetos-praga também constitui uma possibilidade inovadora da busca de alternativas para o seu controle e a identificação de genes ou rotas metabólicas importantes. Em folhas de soja, Hoffmann-Campo (1995) observou que, constitutivamente, extratos de folhas da PI 227687 contêm isoflavonoide genistina e sete flavonóis glicosídicos, entre eles rutina. Piubelli et al. (2005), ao estudar extrato foliar dos genótipos resistentes a insetos PI 274454, 'IAC-100' e PI 229358, identificaram e quantificaram o flavonol rutina e o isoflavonoide genistina. Estas substâncias têm sido associadas à resistência de soja a desfolhadores. A sua identificação e o papel que desempenham nas interações

dos insetos com as plantas de soja podem orientar os geneticistas no sentido de mantê-las nas gerações descendentes, uma vez que fazem parte do arsenal de defesa das plantas contra herbívoros. Para estudar se a resistência a insetos dos genótipos PI 227687, PI 274454 e 'IAC 100' é devido a substâncias químicas presentes em sua constituição, utilizaram-se extratos desses genótipos misturados à dieta artificial. Pelos resultados obtidos, Piubelli (2004) e Piubelli et al. (2005) constataram que aqueles extratos afetam negativamente a biologia de *A. gemmatilis*. Adicionalmente, estudos realizados mostraram que o flavonol rutina provoca antibiose em *Trichoplusia ni* (Hübner, [1803]) (HOFFMANN-CAMPO et al., 2001) e na lagarta-da-soja (HOFFMANN-CAMPO et al., 2006).

Estudos com *N. viridula* alimentado com vagens de genótipos contendo diferentes teores de isoflavonas foram realizados por Piubelli et al. (2003b), observando-se que os genótipos resistentes (PI 227697 e 'IAC-100') possuem constitutivamente teores mais elevados de isoflavonas e provocam efeito negativo (maior mortalidade e menor ganho de peso) mais acentuado nos insetos.

De modo similar, trabalhos com percevejos demonstraram que a concentração das isoflavonas daidzina e genistina em sementes imaturas da PI 227687 e PI229358 aumentou após danos de *N. viridula*, afetando negativamente o comportamento do percevejo (PIUBELLI et al., 2003a). Ao se avaliar a produção de isoflavonas e gliceolinas 24, 48, 96, 120 e 240 h após terem sido danificadas por percevejos (TOLEDO, 2005), observou-se que as concentrações de isoflavonas, principalmente genistina e daidzina, que são substâncias precursoras das gliceolinas (GRAHAM et al., 1990), aumentaram 48 h após o ataque do percevejo nos grãos danificados, na maioria dos genótipos testados. Além disso, observou-se que indução de gliceolinas (fitoalexinas da soja) foi mais rápida nos genótipos resistentes a insetos.

No caso dos percevejos, apesar dos resultados interessantes já obtidos, por exemplo, a possibilidade de os danos destes insetos provocarem aumento nas concentrações de isoflavonas e induzirem a produção de gliceolinas (PIUBELLI et al., 2003b), muitos aspectos ainda carecem de mais estudos, considerando-se a importância dessa praga para a agricultura brasileira. Assim, estudos objetivando identificar e caracterizar quimicamente os compostos secundários nas folhas e nas vagens das principais fontes de resistência a essa praga são importantes e vêm sendo conduzidos nos laboratórios da Embrapa Soja.

Uma vez identificados, os genes potencialmente importantes na interação planta-inseto são normalmente testados em experimentos de perda de função através de mutagênese ou silenciamento antes de serem utilizados em eventos de transgenia. A mutagênese, apesar de poder ser aplicada a qualquer organismo vivo, representa uma estratégia muito laboriosa, cuja aplicação depende da seleção prévia de pelo menos um gene de interesse ou da análise de bancos de mutantes randômicos. Além disso, sabe-se que o efeito do gene mutado na planta transgênica pode variar em função do seu *background* genético, dificultando, assim, o isolamento do efeito do gene *per se*. Outro complicador que surge na avaliação da função do gene nas plantas mutadas é que apenas algumas variações são avaliadas.

Um dos exemplos mais conhecidos sobre o papel da mutagênese na prospecção de genes importantes na interação planta-inseto foi a identificação da proteína *coronatine insensitive 1* ou COI1. A COI1 foi inicialmente identificada em um *screening* por mutantes de *Arabidopsis* insensíveis à fitotoxina coronatina e ao ácido jasmônico (FEYS et al., 1994). Posteriormente, numerosos experimentos demonstraram que a deficiência na via de sinalização do ácido jasmônico (JA) causava aumento na suscetibilidade ao ataque de insetos herbívoros, entre eles

experimentos de silenciamento da proteína COI1 em *Nicotiana attenuata* Torr. ex S. Watson (PASCHOLD et al., 2007) .

O silenciamento gênico compreende uma estratégia de realização muito mais simples que a mutagênese, por se tratar de um evento direcionado, facilmente obtido com a alimentação do organismo-alvo com os RNAs silenciadores, injeção, cocultivo ou transformação genética (BELLÉS et al., 2010). Recentemente, foram produzidas plantas de tabaco transgênicas com elevada resistência a insetos herbívoros, em experimentos que tiveram como ponto de partida resultados de ensaios de superexpressão e silenciamento gênico. Os ensaios de Stracke et al. (2007) e Mehrtens et al. (2005) mostraram que o gene *Atmyb12* regula positivamente a síntese de fenilpropanoides. Posteriormente, Misra et al. (2010) demonstraram haver um acúmulo de fenilpropanoides nas plantas de tabaco resistentes a *S. litura* e *H. armigera* que expressam o gene *AtMyb12*. Um aspecto interessante deste trabalho é que o gene *AtMyb12* codifica para um fator de transcrição e, como tal, regula a expressão de vários genes. Assim, o seu uso em eventos de transgenia pode representar uma estratégia promissora ao desenvolvimento de plantas com resistência duradoura a insetos herbívoros.

O silenciamento gênico via RNAi é uma excelente estratégia, nos casos em que o mutante tem seu desenvolvimento impedido devido ao *knockout* no embrião e nos casos em que se deseja estudar a função de dois ou mais genes relacionados utilizando uma mesma molécula de RNA interferente. Steppuhn et al. (2010), por exemplo, induziram o silenciamento de duas alfa oxigenases de ácidos graxos (alfa-DOX) alfa-DOX1 e alfa-DOX2, normalmente induzidas em situações de estresse biótico e abiótico, utilizando uma mesma molécula de RNA interferente idêntica a uma região comum às duas enzimas.

