

# **Análise da variabilidade genética de populações de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: noctuidae) ocorrendo em culturas de algodão e tomate**

Paulo Roberto Queiroz<sup>1</sup>  
Luzia Helena Corrêa Lima<sup>2</sup>

## **Resumo**

*Helicoverpa armigera* é uma das principais pragas polípagas de distribuição mundial das culturas de interesse econômico. A identificação dessa espécie por meio molecular auxilia no estabelecimento do perfil genético, na caracterização e no monitoramento das populações desse inseto da ordem Lepidoptera. O objetivo desse trabalho foi estabelecer uma metodologia de extração de DNA para *H. armigera*, determinar perfis eletroforéticos e analisar a variabilidade genética entre as populações desse inseto-praga. Os cinco iniciadores de RAPD produziram fragmentos de DNA que revelaram uma similaridade genética inferior a 80% entre as dez populações no dendrograma que foi gerado. Os resultados obtidos com as análises de variância molecular (AMOVA) revelaram que a elevada fonte de variação genética foi o resultado da variabilidade dentro de cada população. As causas que levaram a essa elevada variabilidade precisam ser mais bem estudadas nos países onde a praga ocorre.

**Palavras-chave:** Marcador molecular. RAPD. Tomate. Algodão.

## **1 Introdução**

As espécies de insetos da ordem Lepidoptera podem ser pragas específicas de determinadas plantas hospedeiras, assim como, atacar plantas de gêneros ou de

---

<sup>1</sup> PhD Biologia Animal. Universidade de Brasília – UnB. Professor do curso de Biomedicina UniCEUB; e-mail: pqsilva@uol.com.br

<sup>2</sup> PhD Biologia Molecular. Universidade de Brasília – UnB. Pesquisadora da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; e-mail: luzia@cenargen.embrapa.br

famílias botânicas variadas. As injúrias causadas por esses insetos são provocadas pela fase de larva e pode-se citar a formação de minas no parênquima foliar, desfolha, perfurações de caule e raiz, destruição das estruturas foliares, sementes e frutos (HOLLOWAY; BRADLEY; CARTER, 1987; PAULA et al., 2004).

A determinação das espécies de Lepidoptera baseia-se na análise dos caracteres morfológicos. Entretanto, outras estratégias podem ser utilizadas na identificação, tais como, a análise molecular. Essas são ferramentas úteis que auxiliam no estabelecimento do perfil genético dos insetos, caracterização e identificação de marcadores que sejam específicos para populações de lepidópteras de interesse quarentenário.

Dessa forma, a técnica de RAPD (WILLIAMS et al., 1990) tem sido muito utilizada por apresentar características que permitem a obtenção de um grande número de informações para a análise de genomas pouco conhecidos em termos de composição, uma vez que emprega a utilização de um único iniciador de sequência arbitrária com potencial de reconhecer regiões desconhecidas do DNA alvo. Os marcadores RAPD se baseiam na amplificação do DNA, gerando informações com simplicidade e rapidez a baixos custos. Assim, grande quantidade de polimorfismo, na forma de segmentos de DN é obtida em curto espaço de tempo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Uma característica desse tipo de marcador é o seu comportamento como genético dominante. Lembrando que a dominância, nesse caso, não se refere à interação genética entre alelos de um mesmo locus e sim à interpretação relativa entre fenótipo e genótipo (CIAMPI; MAGALHÃES, 2001).

Os marcadores RAPD tem sido utilizados na análise molecular de espécies de lepidópteras, tais como, *Anticarsia gemmatalis* (SOSA-GÓMEZ, 2004), *Plutella xylostela* (MARTINS et al., 2005) e *S. frugiperda* (NAGOSHI; MEAGHER, 2008).

A identificação e a diagnose correta das espécies dessa ordem são essenciais na elaboração de estratégias para o controle de pragas. *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga polífaga de importantes culturas de interesse agrônomo. Os indivíduos maduros alimentam-se em todos os estágios de desenvolvimento da planta, danificando as estruturas frutíferas e não frutíferas (JOHNSON; ZALUCKI, 2005). As larvas dessa espécie atacam ramos, flores e cápsulas da semente de plantas desenvolvidas (SANNINO, 2005). Essa praga se alimenta das partes da planta que são de maior valor para o consumo humano, provocando reduções na quantidade de alimentos disponíveis. Por exemplo, as perdas anuais na produção de feijão-guandu provocadas por *H. armigera* são estimadas em US\$ 317 milhões no mundo todo (SHANOWER et al., 1999).

