

DENISE ALVES LOPES

Marcadores moleculares aplicados à análise da contaminação com agrotóxicos e à genética de populações da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera; Crambidae)

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
SETEMBRO – 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DENISE ALVES LOPES

Marcadores moleculares aplicados à análise da contaminação com agrotóxicos e à genética de populações da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera; Crambidae)

Tese apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, para obtenção do título de Doutor.

MARINGÁ
PARANÁ – BRASIL
SETEMBRO – 2009

Ser feliz é encontrar força no perdão, esperanças nas batalhas, segurança no palco do medo, amor nos desencontros. Fazer agradecer a Deus a cada minuto pelo milagre da vida.

Fernando Pessoa

Aos meus pais, Vitor Pereira Lopes e Maria Graciete Alves Lopes, pelo amor incondicional em todas os obstáculos enfrentados.

Aos meus irmãos, Vitor Alves Lopes, Fábio Alves Lopes e Márcio Alves Lopes, pelo apoio, carinho e presença em todos os momentos de minha vida.

Ao grande amor da minha vida, minha filha linda, Ana Beatriz, sempre meu porto seguro e a razão do meu viver.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre soube me conduzir, dar forças, oportunidade e condições para realização deste trabalho em um ambiente extremamente agradável e familiar.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade da realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (Capes), pela bolsa de estudo concedida e apoio financeiro.

À minha orientadora, professora doutora Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki, profissional competente e dedicada, pela oportunidade oferecida, pela orientação e, principalmente, pelo bom convívio nestes nove anos de trabalho. Com suas argumentações e sugestões, tive a oportunidade de enriquecer meus conhecimentos e aprender o quanto é rico e gratificante o trabalho em grupo.

Especialmente, agradeço à minha princesinha e grande amor da minha vida, Ana Beatriz Lopes Sversutti, que com a sua presença e amor incondicional me proporcionou forças e serenidade para buscar a realização de todos os objetivos.

À minha linda família, meus pais, meus irmãos, minhas cunhadas, pela paciência, dedicação e apoio ao longo da realização deste trabalho. São eles grandes colaboradores para que esta conquista se realizasse.

À professora doutora Claudete Aparecida Mangolin, que contribuiu e auxiliou diretamente na metodologia de RAPD.

Aos professores que contribuíram para realização deste trabalho, doutora Ana Silvia Lapenta, doutora Maria de Fátima Pires da Silva Machado, doutor Erasmo Renesto e doutora Sandra Collet.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento.

Aos funcionários, Leila Andréia Frota, Sérgio Luiz Calvi e Rosângela Aparecida de Souza dos Laboratórios de Eletroforese e Genética Animal, do Departamento de Biologia Celular e Genética, pelo auxílio durante as pesquisas para esta tese.

Ao funcionário Valmir Peron, pela disposição, cuidado e dedicação com a criação e manutenção da criação de *Diatraea saccharalis*, utilizada neste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia Celular e Genética que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos funcionários da Usina Sabarácool (Engenheiro Beltrão), da Usina Santa Terezinha (Paranacity e Tapejara) e da Usina Alto Alegre (Colorado), pela disponibilidade para a coleta das amostras que foram analisadas neste estudo.

Aos Secretários do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, Francisco José da Cruz e Maria Valquiria Magro, pela ajuda e trabalho indispensáveis.

Aos grandes amigos do Curso de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, pela companhia e dedicação nas disciplinas cursadas.

À “grande família” dos Laboratórios Cultura de Tecidos Vegetais e Eletroforese e Genética de Animais, Ana Paula Perón, Diana, Paula, Denis, Ivone, Silvia Helena, Camila, Tiara. Enfim, a todos pela amizade, companheirismo e paciência durante essa corrida jornada de trabalho.

À Aline Bronzato pelo auxílio nos testes com inseticidas e na realização deste trabalho.

Às minhas grandes, amigas Ana Lúcia Stuchi, Débora Furlan Rissato, Dionízia Xavier Scomparin, Juliana Bueno Ruiz, Liriana Belizário Cantagalli e Tatiane Vicente Baitala, pela amizade, confiança e carinho durante todos os momentos dedicados.

A todas as pessoas que passaram pela minha vida, ajudando-me a crescer pessoal e intelectualmente.

BIOGRAFIA

Denise Alves Lopes, filha de Vitor Pereira Lopes e Maria Graciete Alves Lopes, nasceu em Umuarama, Estado do Paraná, no dia 26 de julho de 1979.

No ano de 1994, no Colégio Estadual Professor Paulo Alberto Tomazinho, Umuarama, Estado do Paraná, concluiu o Ensino Fundamental. O Ensino Médio concluiu no ano de 1997, no Colégio Nobel, em Maringá, Estado do Paraná.

Formou-se em Ciências Biológicas, pela Universidade Estadual de Maringá, em maio de 2004.

Ingressou, no ano de 2003, no Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Estadual de Maringá, submetendo-se à banca examinadora em 28 novembro de 2005, obtendo o título de Mestre .

Em 2005, iniciou o Curso de Doutorado, no mesmo Programa de Pós-graduação e, em 10 de junho de 2009, submeteu-se à banca examinadora para Qualificação da Tese de Doutorado.

RESUMO

LOPES, D.A. D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, setembro de 2009. **Marcadores moleculares aplicados à análise da contaminação com agrotóxicos e à genética de populações da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera; Crambidae).** Orientadora: Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki. Co-orientadores: Maria de Fátima Pires Machado da Silva e Claudete Aparecida Mangolin.