De forma geral, a estratégia a ser adotada para a prospecção de genes importantes na interação planta-inseto depende, em

um primeiro momento, da quantidade de informação genômica disponível, em um segundo momento, da elaboração de um delineamento experimental que permita o alcance dos objetivos inicialmente propostos e, por último, deve ser finalizada com o estudo funcional dos genes candidatos. Embora a estratégia Bt para o controle de lepidópteros seja ainda a de maior importância mundial no controle pragas, novas fontes de resistência poderão funcionar de forma isolada ou poderão ainda ser somadas à estratégia Bt, de modo a favorecer a própria manutenção da resistência Bt nas plantas transgênicas comercializadas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As ferramentas de biologia molecular têm complementado as informações geradas pelos estudos morfológicos e de comportamento, contribuindo para o esclarecimento de problemas nas áreas de taxonomia, ecologia, genética de populações de pragas, parasitoides, predadores e microrganismos entomopatogênicos. Seu poder de resolução tem permitido o aumento do conhecimento sobre a ocorrência de espécies crípticas, diferenciação de raças de insetos, separação de espécies de microrganismos indistinguíveis por caracteres morfológicos. Essas ferramentas também têm ampla aplicação nos estudos de genética da resistência a inseticidas e toxinas e na determinação dos genes associados a esses fenômenos. Por outro lado, têm facilitado os trabalhos de melhoramento para resistência de plantas a insetos, assim como na transformação de organismos benéficos para incremento do potencial de controle de pragas. Considerando seu potencial e a redução dos custos de reagentes e simplificação de processos, espera-se uma aplicação crescente nos campos básicos e aplicados da Entomologia e suas áreas relacionadas.

De modo similar, as novas ferramentas de genotipagem e sequenciamento em larga escala têm permitido a identificação de

novos polimorfismos genéticos na soja, como os SNPs e Indels, que permitirão a caracterização mais detalhada de novas fontes de genes e QTLs, cruciais aos Programas de Melhoramento que visam ao desenvolvimento de variedades tolerantes a insetos e pragas.

O futuro do manejo de pragas em soja também não pode ser desvinculado do emprego de técnicas de transgenia. A adoção de cultivos de soja contendo os genes *Cry* é uma realidade certa no Brasil, em um futuro próximo, e novos eventos geneticamente modificados, por exemplo, com foco no silenciamento de genes do patógeno via estratégias de iRNA, já vêm sendo desenvolvidos e testados pela pesquisa. Finalmente, a associação de QTLs relacionados à resistência a insetos-praga da soja às plantas Bt e outros eventos transgenes será uma importante estratégia para o desenvolvimento de variedades com resistência mais duradoura aos principais insetos e pragas da cultura.

7. REFERÊNCIAS

- 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**, v. 102, p. 333-343, 2012.
- ALPHEY, L. Re-engineering the sterile insect technique. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 1243-1247, 2002.
- AMIRHUSIN, B.; SHADE, R.E.; KOIWA, H.; HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; MURDOCK, L.L.; ZHU-SALZMAN, K. Protease inhibitors from several classes work synergistically against *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, p. 734-740, 2007.
- ARIAS, C.A.A.; TOLEDO, J.F.F.; GAZZONI, D.L.; HOFFMANN-CAMPO, C.B. Desenvolvimento de germoplasma de soja resistente a insetos. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Resultados de pesquisa da Embrapa Soja 1998**. Londrina, 1999. p. 145-148.
- 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, p. 576-587, 2011.

- ARMOUR, J.A.L.; ALEGRE, A.S.; MILES, S.; WILLIAMS, L.J.; BADGE, R. Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA. In: GOLDSTEIN, D.B.; SCHLOTTERER, C. **Microsatellites evolution and applications**. Oxford University Press, 2000. p. 24-33.
- BARRO, P.J. de; DRIVER, F. Use of RAPD PCR to distinguish the B Biotype from other biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). **Australian Journal of Entomology**, v.36, p. 149-152, 1997.
- BAUM, J.A.; BOGAERT, T.; CLINTON, W.; HECK, G.R.; FELDMANN, P.; ILAGAN, O.; JOHNSON, S.; PLAETINCK, G.; MUNYIKWA, T.; PLEAU, M.; VAUGHN, T.; ROBERTS, J. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. **Nature Biotechnology**, v. 25, p.1322-1326, 2007.
- BAUR, M.E.; BOETHEL, D. Host plant resistance in IPM and the advances and restraints on Bt engineered soybean/crops. In: WORLD SOYBEAN CONFERENCE, 7.; INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 4.; CONGRESSO MUNDIAL DE SOJA (BRASILIAN SOYBEAN CONGRESS), 3., 2004. Foz do Iguaçu. **Proceedings...** Londrina: Embrapa Soja, 2004.
- BELLÉS, X. Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 111-28, 2010.
- BELLOWS JUNIOR, T.S.; PERRING, T.M.; GILL, R.J.; HEADRICK, D.H. Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, p. 195-206, 1994.
- BERRY, S.D.; FONDONG, V.N.; REY, C.; ROGAN, D.; FAUQUET, C.M.; BROWN, J.K. Molecular evidence for five distinct *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) geographic haplotypes associated with cassava plants in Sub-Saharan Africa. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 3, p. 852-859, 2004.
- BEHURA, S.K. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. **Molecular Ecology**, v.15, p. 3087-3113, 2006.
- BIDOCHKA, M.J.; KAMP, A. M.; LAVENDER, T. M.; DEKONING, J.; CROOS, J.N.A.D.E. Habitat association in two genetic groups of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*: uncovering cryptic species? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p.1335-1342, 2001.
- BISCHOFF, J.F.; REHNER, S.; HUMBER, R. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. **Mycologia**, v. 101, p. 512-530, 2009.
- BOERMA, H.R.; WALKER, D.R. Discovery and utilization of QTLs for insect resistance in soybean. **Genetica**, v. 123, p. 181-189, 2005.