## **2 Objetivo**

Estabelecer uma metodologia de extração de DNA para *H. armigera*, visando determinar perfis eletroforéticos para essa praga exótica e analisar a variabilidade genética entre larvas desse inseto coletadas em culturas de algodão e tomate em quatro localidades de Burkina Faso, África.

## **3 Material e métodos**

### **3.1 Insetos**

Larvas de *H. armigera* encontradas nas culturas de algodão e tomate provenientes das localidades de Soumousso, N'Dorola, Gaoua e Réo em Burkina Faso foram coletadas pela técnica de pano de batida, armazenadas em etanol 95% a 4 °C e submetidas a identificação molecular (Tabela 1).

**Tabela 1.** Indivíduos de *H. armigera* coletados em culturas de algodão e tomate em quatro localidades de Burkina Faso e utilizados nos experimentos de identificação molecular.

Amostra	Data de coleta	Cultura	Província de Burkina Faso	Localização geográfica
AlSo1	7 de setembro de 2001	Algodão	Soumoussou	
AlSo2	11 de novembro de 2001	Algodão	Soumoussou	11° 1' 0" North, 4° 3' 0" West.
ToSo3	7 de janeiro de 2002	Tomate	Soumoussou	
AlND4	6 de setembro de 2001	Algodão	N'Dorola	
AlND5	13 de novembro de 2001	Algodão	N'Dorola	11° 25' 0" North, 5° 0' 0" West
ToND6	17 de janeiro de 2002	Tomate	N'Dorola	
AlGa7	12 de outubro de 2001	Algodão	Gaoua	10° 19' 0" North, 3° 10' 0" West
ToGa8	25 de janeiro de 2002	Tomate	Gaoua	
AlRe9	12 de outubro de 2001	Algodão	Réo	12° 19' 0" North, 2° 28' 0" West
ToRe10	24 de janeiro de 2002	Tomate	Réo	

### 3.3 Obtenção de ácidos nucleicos

Para a obtenção dos ácidos nucleicos totais, utilizou-se a metade posterior de cinco larvas de terceiro ínstar de indivíduos de *H. armigera* que foram coletados em cada uma das várias localidades de Burkina Faso. Essas amostras foram submetidas à extração de DNA (QUEIROZ et al., 2004) adicionando-se 500 µL de tampão de extração (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, Triton X-100 0,3% e Proteinase K 120 µg.mL<sup>-1</sup>) e incubando-se por 60 min a 65 °C. O homogenato foi centrifugado por 10 min a 10.000xg e, o sobrenadante, transferido para um novo tubo plástico de 1,5 mL. Adicionou-se 500 µL de fenol/clorofórmio/álcool

isoamílico (25:24:1) e as fases foram homogeneizadas em vortex por 30 s. O material foi centrifugado por 10 min a 10.000xg a 10°C. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo plástico de 1,5 mL, repetindo-se o tratamento com 500 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico.

O DNA foi precipitado pela adição de 30 µL de NaCl 5 M e 1 mL de etanol absoluto incubando-se por 2 h a -20 °C. Após centrifugação a 10.000xg por 10 min a 10 °C, o DNA precipitado foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70%, seco, ressuspensão em tampão TE 0,1X (Tris-HCl 1 mM pH 8, EDTA 0,1 mM) e armazenado a -20 °C.

Para as análises moleculares, utilizou-se o DNA diluído em tampão TE 0,1X para se obter uma concentração final de 20 ng.µL<sup>-1</sup>.

### 3.4 Reações de RAPD

Para os estudos de identificação molecular, o DNA extraído de cada uma das amostras foi utilizado em 30 µL de uma reação contendo tampão Tris-HCl 6 mM (pH 8,8), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTP's 0,2 mM, 0,4 µM de um oligonucleotídeo de sequência aleatória da Operon Technologies, Inc. (Tabela 2), 2,5 U.µL<sup>-1</sup> de *Taq* DNA polimerase (Amersham Health Care) e 5 µL de DNA (20 ng.µL<sup>-1</sup>).