As brocas do gênero *Diatraea*, como a *D. saccharalis*, são consideradas as principais pragas da cana-de-açúcar, estando distribuídas em todas as regiões canavieiras do país. A espécie *D. saccharalis* é encontrada em todo o Brasil, infestando várias gramíneas e provocando, às vezes, perdas financeiras. Em países latinos americanos, o controle integrado é o método mais comum de conter este inseto. Além do controle biológico, é realizado também o controle químico, ou seja, são utilizados vários tipos de inseticidas no controle da broca da cana de açúcar. O controle por meio de agroquímicos pode levar a ocorrência de resistência pelos insetos a estes compostos. Além do conhecimento dos mecanismos de resistência para que o controle de insetos pragas tenha eficiência, é necessário conhecer a sua estrutura de populações. No presente estudo, foi realizada a caracterização bioquímica das esterases de lagartas de *D. saccharalis*, a avaliação de alterações na atividade relativa das esterases e expressão das proteínas totais, após contaminação com doses subletais de agroquímicos e análise da genética de populações da broca da cana, de quatro localidades do noroeste do Paraná e uma população do estado de São Paulo, por meio do marcador RAPD. Ocorreu a inibição parcial da EST-7 e EST-8 e inibição total da EST-3, após o contato com organofosforado malathion. Os resultados obtidos permitiram verificar que há correlação entre a mortalidade e a concentração de malathion, após contaminação por contato em todos os ínstares analisados. Assim, tanto o padrão de inibição quanto a correlação dose-mortalidade poderão ser utilizados como marcadores em novos estudos sobre resistência ao malathion. Uma nova região de proteína foi detectada após a contaminação por contato com o inseticida piretróide galgotrin, que futuramente poderá ser utilizada para o entendimento de resistência a esse inseticida. A análise da genética de

populações, utilizando marcador RAPD, permitiu verificar que há alto polimorfismo. As populações analisadas não estão diferenciadas e provavelmente esteja ocorrendo fluxo gênico. Esse contato entre as populações pode levar ao aumento de resistência aos inseticidas utilizados. Será importante que novas estratégias de manejo e controle dessa praga sejam desenvolvidas, dentre elas, a avaliação periódica do polimorfismo genético da *D. saccharalis* presente na região, para dificultar a ocorrência de resistência cruzada aos inseticidas.

Palavras-chave: *Diatraea saccharalis* , resistência, agroquímicos, polimorfismos, genética de populações

ABSTRACT

LOPES, D.A. D. Sc. Universidade Estadual de Maringá, September 2009. **Molecular markers applied to analysis of pesticides contamination and population genetics of sugar cane borer *Diatraea saccharalis* Fabr. (Lepidoptera; Crambidae)** Advisor: Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki. Committee Members: Maria de Fátima Pires Machado da Silva and Claudete Aparecida Mangolin.

D. saccharalis is the main pest of sugar cane, being distributed in all sugar cane crop in Brasisl. *D. saccharalis*. The species is found throughout Brazil infesting various grasses and causing economic losses. In Latin American countries, the integrated pest management is the most common method of containing *D. saccharalis*. In addition to biological control, are used several types of insecticides to management the sugar cane borer. The control by means of chemicals can lead to the occurrence of insect resistance to these compounds. Besides the knowledge of the mechanisms of resistance to the control of insect pests has efficiency is necessary to know the structure of population. In the present study was carried out biochemical characterization of esterases in larvae of *D. saccharalis*, the evaluation of changes in relative activity of esterases and total protein expression after contamination with sublethal doses of chemicals and, examining the sugarcane borer population genetic in four localities of northwest Parana and a population of São Paulo state by RAPD marker. After contamination by contact with Malathion organophosphate was detected partial inhibition of EST-7, EST-8 and total inhibition EST-3. The results showed that there is correlation between mortality and the concentration of malathion after contamination by contact in all instars analyzed. The inhibition pattern as the dose-mortality correlation may be used as markers in further studies on malathion resistance. A new zone of protein was detected after contamination by contact with the pyrethroid insecticide galgotrin that can be used to further the understanding of resistance to this insecticide. The analysis of population genetic showed high polymorphism RAPD, populations are not differentiated and gene flow is probably occurring. This contact between the

populations can lead to increased resistance to insecticides used. It is important that new strategies for management and control of this pest are developed, including the periodic evaluation of the *D. saccharalis* genetic polymorphism, to hinder the occurrence of cross-resistance to insecticides.

Key words: *Diatraea saccharalis*, resistance, agrochemicals, polymorphisms, genetics of population

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Inseticidas e resistência.....	6
2.2. Análise molecular da resistência aos inseticidas organofosforados (OP), carbamatos e piretróides.....	9
2.3. Marcadores moleculares – RAPD-PCR.....	11
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
CAPÍTULO I - Caracterização bioquímica das esterases e análise da expressão gênica em larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> Fabr. (Lepidoptera: Crambidae), após contaminação com agrotóxicos.....	22
RESUMO	22
ABSTRACT	23
1. INTRODUÇÃO	24
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
2.1. Material.....	26
2.2. Preparo das amostras	26
2.3. Eletroforese PAGE (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>) e SDS-PAGE (<i>sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)	26
2.4. Testes de inibição.....	27
2.5. Bioensaios.....	28
2.6. Análise de dados	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4. CONCLUSÕES	38
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
CAPÍTULO II - Genética de populações de <i>Diatraea saccharalis</i> (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) por meio de RAPD.....	43
RESUMO	43

ABSTRACT	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1. Material.....	48
2.2. Métodos – RAPD (<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>).....	49
2.3. Isolamento de DNA Genômico.....	49
2.4. Amplificação de DNA.....	49
2.5. Análise da genética de populações.....	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4. CONCLUSÕES	58
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
6. CONCLUSÕES GERAIS	62

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país que está investindo no desenvolvimento de álcool etílico a partir da cana-de-açúcar. O país possui enormes áreas com essa cultura para a produção de álcool combustível. Em 2005, havia no Brasil uma área de cultivo de cana de 5,5 milhões de hectares, sendo projetado uma expansão de mais de 2 milhões de hectares (Izique, 2005).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) apresentou grande importância histórica na formação do Brasil porque foi a primeira espécie botânica de expressão econômica introduzida e cultivada há quatro séculos no litoral do nordeste. Pela produção do álcool etílico, essa gramínea disseminou-se por quase todos os estados brasileiros, estabelecendo-se nas mais diversas condições edafoclimáticas. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, seguido pela Índia e China. Na média, 55% da cana-de-açúcar brasileira é destinada à produção de álcool e 45% à produção de açúcar (Portal UNICA, 2006).