- BOLTER, C.; JONGSMA, M.A. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v. 43, p. 885-895, 1997.
- BOUCIAS, D.G.; STOKES, C.; SUAZO, A.; FUNDERBURK, J. AFLP analysis of the entomopathogen *Nomuraea rileyi*. **Mycologia**, v. 92, p. 638-648, 2000.
- BRAVO, A.; GOMEZ, I.; CONDE, J.; MUNOZ-GARAY, C.; SANCHEZ, J.; MIRANDA, R.; ZHUANG, M.; GILL, S.S.; SOBERON, M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab poreforming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. **Biochimica Biophysica Acta Biomembranes**, v. 1667, p. 38-46, 2004.
- BRODERICK, N.A.; RAFFA, K.F.; HANDELSMAN, J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. **Proceedings National Academy of Science**, v. 103, p. 15196-15199, 2006.
- BROEKGAARDEN, C.; POELMAN, E.H.; STEENHUIS, G.; VOORRIPS, R.E.; DICKE, M.; VOSMAN, B. Responses of *Brassica oleracea* cultivars to infestation by the aphid *Brevicoryne brassicae*: an ecological and molecular approach. **Plant, Cell and Environment**, v. 31, p. 1592-1605, 2008.
- BROOKES, G.; BARFOOT, P. Global impact of biotech crops: environmental effects 1996-2008. **AgBioForum**, v. 13, p. 76-94, 2010.
- BUCHER, G.; SCHOLTEN, J.; KLINGLER, M. Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). **Current Biology**, v. 12, p. 85-86, 2002.
- BUENO, R.C.O.F.; PARRA, J.R.P.; BUENO, A. DE FREITAS; HADDAD, M.L. Desempenho de Tricogramatídeos como potenciais agentes de controle de *Pseudoplusia includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 389-394, 2009.
- BUSATO, G.R.; GRÜTZMACHER, A.D.; OLIVEIRA, A.C. de; VIEIRA, E.A.; ZIMMER, P.D.; KOPP, M.M.; BANDEIRA, J. de M.; MAGALHAES, T.R. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 709-716, 2004.
- CABRERA, N.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; MICHELI, A. Morphological and molecular characterization of a new species of *Diabrotica* (Coleoptera, Chrysomelidae, Galerucinae). **Zootaxa**, v. 1922, p. 33-46, 2008.
- CABRERA WALSH, G. Laboratory rearing and vital statistics of *Diabrotica speciosa* (Germar) and *Diabrotica viridula* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae), two species of South American pest rootworms. **Revista de la Sociedad Entomologica Argentina**, v. 60, p. 239-248, 2001.

- CERUTI, F.C.; LAZZARI, S.M.N. Utilização de bioensaios e marcadores moleculares para detecção da resistência de coleópteros de produtos armazenados a inseticidas. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 47, p. 447-453, 2003.
- CERVERA, M.T.; CABEZAS, J.A.; SIMÓN, B.; MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M.; BEITIA, F.; CENISA, J.L. Genetic relationships among biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on AFLP analysis. **Bulletin of Entomological Research**, v. 90, p. 391-396, 2000.
- CHAPUIS, M-P.; ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 621-31, 2007.
- CHEN, Y.; MENSAH, C.; DIFONZO C.; WANG, D. Identification of QTLs underlying soybean aphid resistance in PI 567541B. **ASACSSA- SSSA Annual Meeting**, p. 10-14, 2006.
- CHI, Y.H.; SALZMAN, R.A.; BALFE, S.; AHN, J.E.; SUN, W.; MOON, J.; YUN, D.J.; LEE, S. Y.; HIGGINS, T.J.V.; PITTENDRIGH, B.; MURDOC, L.L.; ZHU-SALZMAN, K. Cowpea bruchid midgut transcriptome response to a soybean cystatin – costs and benefits of counter-defence. **Insect Molecular Biology**, v. 18, p. 97-110, 2009.
- CIOCIOLA JUNIOR, A.; ZUCCHI, R.A.; STOUTHAMER, R. Molecular key to seven Brazilian species of *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) using sequences of the ITS2 region and restriction analysis. **Neotropical Entomology**, v. 30, p. 259-262, 2001.
- CLIVE, J. **Global status of commercialized biotech/GM crops**. Ithaca: ISAAA, 2010. (ISAAA Brief No. 42).
- COATES, B.S.; HELLMICH, R.L.; LEWIS, L.C. Allelic variation of a *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) minisatellite is independent of host range and geographic origin. **Genome**, v. 45, p. 125-132, 2002.
- DALY, T.; BUNTIN, G.D. Effect of *Bacillus thuringiensis* transgenic corn for Lepidopteran control on nontarget arthropods. **Environmental Entomology**, v. 34, p. 1292-1301, 2005.
- DONOVAN, W.P.; DONOVAN, J.C.; ENGLEMAN, J.T. Gene knockout demonstrates that vip3A contributes to the pathogenesis of *Bacillus thuringiensis* towards *Agrotis ipsilon* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, p. 45-51, 2001.
- EHLTING, J.; CHOWRIRA, S.G.; MATTHEUS, N.; AESCHLIMAN, D.S.; ARIMURA, G.I.; BOHLMANN, J. Comparative transcriptome analysis of *Arabidopsis thaliana* infested by diamond back moth (*Plutella xylostella*) larvae reveals signatures of stress response, secondary metabolism, and signalling. **BMC Genomics**, v. 9, p. 20, 2008.

ENKERLI, J.; WIDMER, F. Molecular ecology of fungal entomopathogens: molecular genetic tools and their applications in population and fate studies. **Biocontrol**, v. 55, p.17-37, 2010.

FANG, W.; LENG, B.; XIAO, Y.; JIN, K.; MA, J.; FAN, Y.; FENG, J.; YANG, X.; ZHANG, Y.; PEI, Y. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 363-370, 2005.

FEYS, B.J.F.; BENEDETTI, C.E.; PENFOLD, C.N.; TURNER, J.G. *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. **Plant Cell**, v. 6, p. 751-759, 1994.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.

FISCHHOFF, D.A.; BOWDISH, K.S.; PERLAK, F.J.; MARRONE, P.G.; MCCORMICK, S.M.; NIEDERMEYER, J.G.; DEAN, D.A.; KUSANOKRETZMER, K.; MAYER, E.J.; ROCHESTER, D.E.; ROGERS, S.G.; FRALEY, R.T. Insect tolerant transgenic tomato plants. **Nature Biotechnology**, v. 5, p. 807-813, 1987.

FOERSTER L.A.; AVANCI, M. Egg parasitoids of *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) in soybeans. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, p. 545-548, 1999.

FU, Q.; LIU, P.C.; WANG, J.X.; SONG, Q.S.; ZHAO, X.F. Proteomic identification of differentially expressed and phosphorylated proteins in epidermis involved in larval-pupal metamorphosis of *Helicoverpa armigera*. **BMC Genomics**, v. 10, p. 600, 2009.

GAUTHIER, N.; DALLEAU-CLOUET, C.; FARGUES, J.; BON, M.C. Microsatellite variability in the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*: genetic diversity and population structure. **Mycologia**, v. 99, p. 693-704, 2007.