**Tabela 2.** Iniciadores decaméricos utilizados nas reações de RAPD para a identificação molecular de *H. armigera*.

Iniciador	Sequência (5' → 3')
OPA-02	TGC CGA GCT G
OPA-03	AGT CAG CCA C
OPA-04	AAT CGG GCT G
OPA-10	GTG ATC GCA G
OPA-13	CAG CAC CCA C

### 3.5 Ciclos de amplificação

As amplificações foram efetuadas em termociclador (PTC 100 MJ Research) programado para 45 ciclos, contendo uma etapa inicial de desnaturação de 3 min a 94 °C. Cada ciclo foi constituído de uma etapa de desnaturação de 1 min a 93 °C, anelamento por 1 min a 35 °C e extensão por 2 min a 72 °C. Após os ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 5 min a 72 °C.

### 3.6 Obtenção de perfis eletroforéticos

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5% submerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 9 mM e EDTA 1 mM), fotografados e arquivados no sistema Eagleeye. Em todos os géis, marcadores de massa molecular (Leader 100 bp - GIBCO) foram usados para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados.

### 3.7 Análise dos dados

As fotos das amplificações com os vários oligonucleotídeos foram usadas para a análise do polimorfismo entre os indivíduos de uma mesma população e entre as populações em estudo. Os fragmentos de DNA presentes nos géis foram considerados como marcadores RAPD. Foi gerada, então, uma matriz de similaridade, levando-se em consideração a relação entre indivíduo, iniciador e massas moleculares dos fragmentos obtidos com um dado iniciador. Utilizou-se como padrão o valor 1 para a presença de um marcador. Na ausência de marcador, atribuiu-se o valor 0. No caso de dúvida, o número 9 foi usado como padrão. A seguir, a planilha obtida foi submetida a um programa de análise estatística multivariada para a determinação das similaridades entre os indivíduos. O programa usado foi o NTSYS-pc versão 2.02 (RHOLF, 1993) e teve como função a análise estatística multivariada de diferentes análises com matrizes de similaridade. A matriz de similaridade e agrupamento para essa análise foi feita por UPGMA (Unweighted

PairGroup Method, Arithmetic Average), agrupando os indivíduos par a par e determinando um dendrograma.

A seguir, os valores obtidos e tabelados em uma planilha foram submetidos à análise de variância molecular (AMOVA) para a determinação estatística das possíveis origens das variabilidades encontradas nas populações pela aplicação de algoritmos específicos pelo programa Arlequin ver. 2000 (SCHNEIDER; ROESSLI; EXCOFFIER, 2000).

### **3.8 Resultados**

#### **3.8.1 Extração de DNA e reações de RAPD**

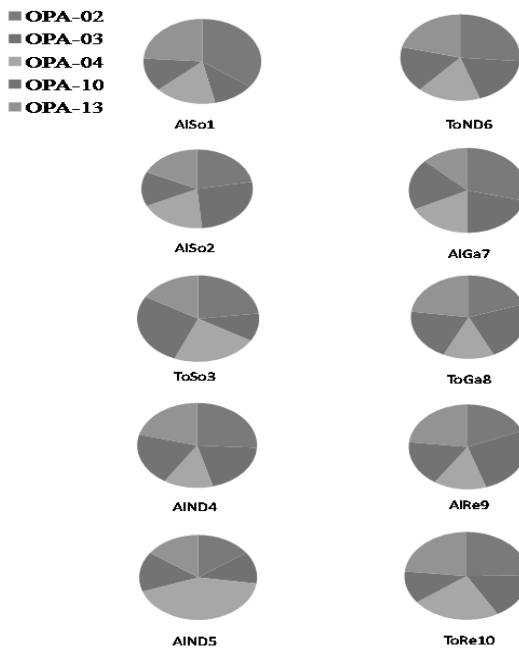
O sucesso na obtenção de marcadores moleculares via RAPD é dependente da qualidade do DNA obtido a partir dos tecidos do inseto. A técnica de extração de DNA que foi adaptada para esse trabalho forneceu DNA com quantidade (em torno de  $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) e qualidade ( $260 \text{ nm} / 280 \text{ nm} = 0,8$ ) para analisar a variabilidade genética de dez populações de *H. armigera*, utilizando-se apenas cinco iniciadores de RAPD.

Os vários iniciadores de RAPD produziram 61 fragmentos de amplificação com uma média de  $12,2 \pm 5,2$  fragmentos por oligonucleotídeo. Os iniciadores OPA-03 e OPA-13 produziram 15 fragmentos de DNA, seguindo-se os iniciadores OPA-02 e OPA-10 com 14 fragmentos. O iniciador OPA-04 gerou apenas 4 fragmentos.