Segundo a Conab (Companhia Nacional de Abastecimento) (2009), o primeiro prognóstico da produção de cana-de-açúcar para a safra 2009/2010, que está se iniciando, indica que o volume total a ser processado pelo setor sucroalcooleiro deverá atingir um montante entre 622,0 e 633,7 milhões de toneladas. Este volume representa um aumento de 8,6% a 10,7% do obtido na safra passada, ou seja, uma quantidade de 49,4 a 61,1 milhões de toneladas adicionais do produto.

Para a região Centro-Sul, que inclui os Estados da região Sudeste, Sul e Centro-Oeste, cuja participação está próxima de 90,0% do total nacional, os resultados indicam um aumento de 10,1% a 12,3% no volume da cana a ser processada. Desse total, foi estimado que 44,7% serão destinados à fabricação de açúcar e 55,3% à produção de álcool etanol, em relação ao ponto médio (Conab, 2009).

Segundo Benediti (2007), para uma produtividade de 80 t/ha, as perdas para a cada 1% de intensidade de infestação da broca da cana-de-açúcar (I.I), são de 616 Kg de cana, 28 Kg de açúcar e 16 litros de álcool, aproximadamente.

Com a expansão da cana-de-açúcar, surge insetos pragas como: Cigarrinha das raízes (*Mahanarva fimbriolata*), cupins (*Migdolus fryanus*) e o inseto que mais causa danos e prejuízos em usinas de cana-de-açúcar, a broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis* Fabr. 1794).

Entre os insetos mais prejudiciais está a *D. saccharalis* que, devido à grande expansão da cultura da cana-de-açúcar, passou atacar outras culturas, dentre eles o sorgo e o milho (Boiça Júnior e Lara, 1993). Neste sentido houve a necessidade de um controle, tanto biológico como químico.

Os danos causados pela *D. saccharalis* podem ser divididos em danos diretos e indiretos. O dano direto é a abertura de galerias, causando perda de peso da cana, diminuição da germinação pela morte das gemas e, se o caminhamento da broca for circular, causa o tombamento da cana. Em canas novas, a broca pode causar o secamento dos ponteiros e morte da planta. Esse dano é conhecido como "coração morto" (Gallo et al., 2002).

Os danos indiretos são mais importantes, pois criam condições para entrada de microrganismos, como fungos e bactérias, que vão prejudicar o processo de produção de açúcar e álcool. Na produção de açúcar, os fungos causam a inversão da sacarose em outros açúcares que não vão cristalizar e, na produção de álcool, as bactérias vão competir com as leveduras que fazem a fermentação alcoólica, diminuindo o volume de álcool produzido. As perdas chegaram a 35kg de açúcar/ha, e 30 litros de álcool/ha, com apenas 1% de colmos infestados (Macedo, 1978).

Desta forma, tornou-se necessária a utilização de agrotóxicos ou pesticidas de diversas classes químicas. Os primeiros grupos químicos utilizados como pesticidas foram substâncias tóxicas de origem natural, tais como o piretro e a nicotina, além de elementos inorgânicos como mercúrio e o enxofre (Jonatan, 1989).

Quase todos os inseticidas convencionais disponíveis, como piretróides, organofosforados e carbamatos, estão em uso há vários anos contra diferentes pragas. Substâncias químicas introduzidas para o controle de pragas levam os

insetos a desenvolver resistência devido ao seu uso inadequado e excessivo (Denolm e Elliot, 1995).

Há várias maneiras de se estudar os efeitos da utilização de agroquímicos em populações de insetos pragas. Elas podem ser utilizadas para conhecer os mecanismos que podem levar à resistência.

Vários métodos, como físico, químicos e biológicos, podem ser utilizados para determinar a presença de resíduos de pesticidas. Bioensaios aceitos para análise de resíduos devem ser simples e adaptáveis (Mansour, 1987). Teoricamente, qualquer organismo que seja suscetível a um dado pesticida em estudo pode ser utilizado em bioensaios em qualquer amostra ambiental.

Bioensaios podem ser realizados para a determinação de dose-mortalidade, a análise probit desses dados permite estimar a DL_{50} , ou seja, em qual dose ocorrerá a morte de 50% dos indivíduos analisados (Ferrari, 1996).

Além disso, o efeito das doses subletais é importante para se entender mecanismos que poderão levar à resistência. A exposição a doses subletais de inseticidas permitiu a Attencia et al. (2005) obterem informações sobre o impacto ecológico de pesticidas em polinizadores.

Analisando as alterações na atividade relativa das esterases de *Apis mellifera* após a exposição a doses subletais do inseticida malathion e metil-parathion, os autores puderam verificar que ocorreram alterações que permite utilizar essas abelhas como bioindicadores da presença destes pesticidas.

Hashimoto et al. (2003) analisaram as esterases de *A. mellifera* após contaminação com doses subletais por contato e oral com o inseticida thiamethoxam. Os autores verificaram que ocorre inibição parcial de várias esterases e que a inibição dessas isoenzimas pode ser utilizada para detectar a presença de resíduos desse inseticida.