GILARDONI, P.A.; SCHUCK, S.; JÜNGLING, R.; ROTTER, B.; BALDWIN, I.T.; BONAVENTURE, G. SuperSAGE analysis of the *Nicotiana attenuate* transcriptome after fatty acid-amino acid elicitation (FAC): identification of early mediators of insect responses. **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 66, 2010.

GILMAN, D.F.; MCPHERSON, R.M.; NEWSOM, L.D.; HERZOG, D.C. Resistance of soybean to the southern green stink bug. **Crop Science**, v. 22, p. 573-576, 1982.

GOTO, A.; BLANDIN, S.; ROYET, J.; REICHHART, J.M.; LEVASHINA, E.A. Silencing of toll pathway components by direct injection of double-stranded RNA into *Drosophila* adult flies. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 6619-6623, 2003.

GOUVÊA, L.; QUERINO, R.; SOSA-GÓMEZ, D.R. Incidência natural de *Trichogramma pretiosum* em ovos de *Anticarsia gemmatilis* coletados na soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 5.; MERCOSOJA 2009, Goiânia. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2009. Seção trabalhos, t. 266. 1 CD-ROM.

GRAHAM, T.L.; KIM, J.E.; GRAHAM, M.Y. Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 3, p. 157-166, 1990.

GUSE, C.A.; ONSTAD, D.W.; BUSCHMAN, L.L.; PORTER, P.; 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.

HAJIBABAEI, M.; JANZEN, D.H.; BURNS, J.M.; HALLWACHS, W.; HEBERT, P.D.N. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. **PNAS Natural History**, v. 103, p. 968-971, 2006.

HAKIM, R.S.; BALDWIN, K.; SMAGGHE, G. Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. **Annual Review of Entomology**, v. 55, p. 593-608, 2010.

HARWOOD, J.D.; DESNEUX, N.; YOO, H.J.S.; ROWLEY, D.L.; GREENSTONE, M.H.; OBRYCKI, J.J.; O'NEIL, R.J. Tracking the role of alternative prey in soybean aphid predation by *Orius insidiosus*: a molecular approach. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 4390-4400, 2007.

HEBERT, P.D.N.; CYWINSKA, A.; BALL, S.L.; DEWAARD, J.R. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of The Royal Society of London, Biological Sciences**, v. 270, p. 313-321, 2003.

HILL, C.B.; LI, Y.; HARTMAN, G.L. A single dominant gene for resistance to the soybean aphid in the soybean cultivar Dowling. **Crop Science**, v. 46, p. 1601-1605, 2006a.

HILL, C.B.; LI, Y.; HARTMAN, G.L. Soybean aphid resistance in soybean Jackson is controlled by a single dominant gene. **Crop Science**, v. 46, p. 1606-1608, 2006b.

HOFFMANN-CAMPO, C.B. **Role of the flavonoids in the natural resistance of soybean to *Heliothis virescens* (F.) and *Trichoplusia ni* (Hübner)**. 1995. 165 f. Ph.D. Dissertation, The University of Reading, Reading, 1995.

- HOFFMANN-CAMPO, C.B.; HARBORNE, J.B.; MICCAFFERRY, A.R. Pré-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 98, p. 181-194, 2001.
- HOFFMANN-CAMPO, C.B.; RAMOS NETO, J.A; OLIVEIRA, M.C.N. de; OLIVEIRA, L.J. Detrimental effect of rutin on a main soybean defoliator pest, *Anticarsia gemmatilis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1453-1459, 2006.
- HONGYU, Z.; ZINIU, Y.; WANGXI, D. Composition and ecological distribution of Cry proteins and their genotypes of *Bacillus thuringiensis* isolates from warehouses in China. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 76, p. 191-197, 2000.
- HUVENNE, H.; SMAGGHE, G. Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: A review. **Journal of Insect Physiology**, v. 56, p. 227-235, 2010.
- ILSI Health and Environmental Sciences Institute. **Evaluation of insect resistance management in Bt field corn; a science-based framework for risk assessment and risk management**. Washington: ILSI Press, 1998.
- JAUBERT-POSSAMAI, S.; TRIONNAIRE, G.L.; BONHOMME, J.; CHRISTOPHILES, G.K.; RISPE, C.; TAGU, D. Gene knockdown by RNAi in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. **BMC Biotechnology**, v. 7, p. 63, 2007.
- JINBO, U.; KATO, T.; ITO, M. Current progress in DNA *barcoding* and future implications for entomology. **Entomological Science**, v. 14, p. 107-124, 2011.
- JONES, R.T.; BAKKER, S.E.; STONE, D.; SHUTTLEWORTH S.N.; BOUNDS, S.; MCCART, C.; DABORN, P.J.; FFRENCH-CONSTANT, R.H.; VAN DEN ELSEN, J.M.H. Homology modelling of *Drosophila* cytochrome P450 enzymes associated with insecticide resistance. **Pest Management Science**, v. 66, p. 1106-1115, 2010.
- JOUANIN, L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MOTTOT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance – review. **Plant Science**, v. 131, p. 1-11, 1998.
- KANG, S.T.; MIAN, M.A.R.; HAMMOND R.B. Soybean aphid resistance in PI 243540 is controlled by a single dominant Gene. **Crop Science**, v. 48, p.1744-1748, 2008.
- KENNERDELL, J.R.; CARTHEW, R.W. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 Act in the wingless pathway. **Cell**, v. 95, p. 1017-1026, 1998.
- KILEN, T.C.; LAMBERT, L. Evidence for different genes controlling insect resistance in three soybean genotypes. **Crop Science**, v. 26, p. 869-871, 1986.

KIM, K.S.; BELLENDIR, S.; HUDSON, K.A.; HILL, C.B.; HARTMAN, G.L.; HYTEN, D.L.; HUDSON, M.E.; DIERS, B.W. Fine mapping the soybean aphid resistance gene Rag1 in soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 120, p. 1063-1071, 2010.

KIM, K.S.; SAPPINGTON, T.W. Genetic structuring of western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) population in United States based on microsatellite loci analysis. **Environmental Entomology**, v. 34, p. 494-503, 2005.

LAMBERT, L.; TYLER, J. An appraisal of insect resistant soybeans. In: WEBSTER, J.A.; WISEMAN, B.R. (Ed.) **Economic, environmental, and social benefits of insect resistance in field crops**. Lanham: Entomological Society of America, 1999. 189 p. Proceedings Thomas Say Publication in Entomology.