Analisando-se os 61 fragmentos gerados pela técnica de RAPD, observou-se que apenas 2 fragmentos (3,28%) foram isomórficos e 59 (96,72%) foram polimórficos.

Em seguida, analisou-se a contribuição de cada iniciador de RAPD para revelar a variabilidade genética de cada população de *H. armigera* analisada neste estudo (Figura 1).

**Figura 1** – Distribuição dos fragmentos gerados pelos cinco iniciadores de RAPD em dez populações de *H. armigera* coletadas em culturas de algodão e tomate em três localidades de Burkina Faso. Os códigos indicam: AlSo1, Algodão Soumouso 1; AlSo2, Algodão Soumouso 2; ToSo3, Tomate Soumouso 3; AlND4, Algodão N'Dorola 4; AlND5, Algodão N'Dorola 5; ToND6, Tomate N'Dorola 6; AlGa7, Algodão Gaoua 7; ToGa8, Tomate Gaoua 8; AlRe9, Algodão Réo 9; ToRe10, Tomate Réo 10.



O iniciador OPA-02 gerou o maior número de fragmentos de RAPD para as populações de *H. armigera* provenientes de culturas de algodão de Soumouso (AlSo1), 35,2%, algodão de N'Dorola (AlND4), 25,9%, tomate de N'Dorola (ToND6) 26,3%, algodão de Gaoua (AlGa7), 29,0% e tomate de Réo (ToRe10), 24,7%. Em seguida, o oligonucleotídeo OPA-03, com 26,4% para a população proveniente da cultura de algodão de Soumouso (AlSo2), tomate de Gaoua (ToGa8), com 22,9% e algodão de Réo (AlRe9), com 26,1%.

Observou-se ainda que o oligonucleotídeo OPA-04 gerou o maior número de fragmentos de RAPD por população, ou seja, 42,4% para a amostra proveniente da cultura de algodão de N'Dorola (AlND4).



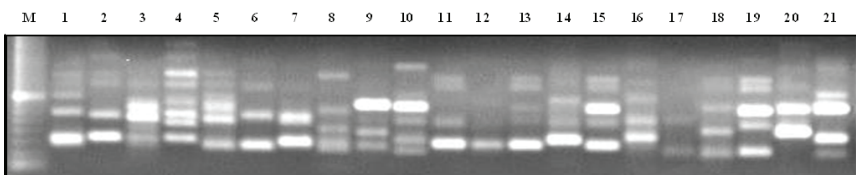
Por sua vez, o iniciador OPA-03 produziu o menor número de fragmentos de RAPD por população, ou seja, apenas para a população proveniente de tomate de Soumouso (ToSo3) com 10,3%.

A partir dessas informações, foi possível determinar que os iniciadores OPA-02 e OPA-03 contribuíram com 80% dos fragmentos gerados pela técnica de RAPD para as populações analisadas neste estudo.

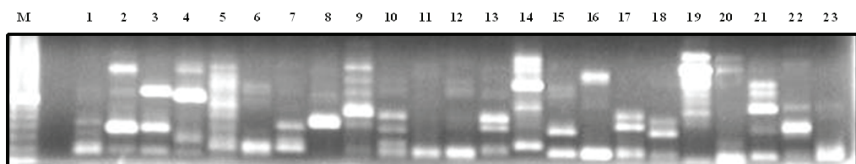
### 3.8.2 Identificação molecular de *H. armigera* por RAPD

A partir da adaptação da metodologia de extração de DNA para *H. armigera*, foram obtidos diferentes perfis eletroforéticos entre os indivíduos analisados, utilizando-se os cinco iniciadores nas reações de RAPD. Empregando-se o iniciador OPA-02 nas reações de amplificação, observaram-se diferentes perfis moleculares entre os indivíduos de uma mesma população, como também, entre populações distintas (Figuras 2 e 3).

**Figura 2** – Perfis eletroforéticos de *H. armigera* obtidos com o iniciador OPA-02. Os números indicam: 1 a 5, tomate em N'Dorola; 6 a 10, algodão em Gaoua; 11 a 15, tomate em Gaoua; 16 a 20, algodão em Réo; 21 a 23, tomate em Réo. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder.