Trabalhos foram desenvolvidos com marcadores moleculares RAPD e AFLP para estudo de genética de populações dos Lepidoptera *Spodoptera frugiperda* (Busato et al., 2004; Martinelli et al., 2006) e RAPD para populações de *Sesamia nonagrioides* (Poza et al., 2008). Estes estudos mostraram que a variabilidade genética de insetos pragas e a análise da estrutura de populações

permitiram inferir sobre o fluxo gênico e a diversidade genética dentro e entre populações desses insetos. Esses dados são importantes para o desenvolvimento de programas de controle de pragas, pois permitem determinar se em longo prazo populações suscetíveis a um dado inseticida se tornarão resistentes. Vale salientar que o fluxo gênico entre populações pode levar à ocorrência de resistência cruzada a inseticidas.

Existe, portanto, uma enorme deficiência em estudos com *D. saccharalis* sobre resistência a inseticidas, papel das esterases na resistência, bem como polimorfismos genéticos das populações dessa broca.

No presente estudo, foi realizada a caracterização bioquímica das esterases de lagartas de *D. saccharalis*, a avaliação de alterações na atividade relativa das esterases e expressão das proteínas totais após contaminação com doses subletais de agroquímicos e análise da genética de populações da broca da cana, de quatro localidades do noroeste do Paraná e uma população do estado de São Paulo por meio do marcador RAPD. Esses resultados contribuirão para melhor entendimento da estrutura de populações e resistência aos agroquímicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Em todo o mundo, são descritas mais de 1.500 espécies de insetos que se alimentam da cana-de-açúcar. Deste total, as larvas de mais de 50 espécies de Lepidoptera são reconhecidas como praga desta cultura. No velho mundo, predominam os gêneros *Chilo* e *Sesamia*, já no novo mundo se destacam as espécies do gênero *Diatraea* (Long e Hensley, 1972).

No continente americano, foram descritas 21 espécies do gênero *Diatraea*, sendo que nem todas as espécies causam danos à cultura da cana-de-açúcar. Deste total, duas espécies são importantes como inseto praga: *D. saccharalis* (Fabricius, 1794), com ocorrência em todo o país e *D. flavipennella* (Box, 1931), encontrada no Rio de Janeiro, Minas Gerais e com maior importância nos estados nordestinos (Mendonça, 1996).

D. saccharalis é uma mariposa com 25 mm de envergadura. As asas anteriores apresentam coloração amarelo-parda, com alguns desenhos pardacentos e asa posterior esbranquiçada (Gallo et al., 2002). A broca da cana-de-açúcar não é boa voadora, o vôo possui uma extensão de aproximadamente 200 a 300 metros, podendo chegar a 700 metros com auxílio do vento (Hayward, 1943).

O ciclo biológico completo da *D. saccharalis* é de 53 a 60 dias e podem ocorrer até quatro gerações anuais e em casos excepcionais até cinco, dependendo das condições climáticas. Na última geração, há um alongamento do ciclo, ficando a lagarta no colmo por 5 a 6 meses (Gallo et al., 2002).

D. saccharalis é uma praga encontrada em várias culturas, além da cana-de-açúcar, como sorgo, milho e arroz, provocando perdas econômicas consideráveis (Ferreira, 1998; 1999; Ferreira et al., 2001).

A intensidade de infestação da broca em cana-de-açúcar é um parâmetro que determina a porcentagem de entrenós atacados pela broca e este é um indicativo das perdas ocorridas em tonelada de cana/hectares e do teor de sacarose ocasionados por *Diatraea* spp. Este é um índice que permite avaliar a situação de ataque da broca no canavial e permite ao produtor desenvolver programas de

controle (Macedo e Lavorenti, 2004). Para cada 1% de intensidade de infestação (I.I) da praga ocorre prejuízo de 0,25% de açúcar, 0,20% de álcool e 0,77% de peso (Gallo et al., 2002; Campos e Macedo, 2004). Assim, quando a infestação por *D. saccharalis* atinge 3%, é iniciado o controle biológico com *Cotesia flavipes*.

Além do controle biológico, o método muito utilizado é o controle químico, ou seja, são utilizados vários tipos de inseticidas químicos que pode levar à ocorrência de resistência pelos insetos a estes compostos.

2.1. Inseticidas e resistência

O uso de inseticidas químicos é uma prática secular. Os relatos do uso de compostos químicos datam desde antes do ano 2.500 a.C., em que os sumérios utilizavam compostos sulfúricos para o controle de insetos. Os chineses, em 1.200 a.C., utilizavam compostos arsênicos e mercúrio como inseticidas (Retnakaran et al., 1985).

Os inseticidas piretróides têm sua origem em um pó básico à base de flores de piretro em 1697, quando asiáticos sabiam do poder inseticida de espécies do gênero *Pyrethrum* (crisântemo). O uso do arsênico verde de Paris e soluções de querosene deram início à era da aplicação em larga escala de inseticidas químicos como controle de insetos e pragas (Ruigt, 1985).

Em 1939, um inseticida do grupo dos hidrocarbonetos clorados, o diclorodifeniltricloroetano, amplamente conhecido como DDT, foi apresentado como a grande promessa de eliminação dos insetos. O DDT tornou-se o composto químico mais famoso e mais utilizado do século 20 (Becker et al., 2003). Nas décadas de 70 e 80 foi proibida a sua utilização, devido à alta toxicidade.

Os organofosforados foram inicialmente sintetizados na Alemanha e os carbamatos na Suíça, na década 50 (Becker et al., 2003). Atualmente novas gerações de inseticidas são produzidas, como os neonicotinóides e reguladores de crescimento.