LEHANE, M.J.; BILLINGSLEY, P.F. (Ed.). **Biology of the insect midgut**. London: Chapman & Hall, 1996. 486 p.

LEWTER, J.; SZALANSKI, A.L.; NAGOSHI, R.N.; MEAGHER, R.L.; OWENS, C.B.; LUTTRELL, R.G. Genetic variation within and between strains of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, v. 89, p. 63-68, 2006.

LI, H.W.; LI, W.X.; DING, S.W. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. **Science**, v. 296, p. 1319-1321, 2002.

LI, Y.; HILL, C.B.; CARLSON, S.R.; DIERS, B.W.; HARTMAN, G.L. Soybean aphid resistance in the soybean cultivars Dowling and Jackson map to linkage group M. **Molecular Breeding**, v. 19, p. 25-34, 2007.

LI, Y.; ZOU, J.; LI, M.; BILGIN, D.D.; VODKIN, L.O.; HARTMAN, G.L.; CLOUGH, S.J. Soybean defense responses to the soybean aphid. **New Phytologist**, v. 179, p. 185-195, 2008.

LILLEY, C.J.; BAKHETIA, M.; CHARLTON, W.L.; URWIN, P.E. Recent progress in the development of RNA interference for plant parasitic nematodes. **Molecular Plant Pathology**, v. 8, p. 701-711, 2007.

LOURENÇÃO, A.L.; COSTA, A.S.; MIRANDA, M.A.C. de. Resistência de campo ao vírus da queima-do-broto em genótipos de soja resistentes a insetos. **Bragantia**, v. 48, p. 209-214, 1989.

LOURENÇÃO, A.L.; ROSSETO, C.J.; MIRANDA, M.A.C. de. Resistência de soja a insetos. III. Seleção de linhagens resistentes a percevejos. **Bragantia**, v. 44, p. 77-86, 1985.

LOPEZ, L.; MUNOZ-GARAY, C.; PROTA, H.; RODRIGUEZ-ALMAZAN, C.; SOBERON, M.; BRAVO, A. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Peptides**, v. 30, p. 589-595, 2009.

- LOPEZ-EDWARDS, M.; HERNANDEZ-MENDOZA, J.; PERCADOR-RUBIO, A.; MOLINA OCHOA, J.; LEZAMA-GUTIERREZ, R.; HAMM, J.; WISEMAN, B. Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in Mexico. **Florida Entomologist**, v. 82, p. 254-62, 1999.
- MCMANUS, B.L.; FULLER, B.W.; BOETEL, M.; FRENCH, B.W.; ELLSBURY, M M.; HEAD, G.P. Abundance of *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae) in corn rootworm-resistant Cry3Bb1 maize. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, p. 1992-1998, 2005.
- MANSOOR, S.; AMIN, I.; HUSSAIN, M.; ZAFAR, Y.; BRIDDON, R.W. Engineering novel traits in plants through RNA interference. **Trends in Plant Science**, v. 11, p. 559-565, 2006.
- MAO, Y.B.; CAI, W.J.; WANG, J.W.; HONG, G.J.; TAO, X.Y.; WANG, L.J.; HUANG, Y.P.; CHEN, X.Y. Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 1307-1313, 2007.
- MARGONAR, D.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; SILVA, J.J.; CORRÊA-FERREIRA, B.S. Determinação da variabilidade intra-específica e diferenciação de espécies de parasitóides e fungos entomopatogênicos. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 2008, Londrina. **Resumos expandidos...** Londrina: Embrapa Soja, 2008. p. 97-101. (Embrapa Soja. Documentos, 297).
- MATTHES, M.C.; BRUCE, T.J.A.; TON, J.; VERRIER, P.J.; PICKETT, J.A.; NAPIER, J.A. The transcriptome of cis-jasmone-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* and its role in indirect defence. **Planta**, v. 232, p. 1163-1180, 2010.
- MEHRTENS, F.; KRANZ, H.; BEDNAREK, P.; WEISSHAAR, B. The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulator of phenylpropanoid biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 138, p. 1083-1096, 2005.
- MENSAH, C.; DIFONZO, C.; NELSON, R.L.; WANG, D. Resistance to soybean aphid in early maturing soybean germplasm. **Crop Science**, v. 45, p. 2228-2233, 2005.
- MENSAH, C.; DIFONZO, C.; WANG, D. Inheritance of soybean aphid resistance in PI 567541B and PI 567598B. **ASA-CSSA-SSSA Annual Meetings**, November 10-14, Indianapolis, 2006.
- MEYER, A. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 9, p. 278-280, 1994.
- MIAN, M.A.R.; HAMMOND, R.B.; ST MARTIN, S.K. New plant introductions with resistance to the soybean aphid. **Crop Science**, v. 48, p.1055-1061, 2008a.

MIAN, M.A.R.; KANG, S.T.; BEIL, S.E.; HAMMOND, R.B. Genetic linkage mapping of the soybean aphid resistance gene in PI 243540. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 117, p. 955–962, 2008b.

MIRANDA, M.A.C. de; BRAGA, N.R.; LOURENÇÃO, A.L.; MIRANDA, F.T.S.; UNÊDA, S.H.; ITO, M.F. Descrição, produtividade e estabilidade da cultivar de soja IAC-24, resistente a insetos. **Bragantia**, v. 62, p. 29-37, 2003.

MISRA, P.; PANDEY, A.; TIWARI, M.; CHANDRASHEKAR, K.; SIDHU, O.P.; ASIF, M.H.; CHAKRABARTY, D.; SINGH, P.K.; TRIVEDI, P.K.; NATH, P.; TULI, R. Modulation of transcriptome and metabolome of tobacco by *Arabidopsis* transcription factor, AtMYB12, leads to insect resistance. **Plant Physiology**, v. 152, p. 2258-2268, 2010.

MÖLLER, M.; SANTOS, M.F.; MULATO, B.M.; ZUCCHI, M.I.; PINHEIRO, J.B. Desenvolvimento de marcadores microssatélites para o percevejo-pequeno da soja (*Piezodorus guildinii*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 5., 2009, Goiânia. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2009. 1 CD-ROM.

MORAES, R.R.; MARUNIAK, J.E. Detection and identification of multiple baculoviruses using the polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis. **Journal of Virological Methods**, v. 63, p. 209-217, 1997.

MORAES, R.R.; MARUNIAK, J.E.; FUNDERBURK, J.E. Methods for detection of *Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus DNA in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2307-2311, 1999.

MUTTI, N.S.; PARK, Y.; REESE, J.C.; REECK, G.R. RNAi knockdown of a salivary transcript leading to lethality in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. **Journal of Insect Science**, v. 6, p. 1-7, 2006.