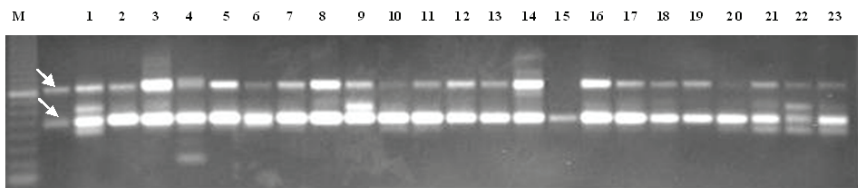
**Figura 3** – Perfis eletroforéticos de *H. armigera* obtidos com o iniciador OPA-02. Os números indicam: 1 a 5, algodão em Soumouso; 6 a 10, algodão em Soumouso; 11 a 15, tomate em Soumouso; 16 a 20, algodão em N'Dorola, e 21, algodão em N'Dorola. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder.



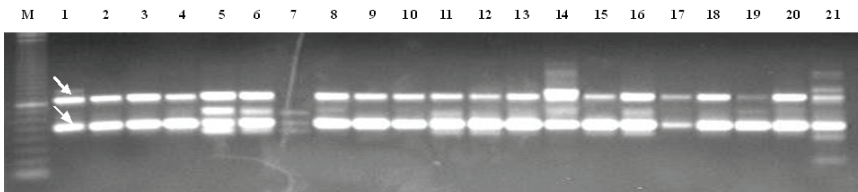
Empregando-se o oligonucleotídio OPA-02 não foi possível identificar qualquer padrão isomórfico entre os indivíduos dessa espécie. Contudo, a utilização desse iniciador revelou a variabilidade genética existente entre as populações de *H. armigera* analisadas neste estudo.

Resultado diferente foi obtido com o oligonucleotídio OPA-10, no qual foram identificados dois fragmentos isomórficos em todas as populações de *H. armigera* analisadas. (Figuras 4 e 5).

**Figura 4** – Perfis eletroforéticos de *H. armigera* obtidos com o oligonucleotídio OPA-10. Populações coletadas de: 1 a 5, tomate em N<sup>o</sup>Dorola; 6 a 10, algodão em Gaoua; 11 a 15, tomate em Gaoua; 16 a 20, algodão em Réo; 21 a 23, tomate em Réo. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder. As setas indicam os fragmentos de 500 pb e de 850 pb.



**Figura 5** – Perfis eletroforéticos de *H. armigera* obtidos com o oligonucleotídio OPA-10. Populações coletadas de: 1 a 5, algodão em Soumouso; 6 a 10, algodão em Soumouso; 11 a 15, tomate em Soumouso; 16 a 20, algodão em N<sup>o</sup>Dorola, e 21, algodão em N<sup>o</sup>Dorola. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder. As setas indicam os fragmentos de 500 pb e de 850 pb.



O uso do iniciador OPA-10 nas reações de amplificação por RAPD produziu fragmentos de 500 pb e de 850 pb, que foram identificados nos indivíduos de todas as populações de *H. armigera* recebidas para a determinação dos perfis eletroforéticos de RAPD. Os fragmentos de DNA gerados pelo iniciador OPA-10

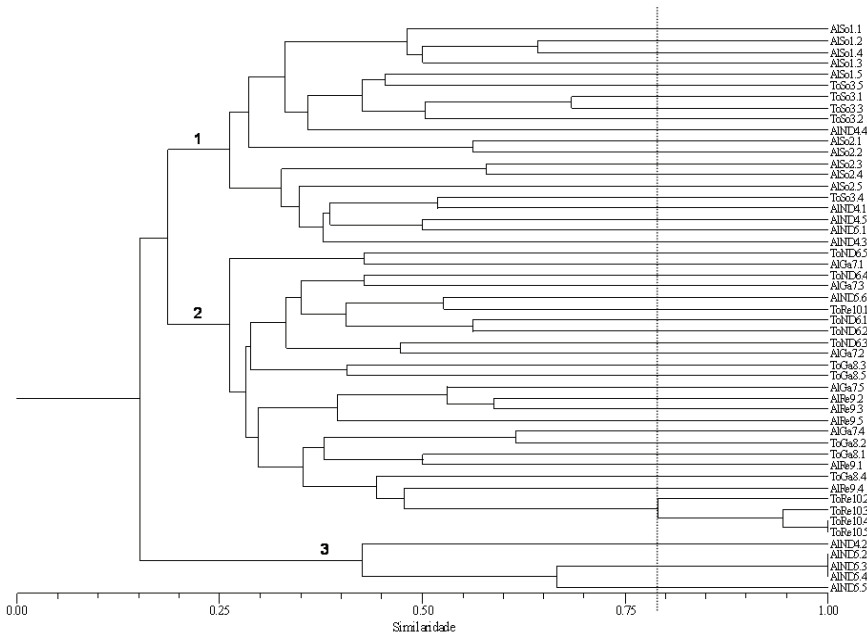
apresentam potencial para o desenvolvimento de marcadores específicos para a identificação dessa espécie a partir de populações coletadas em diferentes plantas hospedeiras e/ou regiões geográficas.