A utilização de inseticidas ao longo do tempo, juntamente com a história evolutiva dos insetos, que apresentam mecanismos de defesa às diferentes pressões de seleção ambiental, tem como resultado o surgimento de resistência aos

agroquímicos.

A resistência pode ser funcionalmente definida como a habilidade de um organismo sobreviver a uma dose de toxina que é letal aos suscetíveis (Georghiu e Saito, 1983). De forma dinâmica, uma população de insetos suscetíveis exposta à toxina por um período de tempo é gradualmente trocada pelos resistentes (McKenzie, 1996; Roush e McKenzie, 1987).

Inseticidas são as primeiras ferramentas usadas para o controle da broca da cana-de-açúcar para manter um baixo custo econômico (Rodriguez et al., 2001).

A broca da cana-de-açúcar (*D. saccharalis*) tem um histórico de desenvolvimento de resistência a inseticidas de diferentes classes. Resistência para endrin foi detectado em populações no campo depois de seis estações de pulverização de hidrocarbonetos clorados em Louisiana (Yadav et al., 1965). No Texas, a resistência em populações de campo foi detectada para organofosforados e carbamatos depois de várias aplicações (Reagan et al., 1979).

Seleção contínua em laboratório de linhagens que foram inicialmente colecionadas para a produção de cana-de-açúcar em uma área de Louisiana, mostrou resistência a piretróides após 11 gerações (Vines et al, 1984) e carbamatos após 8 gerações de seleção (Reagan et al., 1973).

A resistência a inseticidas precisa ser detectada e monitorada desde o início, para que programas de controle tenham sucesso. Ela pode ser estudada com ensaios biológicos (bioensaios) e análise por genética bioquímica da expressão de genes como as esterases que respondam à seleção feita pelos inseticidas.

Os bioensaios dose-resposta são utilizados para monitorar o progresso da resistência em uma determinada população. Uma escala de diferentes doses de inseticidas é utilizada para se obter um espectro de respostas de mortalidade entre as amostras estudadas. A resposta obtida pode ser analisada por meio da análise de probits (Finney, 1971).

Os dados de dose-mortalidade podem ser submetidos à análise de probits. É possível observar a resposta de uma determinada população a um inseticida, estabelecendo a dose de inseticida capaz de matar uma dada porcentagem dos indivíduos tratados em determinados períodos de tempo. Desta maneira podem ser

estimadas a CL_{50} , concentração letal para 50% da população, e a CL_{95} , concentração letal para 95% dos indivíduos (Ferrari, 1996).

A análise da expressão de esterases que respondam à seleção feita por inseticidas tem sido realizada em estudos com afídeos (*Myzus persicae*) e mosquitos (*Culex quinquefasciatus*, *C. pipiens*, *C. tarsalis* e *C. triataeniorhynchus*), sendo que nesses insetos foi descrita amplificação do gene para esterase (Karunaratne et al., 1998; Mouches et al., 1986; Field e Devonshire, 1998).

Os mecanismos comumente associados à resistência aos inseticidas químicos estão divididos em várias categorias, entre elas a resistência metabólica, que é o resultado de uma mudança estrutural na molécula da enzima que aumenta sua habilidade em detoxificar o inseticida e/ou a elevação nos níveis da enzima produzida (Hemingway, 2000). Dentre essas enzimas, podemos destacar as esterases, que constitui um grupo de enzimas muito estudado em virtude da ampla variabilidade genética, distribuição tecidual e temporal diferenciada.

Dixon e Webb (1964) denominaram como esterases as seguintes hidrolases: carboxilesterases (E.C.3.1.1.), tiolesterases (E.C.3.1.2.), hidrolases de monoéster fosfórico (E.C.3.1.3), hidrolases de diéster fosfórico (E.C.3.1.4), hidrolases de monoéster oligofosfórico (E.C.3.1.5), sulfatases (E.C.3.1.6) e monoesterases difosfóricas (E.C.3.1.7). No sentido estrito da palavra, as esterases catalisam a hidrólise de um grande número de ésteres carboxílicos não ionizados (Krisch, 1971).

Dentre as esterases, as carboxilesterases são esterases não específicas, que apresentam superexpressão como resposta evolutiva aos inseticidas organofosforados e carbamatos e está sendo muito estudada em numerosas espécies de artrópodes inclusive mosquitos, afídeos e baratas (Hemingway et al., 2004).

Em insetos suscetíveis às esterases são significativamente menos reativas com xenobióticos (incluindo os inseticidas) que as de insetos resistentes, que seqüestram o oxon análogo ativo e protegem o sítio alvo da acetilcolinaesterase (Karunaratne et al, 1995).

2.2. Análise molecular da resistência aos inseticidas organofosforados (OP), carbamatos e piretróides

Tanto os organofosforados (OP) como carbamatos são muito tóxicos, especialmente ao sistema nervoso central, pois inibem acetilcolinesterase, provocando um acúmulo de acetilcolina nos tecidos nervosos. São usados como inseticidas, nematocidas e acaricidas em um amplo espectro de cultivos agrícolas. (Grisolia, 2005).

Os insetos apresentam mecanismos de resistência associados a mutações nos genes das carboxilesterases em resposta aos organofosforados, carbamatos e piretróides que podem ser classificados em quantitativos e qualitativos.

O mecanismo quantitativo pode corresponder em muitos casos a uma amplificação gênica que leva à superexpressão das esterases. Em mosquitos as esterases amplificadas podem compreender até 0,4% das proteínas totais, todas com alto nível de seqüestro rápido e baixa taxa de hidrólise (Karanaratne et al, 1993). As causas dessa predominância de excesso de síntese de enzima é a amplificação do(s) gene(s) (Vaughan e Hemingway, 1995), embora uma transcrição super-regulada sem o subjacente evento de amplificação tenha sido reportada (Rooker et al., 1996).