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

NAGOSHI, R.N.; SILVIE, P.; MEAGHER, R.L. Comparison of haplotype frequencies differentiate fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) corn-strain populations from Florida and Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 100, p. 954-961, 2007.

NAKAZAWA, Y. QTL mapping of antibiosis resistance to common cutworm (*Spodoptera litura* Fabricius) in soybean. **Crop Science**, v. 45, p. 2044-2048, 2005.

NARANJO, S.E. Impacts of Bt transgenic cotton on integrated pest management. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5842-5851, 2011.

NARANJO, S.E. Long-term assessment of the effects of transgenic Bt cotton on the abundance of nontarget arthropod natural enemies. **Environmental Entomology**, v. 34, p. 1193-1210, 2005.

NARVEL, J.M.; WALKER, D.R.; RECTOR, B.G.; AIL, J.N.; PARROTT, W.A.; BOERMA, H.R. A retrospective DNA marker assessment of the development of insect resistant soybean. **Crop Science**, v. 41, p. 1931-1939, 2001.

NAVAJAS, M.; LAGNEL, J.; GUTIERREZ, J.; BOURSOT, P. Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal 1TS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism. **Heredity**, v. 80, p. 742-752, 1998.

NAVON, A. *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection – reality and prospects. **Crop Protection**, v. 19, p. 669-676, 2000.

OLIVEIRA, J.V. de C.; WOLF, J.L.C.; GARCIA-MARUNIAK, A.; RIBEIRO, B.M.; CASTRO, M.E. de; SOUZA, M.L. de; MOSCARDI, M.; MARUNIAK, J.E.; ZANOTTO, P.M.Z. Genome of the most widely used viral biopesticide: *Anticarsia gemmatilis* multiple nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 3233-3250, 2006.

O'REILLY, D.R.; MILLER, L.K. A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-glucosyl transferase. **Science**, v. 245, p. 1110-1112, 1989.

OSTERHOUT, C.V.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535-538, 2004.

PANIZZU, A.R.; SLANSKY JR., F. Review of phytophagous pentatomids (Hemiptera: Pentatomidae) associated with soybean in the Americas. **Florida Entomologist**, v. 68, p.184-214, 1985.

PAPANICOLAOU, A.; GEBAUER-JUNG, S.; BLAXTER, M.L.; OWEN McMILLAN, W.; JIGGINS, C.D. Butterfly base: a platform for lepidopteran genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. 582-587, 2008.

PAROLA, A.D.; MANZÁN, M.A.; LOZANO, M.E.; GHIRINGHELLI, P.D.; SCIOCCO-CAP, A.; ROMANOWSKI, V. Physical and genetic map of *Epinotia aporema* granulovirus genome. **Virus Genes**, v. 25, p. 329-341, 2002.

PARK S.; BROWN, T.M. Linkage of genes for sodium channel and cytochrome P450 (CYP6B10) in *Heliothis virescens*. **Pest Management Science**, v. 58, p. 209-212, 2002.

PASCHOLD, A.; HALITSCHKE, R. BALDWIN, I.T. Co(ii)-ordinating defenses: NaCOI1 mediates herbivore- induced resistance in *Nicotiana attenuata* and reveals the role of herbivore movement in avoiding defenses. **Plant Journal**, v. 51, p. 79-91, 2007.

PASHLEY, D.P.; JOHNSON, S.J. Genetic population structure of migratory moths: The velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 79, p. 26-30, 1986.

PAUCHET, Y.; WILKINSON, P.; VOGEL, H.; NELSON, D.R.; REYNOLDS, S.E.; HECKEL, D.G.; FFRENCH-CONSTANT, R.H. Pyrosequencing the *Manduca sexta* larval midgut transcriptome: messages for digestion, detoxification and defence. **Insect Molecular Biology**, v. 19, p. 61-75, 2010.

PAUL, J. **Gene found to help soybeans repel aphids**. Disponível em: <http://www.usatoday.com/tech/science/genetics/2004-11-02-anti-aphid-gene_x.htm>. Acesso em: 30 abr. 2008.

PAVA-RIPOLL, M.; ANGELINI, C.; FANG, W.; WANG, S.; POSADA, F.P.; ST LEGER, R. The rhizosphere-competent entomopathogen *Metarhizium anisopliae* expresses a specific subset of genes in plant root exudates. **Microbiology**, v. 157, p. 47-55, 2011.

PEFERÖEN, M. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 173-177, 1997.

PETEIRA, B.; PUERTAS, A.; HIDALGO-DÍAZ, L.; HIRSCH, P.R.; KERRY, B.R.; ATKINS, S.D. Real-time PCR to monitor and assess the efficacy of two types of inoculum of the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* against root-knot nematode populations in the field. **Biotechnologia Aplicada**, v. 22, p. 261-266, 2005.

PINEDO, F.J.R.; MOSCARDI, F.; LUQUE, T.; OLZEWSKI, J.A; RIBEIRO, B.M. Inactivation of the ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (egt) gene of *Anticarsia gemmatilis* nucleopolyhedrovirus (AgMNPV) improves its virulence towards its insect host. **Biological Control**, v. 27, p. 336-344, 2003.

PIUBELLI, G.C. **Bioatividade de genótipos de soja resistentes a *A. gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) e interações de suas substâncias químicas com inimigos naturais**. 2004. 126f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PIUBELLI, G.C.; CAMPO, C.B.H.; ARRUDA, I.C.; FRANCHINI, J.C.; LARA, F.M. Flavonoid increase in soybean genotypes as response of *Nezara viridula* injury and its effect on insect- feeding preference. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, p. 1223-1233, 2003a.

PIUBELLI, G.C.; CAMPO, C.B.H.; ARRUDA, I.C.; LARA, F.M. Nymphal development, lipid content, growth and weight gain of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae) fed on soybean genotypes. **Neotropical Entomology**, v. 32, p. 127-132, 2003b.