Para os demais oligonucleotídeos, observou-se uma variação no padrão de marcadores RAPD entre os indivíduos. Contudo, mesmo com a utilização de poucos iniciadores, foi possível identificar polimorfismos entre os indivíduos analisados. A partir dessa informação, o polimorfismo produzido por cada organismo foi então utilizado para a determinação da matriz de distância genética (Figura 6).

**Figura 6** - Matriz de distância genética entre os indivíduos de dez populações de *H. armigera*. Os códigos indicam: AlSo1, Algodão Soumoussou; AlSo2, Algodão Soumoussou; ToSo3, Tomate Soumoussou; AIND4, Algodão N'Dorola; AIND5, Algodão N'Dorola; ToND6, Tomate N'Dorola; AIGA7, Algodão Gaoua; ToGA8, Tomate Gaoua; AIRE9, Algodão Réo; ToRE10, Tomate Réo. Em vermelho estão indicados o maior e o menor índice de distância genética entre os indivíduos analisados nesse estudo.

A partir da organização dos dados binários produzidos pelos marcadores RAPD, obteve-se a matriz de distância genética entre os vários indivíduos analisados. A distância genética variou de 2%, entre os indivíduos AIND5. 3 e AIND5.5, pertencentes a uma mesma população coletada na cultura de algodão em N'Dorola; a 56%, entre os indivíduos ToGA8.4 e AIND5.1, originários de populações coletadas em tomate (Gaoua) e algodão (N'Dorola). A partir dessas informações, observou-se uma elevada variabilidade genética entre as populações em análise.

A seguir, os dados binários correspondentes aos vários indivíduos foram utilizados para a determinação de um dendrograma para o estabelecimento das relações filogenéticas entre as dez populações de *H. armigera* (Figura 7).



**Figura 7** - Dendrograma construído a partir de dados de RAPD das dez populações de *H. armigera* coletadas em culturas de algodão e tomate em três localidades de Burkina Faso. Os códigos indicam: AlSo1, Algodão Soumouso; AlSo2, Algodão Soumouso; ToSo3, Tomate Soumouso; AlND4, Algodão N'Dorola; AlND5, Algodão N'Dorola; ToND6, Tomate N'Dorola; AlGa7, Algodão Gaoua; ToGa8, Tomate Gaoua; AlRe9, Algodão Réo; ToRe10, Tomate Réo. A linha pontilhada vertical indica o limite máximo de similaridade encontrado entre as populações de *H. armigera*.

A análise do dendrograma permitiu identificar três agrupamentos principais. Os indivíduos componentes do grupo 1 foram constituídos pelas duas populações coletadas em algodão (Soumouso), uma em tomate (Soumouso) e uma em algodão (N'Dorola). As populações constituintes do agrupamento 2 foram coletadas em tomate (N'Dorola), algodão (Gaoua), algodão (N'Dorola), tomate (Réo), tomate (Gaoua) e algodão (Réo). Esses dois agrupamentos apresentaram, entre si, aproximadamente 20% de similaridade genética. O agrupamento 3 foi composto

apenas por uma população coletada em algodão em N'Dorola. Essa população apresentou em torno de 15% de similaridade genética em relação aos grupos 1 e 2. Dos resultados analisados no dendrograma, observou-se que a similaridade genética entre as populações de *H. armigera* foi inferior a 80%, indicando uma alta variabilidade genética entre os indivíduos que foram analisados neste estudo. A exceção ficou apenas para a população coletada em tomate (Réo) que apresentou índices de similaridade superiores a 80%.

Para a confirmação e validação estatística dos resultados obtidos, realizou-se a seguir uma análise de variância molecular (AMOVA) para a determinação das fontes de variação genética que foram observadas nos agrupamentos no dendrograma.