A superexpressão de carboxilesterases não específicas como resposta evolutiva à pressão de seleção causada por inseticidas organofosforados e carbamatos tem sido detectada em vários insetos, como mosquitos, carrapatos, afídeos e baratas (Hemingway et al., 2004).

Há evidências de mecanismo de expressão aumentada da atividade da esterase em *Anopheles gambiae* (Vulule et al., 1999). Contudo, os genes envolvidos são desconhecidos. Segundo Hernandez et al. (2002), essa resposta ocorre tanto para contaminação com OP como para piretróides.

As alterações qualitativas estão associadas a uma rápida hidrólise do inseticida, em vez de aumentar o sequestro (Hemingway et al., 2004). Este mecanismo está quase sempre associado à resistência ao OP malathion e dá uma resistência cruzada específica (algumas vezes malathion específica) muito mais restrita que o mecanismo de amplificação das esterases (Hemingway et al., 2004). Um exemplo é a malathion esterase E3 de *Lucilia cuprina*. Nesse caso ocorreu uma

única mutação de ponto, a substituição Trp²⁵¹-Leu no gene da Esterase E3 (Campbell et al., 1998), que levou esse inseto à resistência ao malathion.

A resistência ao carbamato também está associada à presença de acetilcolinaesterase (AChE) insensível ao sítio alvo de inseticidas OP e carbamato (Hemingway et al., 2004). A AChE tem papel chave no sistema nervoso de inseto, finalizando o impulso nervoso por meio da catalisação da hidrólise do neurotransmissor acetilcolina. Os inseticidas OP e carbamato inibem a atividade enzimática pela fosforilação covalente ou carbamilação do resíduo de serina dentro do sítio ativo (Corbett, 1974). Estudos com *Anopheles albimanus* da América Central têm mostrado que AChE alterada foi mais comum em mecanismos de resistência OP/carbamato (Hemingway e Georghiou, 1983).

Os piretróides são derivados químicos das piretrinas, considerados inseticidas de amplo espectro de ação, atingindo lepidópteros, dípteros, hemípteros, coleópteros e afídeos (Grisolia, 2005). Atuam nos canais de sódio da membrana dos axônios, alterando a configuração espacial de algumas proteínas de membrana, abrindo os canais de sódio e potássio, impedindo o seu fechamento. Consequentemente, ocorre um bloqueio na transmissão do impulso nervoso, levando à paralisia do inseto e a um rápido efeito *Knock-down*. Os piretróides podem ser subdivididos em dois tipos: Tipo I – permetrinas e tipo II – deltametrinas.

O uso desse tipo de inseticida tem levado ao desenvolvimento do mecanismo de resistência *Knock-down (kdr)* em muitas espécies de insetos (Soderlund e Knipple, 2003), incluindo os gêneros *Anopheles* e *Aedes*.

Estudos com mecanismos de resistência cruzada com mosca doméstica mostraram que o mecanismo molecular da resistência ao piretróide seria devido à mudança funcional do canal de sódio (Chinn e Narahashi, 1986).

Ranson et al. (2000 a, b), por meio de mapeamento genético, demonstraram que o canal de sódio corresponde a um QTL (*Quantitative trait locus*) principal e que a substituição de um nucleotídeo estava ligada à herança da resistência à permetrina em linhagens de *Anopheles gambiae*.

De acordo com Hemingway et al. (2004), a resistência a inseticidas seria um dos mais bem documentados, e rápidos, casos de adaptação evolutiva às

mudanças ambientais. Neste estudo foi observado que, embora apenas um número limitado de mecanismos de resistência tenha sido demonstrado, a diversidade dentro dessas famílias de enzimas envolvidas na resistência metabólica seria capaz de contribuir substancialmente para a resistência a muitas classes de inseticidas.

Além do conhecimento dos mecanismos de resistência, para que o controle de insetos pragas tenha eficiência, é necessário conhecer a sua estrutura de populações. Os estudos da genética de populações de uma espécie permitem entender os mecanismos genéticos que mantêm, reduzem ou aumentam a variabilidade genética das populações, que poderão levar à ocorrência de resistência a determinado inseticida. Essas análises mostram, ainda, as relações de parentesco dentro e entre as populações e como os genes da resistência poderão migrar de uma população para outra.

Uma ferramenta importante para o desenvolvimento desses estudos são os marcadores moleculares, dentre eles destacamos o Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD).

2.3. Marcadores moleculares – RAPD-PCR

No início da década de 90, foi desenvolvido um marcador baseado em PCR, denominado de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Williams et al., 1990). Estes autores descreveram a técnica no contexto da análise mendeliana.

A tecnologia de PCR-RAPD, que utiliza *primers* de seqüência arbitrária, abriu uma nova perspectiva para a análise genômica de indivíduos e populações, eliminando a necessidade do conhecimento prévio das seqüências de nucleotídeos que flanqueiam a seqüência de DNA de interesse (Suazo et al., 1998).

Esta técnica é capaz de extrair considerável informação relativa à variabilidade da seqüência de nucleotídeos no genoma (Borowsky, 2001). O polimorfismo ocorre devido a diferenças no DNA (trocas, deleções e inserções de nucleotídeos), nos sítios de anelamento do *primer* ou entre eles, que podem prevenir a amplificação do DNA por falta de complementaridade, ou pela distância demasiadamente grande entre os sítios de amplificação nas duas fitas de DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Marcadores RAPD, em geral, apresentam um bom conteúdo informativo, isto é, amostram o genoma em vários locos ao mesmo tempo, identificam um bom número de locos polimórficos por reação, embora discriminem um baixo número de alelos por loco (dois alelos, amplificado e não-amplificado) (Borowsky, 2001).