- PIUBELLI, G.C.; HOFFMANN-CAMPO, C.B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S.H.; OLIVEIRA, M.C.N. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatilis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, p. 1515-1531, 2005.
- RAJAGOPAL, R.; SIVAKUMAR, S.; AGRAWAL, N.; MALHOTRA, P.; BHATNAGAR, R.K. Silencing of midgut aminopeptidase N of *Spodoptera litura* by double-stranded RNA establishes its role as *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 46849-46851, 2002.
- RECTOR, B.G.; ALL, J.N.; PARROTT, W.A.; BOERMA, H.R. Quantitative trait loci for antibiosis resistance to corn earworm in soybean. **Crop Science**, v. 40, p. 233-238, 2000.
- REDDY, B.P.N.; RAO, B.P.; PRASAD, G.B.K.S.; RAGHAVENDRA, K. Identification and classification of detoxification enzymes from *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae). **Bioinformation**, v. 8, p. 430-436, 2012.
- REHNER, S.A.; MINNIS, A.M.; SUNG, G.H.; LUANGSA-ARD, J. J.; DEVOTTO, L. ; HUMBER, R.A. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. **Mycologia**, v. 103, p.1055-1073, 2011.
- RODERICK, G.K. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. **Annual Review of Entomology**, v. 41, p. 325-352, 1996.
- ROIGNANT, J.Y.; CARRE, C.; MUGAT, R.; SZYMCHAK, D.; LEPESANT, J.A.; ANTONIEWSKI, C. Absence of transitive and systemic pathways allows cell-specific and isoformspecific RNAi in *Drosophila*. **RNA**, v. 9, p. 299-308, 2003.
- ROSSETTO, C.J. Breeding for resistance to stink bugs. In: CONFERENCIA MUNDIAL DE INVESTIGACION EN SOJA, 4., 1989, Buenos Aires. **Actas...** Buenos Aires: AASOJA, 1989 v. 4. p. 2046-2060.
- ROSSETTO, C.J.; IGUE, T.; MIRANDA, M.A.C.; LORENÇÃO, A.L. Resistência de soja a insetos: VI. comportamento de genótipos de soja em relação a percevejos. **Bragantia**, v. 45, p. 323-335, 1986.
- ROSSETTO, C.J.; GALLO, P.B.; RAZERA, L.F.; BERTOLETTO, N.; IGUE, T.; MEDINA, P.F.; TISSELLI FILHO, O.; AGUILERA, V.; VEIGA, R.F.A.; PINHEIRO, J.B. Mechanisms of resistance to stink bug complex in the soybean cultivar 'IAC-100'. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, p. 517-522, 1995.
- ROSSETTO, C.J.; LORENÇÃO, A.L.; MIRANDA, M.A.C.; IGUE, T. Resistência de soja a insetos: II. Teste de livre escolha entre a linhagem IAC73-228 e o cultivar Paraná, infestados por *Nezara viridula* (L.) em telado. **Bragantia**, v. 43, p.141-153, 1984.

- ROSSETTO, C.J.; TISSELLI FILHO, O.; CIONE, J.; GALLO, P.B.; RAZERA, L.F.; TEIXEIRA, J.P.F.; BERTOLETTO, N. **Cultivar de soja 'IAC-100'**. Campinas: IAC, 1990. 1 folder.
- SANTOS, M.F.; MÖLLER, M.; MULATO, B.M.; ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO, J. B. Desenvolvimento de bibliotecas genômicas enriquecidas com microssatélites para *Euschistus heros* e *Nezara viridula*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 5., MERCOSOJA 2009, Goiânia. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 2009. 1 CD-ROM.
- SEIFERT, K.A. Progress towards DNA *barcoding* of fungi. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 83-89, 2009.
- SENTHILKUMAR, R.; CHENG, C-P.; YEH, K-W. Genetically pyramiding protease-inhibitor genes for dual broad-spectrum resistance against insect and phytopathogens in transgenic tobacco. **Plant Biotechnology Journal**, v. 8, p. 65-75, 2010.
- SCHNEPF, H.E.; WHITELEY, H.R. Cloning and expression of the *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, p. 2893-2897, 1981.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VANRIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J.; ZIEGLER, D.R.; DEAN, D.H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. **Microbiological and Molecular Biology Review**, v. 62, p. 775-806, 1998.
- SCIOCCO-CAP, A.; PAROLA, A.D.; GOLDBERG, A.V.; GHIRINGHELLI, P.D.; ROMANOWSKI, V. Characterization of a granulovirus isolated from *Epinotia aporema* Wals. (Lepidoptera: Tortricidae) larvae. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3702-3706, 2001.
- SHEPPARD, S.K.; BELL J.; SUNDERLAND, K.D.; FENLON, J.; SKERVIN, D.; SYMONDSON, W.O.C. Detection of secondary predation by PCR analysis of the gut contents of invertebrate generalist predators. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 4461-4468, 2005.
- SIJEN, T.; FLEENOR, J.; SIMMER, F.; THIJSSSEN, K.L.; PARRISH, S. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. **Cell**, v. 107, p. 465-476, 2001.
- SMITH, C.M.; LIU, X.; WANG, L.J.; LIU, X.; CHEN, M-S.; STARKEY, S.; BAI, J. Aphid feeding activates expression of a transcriptome of oxylipin-based defense signals in wheat involved in resistance to herbivory. **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, p. 260-276, 2010.
- SOSA-GÓMEZ D.R. Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 378-384, 2004.

- SOSA-GÓMEZ, D.R.; DELPIN, K.E.; ALMEIDA, A.; HIROSE, E. Genetic differentiation among Brazilian populations of *Euschistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) based on RAPD analysis. **Neotropical Entomology**, v. 33, p. 179-187, 2004.
- SOSA-GÓMEZ, D.R.; CORONEL, N.; BINNECK, E.; ZUCCHI, M.I.; ROSADO-NETO, G. RAPD and mitochondrial DNA analysis of the soybean stalk weevil *Sternechus subsignatus* (Coleoptera: Curculionidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 98, p. 475-481, 2008.
- SOSA-GÓMEZ, D.R.; HUMBER R.A.; HODGE, K.T.; BINNECK, E.; SILVA-BRANDÃO, K.L. Variability of the mitochondrial SSU rDNA of *Nomuraea* species and other entomopathogenic fungi from Hypocreales. **Mycopathologia**, v. 167, p. 145-154, 2009.
- SOSA-GÓMEZ, D.R.; SILVA, J.J. da; COSTA, F.; BINNECK, E.; MARIN, S.S.R.; NEPOMUCENO, A.L. Population structure of the Brazilian southern green stink bug, *Nezara viridula* L. (Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of Insect Science**, v. 5, p. 23, 2005. available online: insectscience.org/5.23.
- SOUZA, R.F.; TOLEDO, J.F.F. Genetic analysis of soybean resistance to stinkbug. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 18, p. 593-598, 1995.
- STEEVES, R.M.; TODD, T.C.; ESSIG, J.S.; TRICK, H.N. Transgenic soybeans expressing siRNAs specific to a major sperm protein gene suppress *Heterodera glycines* reproduction. **Functional Plant Biology**, v. 33, p. 991-999, 2006.
- STEPPUHN, A.; GAQUEREL, E.; BALDWIN, I.T. The two α -dox genes of *Nicotiana attenuata*: overlapping but distinct functions in development and stress responses. **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 171, 2010.
- ST. LEGER, R.J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. Construction of an improved mycoinsecticide over-expressing a toxic protease. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 93, p. 6349-6354, 1996.
- 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.
- STRACKE, R.; ISHIHARA, H.; HUEP, G.; BARSCH, A.; MEHRTENS, F.; NIEHAUS, K.; WEISSHAAR, B. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. **Plant Journal**, v. 50, p. 660-677, 2007.
- SUBRAMANIAN, A. S.; MOHANKUMAR, S. Genetic variability of the bollworm, *Helicoverpa armigera*, occurring on different host plants. **Journal of Insect Science**, v. 6, p. 1-8, 2006.