A primeira análise consistiu em determinar a fonte de variação, quando todas as populações foram consideradas, independentemente da cultura e do local de coleta. Os dados de AMOVA revelaram que 24,26% da variação observada eram provenientes de variações entre os grupos e que 75,74% eram de variações observadas dentro da população. Analisando-se posteriormente os indivíduos em relação às respectivas plantas hospedeiras, observou-se que, para a cultura de algodão, 23,53% da variação obtida eram originárias de variações entre as populações e que, 76,47% estavam associadas a variações dentro das populações de *H. armigera*. Para a cultura de tomate, foram obtidos valores muito semelhantes, ou seja, 23,48% de variação entre populações e 76,52%, dentro da população.

A influência das localidades na distribuição das populações de *H. armigera* foi também analisada. Os resultados indicaram 9,07% de variação era entre os grupos, 16,42% entre populações nos grupos e 74,51% dentro das populações. Das análises de similaridade genética e de AMOVA, observou-se uma elevada variabilidade genética dentro dos grupos analisados.

### **3.9 Discussão**

Em virtude de seu amplo espectro de uso, a técnica de RAPD tem sido aplicada em diferentes níveis de estudo molecular de populações e espécies

relacionadas de lepidópteras. Por exemplo, Fakrudin et al. (2004) empregaram 25 iniciadores de RAPD para analisar a variabilidade genética de populações de *H. armigera* ocorrendo em 12 áreas produtoras de algodão no sul da Índia. Os 497 fragmentos de RAPD produziram perfis eletroforéticos característicos para cada uma das populações, revelando elevada variabilidade genética entre elas. O dendrograma gerado revelou dois grupos principais com 22% de similaridade genética. Os autores sugerem que a alta variabilidade genética encontrada entre as populações de *H. armigera* poderia ser devido a barreiras topológicas e a temporais que poderiam influenciar no isolamento e no fluxo gênico entre as populações desse Lepidoptera.

Ainda, com relação à distância genética e ao fluxo gênico em lepidópteras, Sosa-Gómez (2004), utilizando a técnica de RAPD, analisou a variabilidade genética de *A. gemmatalis* ocorrendo em cinco localidades do Brasil e uma da Argentina. Os resultados de RAPD indicaram que existia uma grande diferença genética entre os indivíduos presentes nesses dois países. Entretanto, foi possível sugerir a possibilidade de eventos migratórios entre indivíduos presentes em localidades distantes.

Zhou et al. (2000) analisaram cinco populações de *H. armigera* ocorrendo em Israel e uma população ocorrendo na Turquia. Os autores utilizaram três iniciadores de RAPD que produziram 84 *loci* polimórficos que foram utilizados para estimar a relação filogenética entre essas populações. Os resultados de RAPD revelaram uma baixa distância genética, indicando um elevado fluxo gênico entre tais populações.

Para os indivíduos de *H. armigera* analisados nesse trabalho, observou-se uma elevada variabilidade genética dentro das populações, mas uma baixa variação entre elas. Isso sugere a possibilidade de eventos migratórios com consequente fluxo gênico entre populações de áreas distantes, tais como, N<sup>o</sup>Dorola, Gaoua e Réo, uma vez que os indivíduos coletados nessas três localidades se agruparam no mesmo clado do dendrograma. O mesmo resultado foi observado para as populações de Soumosso e N<sup>o</sup>Dorola.

Além disso, a partir dos marcadores moleculares gerados por RAPD, foi possível o desenvolvimento de oligonucleotídeos específicos para várias espécies de insetos. Essa estratégia foi aplicada por Agusti, De Vicente e Gabarra (1999) que desenvolveram iniciadores específicos para a detecção de *H. armigera* no intestino de possíveis predadores dessa espécie, como *Dicyphus tamaninii* (Heteroptera: Miridae). A partir de um fragmento de 1200 pb presente apenas em *H. armigera* e ausente em *D. tamaninii*, foi possível detectar a presença do inseto no intestino do seu respectivo predador.

Neste estudo, foram obtidos com o iniciador OPA-10 fragmentos de 500 pb e de 850 pb nos indivíduos de todas as populações de *H. armigera*. Esses fragmentos são alvos potenciais para o desenvolvimento de novos marcadores a serem amplificados em reações de PCR. A vantagem dessa estratégia é a obtenção de novas técnicas moleculares de detecção de pragas por métodos mais robustos que os marcadores RAPD.

#### **4 Conclusão**

A metodologia de extração foi adequada para a obtenção de DNA, como também os iniciadores de RAPD forneceram perfis moleculares para a identificação de *H. armigera*.