Os marcadores RAPD são muito usados para estudos populacionais de variabilidade genética e distância genética (Landry et al., 1993; Lou et al., 1998; Suazo et al., 1998; Vasconcelos, 1998; Waldschmidt et al., 2000, 2002; Oliveira et al., 2004). Estes marcadores também podem ser usados para estudos geográficos de zonas de hibridização, na qual as populações diferem por poucas ou várias características, como resultado do intercrossamento entre populações distintas, podendo fornecer informações sobre o grau de introgressão gênica (Futuyma, 1992).

Infelizmente, não foram desenvolvidos estudos com marcadores moleculares RAPD em populações de *D. saccharalis* até o momento. Contudo alguns estudos foram realizados com outros Lepidoptera.

A análise da genética de populações de *Spodoptera frugiperda* (Smith) foi realizada por Martinelli et al. (2006). O estudo foi desenvolvido com 10 populações em diferentes regiões do Brasil, com essa praga associada ao milho e algodão. Os autores verificaram que 98% dos fragmentos detectados foram polimórficos; 18% da variação ocorre entre as populações e 82% da variação foi observada dentro das populações. O estudo mostrou ainda que há considerável fluxo gênico entre as populações que ocorrem no milho e no algodão, permitindo conhecer melhor o fluxo gênico das populações de algodão e milho para um plano de controle mais eficiente (Martubelli et al., 2006).

Poza et al. (2008) utilizaram oito *primers* de RAPD para análise de estrutura de populações em *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), os quais produziram 65 fragmentos polimorfismos, representando uma média de 78%. Nesse estudo, os autores verificaram que houve baixo fluxo gênico entre as populações de *S. nonagrioides* da Europa, o que poderia contribuir para uma redução na taxa de alelos para resistência uma vez que esta foi desenvolvida em uma única localidade.

Embora não haja informações avaliadas na estrutura genética de populações de *D. saccharalis*, a análise da variabilidade genética é especialmente importante para o bem sucedido programa de controle de pragas em larga escala.

A detecção de polimorfismos é essencial para o desenvolvimento de marcadores moleculares como o RAPD, observando linhagens resistentes e suscetíveis, para análise de estrutura de populações, contribuindo para estudos posteriores de controle desses insetos.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATTENCIA, V.M.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; TOLEDO, V.A.A. Esterase activity in *Apis mellifera* after exposure to organophosphate insecticides (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, 45: 587-595, 2005.
- BECKER, N.; PETRIC, D.; ZGOMBA, M.; BOASE, C.; DAHL, C.; LANE, J.; KAISER, A. **Mosquitoes and their control**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. 377p.
- BENEDITI, M.S. Os fornecedores e o controle da broca-da-cana. **Revista Coplana**, Maio/junho 2007.
- BOIÇA JÚNIOR, A.L.; LARA, F.M. Resistência de genótipos de sorgo ao ataque de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) e determinação dos tipos envolvidos. **Sociedade Entomológica do Brasil**, 2:245-252, 1993.
- BOROWSKY, R.L. Estimating nucleotide diversity from Random Amplified Polymorphic DNA and Amplified Fragment Length Polymorphism data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 18:143-148, 2001.
- BUSATO, G.R.; GRÜTZMACHER, A.D.; OLIVEIRA, A.C.; VIERA, E.A.; ZIMMER, P.D.; KOPP, M.M.; BANDEIRA, J.M.; MALAGALHÃES, 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**, 33:709-716, 2004.
- CAMPBELL, P. M.; NEWCOMB, R.D.; RUSSEL, R.J.; OAKESHOTT, J.G. Two different amino acid substitutions in the ali-esterase, E3, confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly *Lucilia cuprina* **Insect. Biochem. Mol. Biol**, 28:139-150, 1998.
- CAMPOS, M.B.S.; MACEDO, N. Cana-de-açúcar - ampliando campo de ataque. **Cultivar: Grandes Culturas**, 6:23-26, 2004.
- CHINN, K.; NARAHASHI, T. Stabilisation of sodium channels as the basis for drug action: past, present and future. **Journal Physiology**, 380:191-207. 1986.

CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: www.conab.gov.br. Acesso em: 16, junho, 2009.

CORBETT, J.R. **The biochemical mode of action of pesticides**. London: Academic Press, 1974. 182p.

DENOLM, I.; ELLIOT, M. Roman Mieczyslaw Sawicki. **Bibliographic memoirs of fellows of the royal society**, 397-417, 1995.

DIXON, M.; WEBB, E.C. **Enzymes**. New York: Academic Press, 1964. 950p.

FERRARI, J.A. Population genetics in vector biology. In: MARQUARDT, W. C.; BEATY, B.J. **The Biology of Disease Vectors**. Niwot: University Press of Colorado, 1996. p. 512-525.

FERREIRA, E. **Manual de identificação de pragas do arroz**. Embrapa-CNPAF, Santo Antônio de Goiás, 1998. 110p. (documentos, 90).

FERREIRA, E. Pragas e seu controle. In: VIEIRA, N.R.A.; SANTOS, A.B.; SANT'ANA, E.P. **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 1999. p. 197-209.

FERREIRA, E.; BRESEGHELLO, F.; CASTRO, E.M.; BARRIGOSI, J.A.F. **Broca-do-colmo nos agroecossistemas de arroz do Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 2001. 42 p. (Documentos 114).

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

FIELD, L.M.; DEVONSHIRE, A.L. Evidence that the E4 and FE4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) are part of a gene family. **Biochemical Journal**, 330:169–173, 1998.

FINNEY, D.K. **Probit analysis**. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1971.

FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992.

GALLO, D.; ALVES, S.B.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; CARVALHO, R.P.L.; LOPES, J.R.S.; MARCHINI, L.C.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; OMOTO, C.; PARRA, J.R.P.; VENDRAMIM, J.D.; ZUCCHI, R.A. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 462p.