SUWANNAKUT, S.; BOUCIAS, D.G.; WIWAT, C. Genotypic analysis of *Nomuraea rileyi* collected from various noctuid hosts. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 90, p.169-176, 2005.

TABASHNIK, B.E.; GASSMANN, A.J.; CROWDER, D.W.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, v. 26, p. 199-202, 2008.

TIGANO, M.S.; ALJANABI, S. RAPD analysis of *Nomuraea rileyi*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 75, p. 240-242, 2000.

TERÁN-VARGAS, A.P.; RODRIGUEZ, J.C.; BLANCO, C.A.; MARTINEZ CARRILLO, J.L.; CIBRIAN TOVAR, J.; SANCHEZ ARROYO, H.; RODRÍGUEZ DEL BOSQUE, L.A.; STANLEY D. Bollgard cotton and resistance of the tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) to conventional insecticides in Southern Tamaulipas, Mexico. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, p. 2203-2209, 2005.

TOLEDO, A.M. Indução de isoflavonóides em soja por *Piezodorus guildinii* e efeito de extratos e de isoflavonóides na preferência alimentar de *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). 2005. 77f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Jaboticabal, 2005.

TOMOYASU, Y.; DENELL, R.E. Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. **Development Genes and Evolution**, v. 214, p. 575-578, 2004.

TURNER, C.T.; DAVY, M.W.; MACDIARMID, R.M.; PLUMMER, K.M.; BIRCH, N.P.; NEWCOMB, R.D. RNA interference in the light brown apple moth, *Epiphyas postvittana* (Walker) induced by double-stranded RNA feeding. **Insect Molecular Biology**, v. 15, p. 383-391, 2006.

TURNIPSEED, S.G.; SULLIVAN, M.J. Plant resistance in soybean insect management. In: WORLD SOYBEAN RESEARCH CONFERENCE, 1976. **Proceedings...** Donville: Interstate Printers & Publishers, 1976. p. 549-560.

VAN DUYN, J.W.; TURNIPSEED, S.G.; MAXWELL, J.D. Resistance in soybeans to the Mexican bean beetle. I. Sources of resistance. **Crop Science**, v.11, p. 572-573, 1971.

VAN DUYN, J.W.; TURNIPSEED, S.G.; MAXWELL, J.D. Resistance in soybeans to the Mexican bean beetle: II. Reactions of the beetle to resistant plants. **Crop Science**, v. 12, p. 561-562, 1972.

VEIGA, R.F.A.; ROSSETTO, C.J.; RAZERA, L.F.; GALLO, P.B.; BERTOLETTO, N.; MEDINA, P.F.; TISELLI FILHO, O.; CIONE, J. **Caracterização morfológica e agrônômica do cultivar de soja 'IAC-100'**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1999. 23 p. (IAC. Boletim Técnico, 177).

- VIRLA, E.G.V.; ALVAREZ, A.Á.; LOTO, F.; PERA, L.M.; BAIGORÍ, M. Fall Armyworm strains (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina, their mortality associate host plants and response to different mortality factors in laboratory. **The Florida Entomologist**, v. 91, p. 63-69, 2008.
- VOINNET, O. Induction and suppression of RNA silencing: Insights from viral infections. **Nature Review Genetics**, v. 6, p. 206-220, 2005.
- WANG, C.; SHAH, F.A.; PATEL, N.; LI, Z.; BUTT, T.M. Molecular investigation on strain genetic relatedness and population structure of *Beauveria bassiana*. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 908-915, 2003.
- WANG X.H.; ALIYARI, R.; LI, W.X.; LI, H.W.; KIM, K.; CARTHEW, R.; ATKINSON, P.; DING, S.W. RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. **Science**, v. 312, p. 452-454, 2006.
- WEI, Z.; HU, W.; LIN, Q.; CHENG, X.; TONG, M.; ZHU, L.; CHEN, R.; HE, G. Understanding rice plant resistance to the Brown Planthopper (*Nilaparvata lugens*): A proteomic approach. **Proteomics**, v. 9, p. 2798-2808, 2009.
- WHITEMAN, N.K.; GROEN, S.C.; CHEVASCO, D.; BEAR, A.; BECKWITH, N.; GREGORY, T.R.; DENOUX, C.; MAMMARELLA, N.; AUSUBEL, F.M.; PIERCE, N.E. Mining the plant-herbivore interface with a leafmining *Drosophila* of *Arabidopsis*. **Molecular Ecology**, v. 20, p. 995-1014, 2011.
- WINSTON, W.M.; MOLODOWITCH, C.; HUNTER, C.P. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. **Science**, v. 295, p. 2456-2459, 2002.
- YENCHO, G.C.; COHEN, M.B.; BYRNE, P.F. Applications of tagging and mapping insect resistance loci in plants. **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 393-422, 2000.
- ZHANG, G.; GU, C.; WANG, D. A novel locus for soybean aphid resistance. **Theoretical Applied and Genetics**, v. 120, p. 1183-1191, 2010.
- ZHANG, G.; GU, C.; WANG, D. Molecular mapping of soybean aphid resistance genes in PI 567541B. **Theoretical Applied Genetics**, v. 118, p. 473-482, 2009.
- ZHU-SALZMAN, K.; KOIWA, H.; SALZMAN, R.A.; SHADE, R.E.; AHN, J.E. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. **Insect Molecular Biology**, v. 12, p. 135-145, 2003.
- ZHU, S.; WALKER, D.R.; BOERMA, H.R.; ALL, J.N.; PARROTT, W.A. Effects of defoliating insect resistance QTLs and a cry1Ac transgene in soybean near-isogenic lines. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 116, p. 455-63, 2008.