A técnica de RAPD mostrou-se útil na determinação de fragmentos de DNA comuns a todos os indivíduos nas dez populações analisadas, empregando-se apenas cinco iniciadores.

Observou-se elevada variabilidade genética dentro das populações dessa lepidóptera em Burkina Faso. Entretanto, houve baixa variação entre as populações.

Os dados gerados por RAPD sugerem processos migratórios com consequente fluxo gênico entre as populações de *H. armigera*.

## Genetic variability analysis of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: noctuidae) populations in crops of cotton and tomato

### Abstract

*Helicoverpa armigera* is a major polyphagous pest of worldwide distribution of crops of economic interest. The identification of this species by molecular markers is important to establish the genetic profile for the characterization and monitoring of populations of this Lepidoptera. The aim of this study was to establish a method for extraction of DNA from *H. armigera* and determine electrophoretic profiles and analyze the genetic variability among populations of this insect pest. The five RAPD primers produced DNA fragments that showed a genetic similarity less than 80% among ten populations in the dendrogram that was generated. The results obtained from analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that the highest source of genetic variation was the result of variability within each population. The causes that led to this high variability should be better studied in countries where the pest occurs.

**Keywords:** Molecular marker. RAPD. Tomato. Cotton.

### Referências

AGUSTI, N.; DE VICENTE, M. C.; GABARRA, R. Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis. **Molecular Ecology**, England, v. 8, n. 9, p. 1467-1474, Sept. 1999.

CIAMPI, A. Y.; MAGALHÃES, M. T. Q. Análise da variabilidade genética de três espécies arbóreas utilizando marcador molecular RAPD. **Embrapa Cenargen**, Brasília, n. 60, p. 1-8, 2001. Comunicado técnico.

FAKRUDIN, B. et al. Genetic variation of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*(Hübner) of south indian cotton ecosystem using RAPD markers. **Current Science**, India, v. 87, n. 12, p. 1654-1657, Dec. 2004.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, 1998.



HOLLOWAY, J. D.; BRADLEY, J. D.; CARTER, D. J. **CIE Guides to insects of importance to man: I. Lepidoptera**. London: CAB International, 1987.

JOHNSON, M. L.; ZALUCKI, M. P. Foraging behaviour of *Helicoverpa armigera* first instar larvae on crop plants of different developmental stages. **Journal of Applied Entomology**, Germany, v. 129, n. 5, p. 239-245, June. 2005.

MARTINS, E.S. et al. **Análise da variabilidade genética de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: noctuidae) por meio de marcadores moleculares RAPD**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 91).

NAGOSHI, R.N.; MEAGHER, R.L. Review of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) genetic complexity and migration. **Florida Entomologist**, United States, v. 91, n. 4, Dec. 2008.

PAULA, S. V. et al. **Lepidópteros quarentenários para o Brasil: subsídios para identificação e análise de risco de pragas**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 1 CD-ROM.

QUEIROZ, P. R. et al. **Análise da variabilidade de uma população de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) por meio de marcadores moleculares RAPD**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2004. (Boletim de pesquisa e desenvolvimento 75).

RHOLF, F. J. NTSYS-pc: **Numerical taxonomy and multivariate system: version 2.9**. New York: Applied Biostatistics, 1993.

SANNINO, L. Insect pests of tobacco. **Informatore Fitopatológico**, Bologna, v. 55, n. 2, p. 7-10, 2005.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin ver. 2000: a software for populations genetics data analysis**. Geneva: University of Geneva, 2000.

SHANOWER, T. G.; ROMEIS, J.; MINJA, E. M. Insect pests of pigeonpea and their management. **Annual Review of Entomology**, United States, v. 44, p. 77-96, January. 1999.

SOSA-GÓMEZ, D.R. Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner: 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genetics and Molecular Biology**, Brazil, v. 27, n. 3, p. 378-384, September. 2004.

WILLIAMS, J. G. K. et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, England, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, Nov. 1990.

ZHOU, X. et al. Population structure of the pestiferous moth *Helicoverpa armigera* in the Eastern Mediterranean using RAPD analysis. **Heredity**, England, v. 85, n. 3, p. 251-256, Sept. 2000.

## **Agradecimentos**

Agradecemos ao Dr. Rémy Dabire, entomologista do INERA/ Farakoba em Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, pelo envio das amostras de *Helicoverpa armigera*.