GEORGHIOU, G.P. Management of resistance in arthropods. In: Georghiou, G. P. & Saito, T. (eds.), **Pest resistance to pesticides**. New York: Plenum, 1983. p. 769-792.

GRISOLIA, C.K. **Agrotóxicos – mutações, reproduções e câncer**. Brasília: Universidade de Brasília, 2005. 392p.

HASHIMOTO, J.H.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; TOLEDO, V.A.A. Evaluation of the use of the inhibition esterase activity on *Apis mellifera* as bioindicators of insecticide thiamethoxam pesticide residues. **Sociobiology**, 42:693-699, 2003.

HAYWARD, K.J. A broca da cana-de-açúcar. **Brasil Açucareiro**, 22:69-74, 1943.

HEMINGWAY, J.; GEORGHIOU, G.P. Studies on the acetylcholinesterase of *Anopheles albimanus* resistant and susceptible to organophosphate and carbamate insecticides. **Pesticides Biochemistry Physiology and Physiology**, 19:167-171, 1983.

HEMINGWAY, J. The molecular basis two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 30:1009-1015, 2000.

HEMINGWAY, J.; HAWKES, N.J.; McCARROLL, L.; RANSON, H. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 34:653-665, 2004.

HERNANDEZ, R., GUERRERO, F.D., GEORGE, J.E., WAGNER, G.G. Allele frequency and gene expression of a putative carboxylesterase-encoding gene in a pyrethroid resistant strain of the tick *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 32:1009-1016, 2002.

IZIQUE, C. **Movido a álcool**. Disponível em: www.cni.org.br. Acesso em: 17, junho, 2006.

JONATAN, T. **Introduction of environmental studies**. New York: Saunders College, 1989. 304p.

KARUNARATNE, S.H.P.P.; HEMINGWAY, J.; JAYWARDENA, K.G.I.; DASANAYAKA, V.; VAUGHAN, A. Kinetic and molecular differences in the amplified and non-amplified esterases from insecticide resistant and susceptible *Culex quinquefasciatus* mosquitos. **Journal of Biology Chemistry**, 270:31124-31128, 1995.

KARUNARATNE, S.H.P.P.; JAYWARDENA, K.G.I.; HEMINGWAY, J.; KETTERMAN, A.J. Characterization of a B-type esterase involved in insecticide resistance from mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Biochemical Journal**, 294:575-579, 1993.

KARUNARATNE, S.H.P.P.; VAUGHAN, A.; PATON, M.G., HEMINGWAY, J. Amplification of a serine esterase gene is involved in insecticide resistance in Sri Lankan *Culex tritaeniorhynchus*. **Insect Molecular Biology**, 7:307–315, 1998.

KRISCH, K. Carboxylic ester hydrolases. In: BOYER, P.D. **The enzymes**. New York: Academic Press, 5:43-69, 1971.

LANDRY, B.S.; DEXTRAZE, L.; BOIVIN, G. Random amplified polymorphic DNA markers for DNA fingerprinting and genetic variability assessment of minute parasitic wasp species (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) used in biological control programs of phytophagous insects. **Genome**, 36:580-587, 1993.

LONG, W.H.; HENSLEY, S.D. Insect pests of sugar cane. **Annual Review Entomology**, 17:149 -176, 1972.

LOU, K.F.; WEISS, M.J.; BRUCKNER, P.L.; MORRILL, W.L.; TALBERT, L. E.; MARTIN, J.M. RAPD Variation within and among geographic populations of wheat stem sawfly (*Cephus cinctus* Norton). **Journal of Heredity**, 89:329-335, 1998.

MACEDO, N. New strain of *Apanteles flavipes* was imported to increase its adaptative potential in the Southern Region of Brazil. **Entomology Newsletter**, 4:11-12, 1978.

MACEDO, N.; LAVORENTI, N. Novo método de amostragem de intensidade de infestação da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis*). **STAB**, 22:32-41, 2004.

MANSOUR, S.A. Is it possible to use the honey bee adult as a bioindicator for the detection of pesticide residues in plants? **Acta Biologica Hung**, 38:69-76, 1987.

MARTINELLI, S.; BARATA, R.M.; ZUCCHI, M.I.; SILVA-FILHO, M.C.; OMOTO, C. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, 99:519-526, 2006.

McKENZIE, J.A. **Ecological and evolutionary aspects of insecticide resistance**. Austin, Academic Press, 1996, 185 p.

MENDONÇA, A.F. **Pragas da cana-de-açúcar**. Maceió: Insetos & Cia, 1996. 200p.

MOUCHES, C.; PASTEUR, N.; BERGE, J.B.; HYRIEN, O.; RAYMOND, M.; DE SAINT VINCENT, B.R.; DE SILVESTRI, M.; GEORGHIU, G.P. Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a Californian *Culex* mosquito. **Science**, 233:778–780, 1986.

OLIVEIRA, R.C.; NUNES, F.M.F.; CAMPOS, A.P.S.; VASCONCELOS, S.M.; ROUBIK, D.; GOULART, L.R.; KERR, W.E. Genetic divergence in *Tetragonisca angustula latreille*, 1811 (Hymenoptera, Meliponinae, Trigonini) based on RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, 27:181-186, 2004.

PORTAL UNICA. **União da Agroindústria Canavieira de São Paulo**. Disponível em: www.portalunica.com.br. Acesso em 01, julho, 2006.

POZA, M.D.; FARINÓS, G.P.; BEROIZ, B.; ORTEGO, F.; HERNÁNDEZ-CRESPO, P.; CASTAÑERA, P. Genetic structure of *Sesamia nonagrioides*

- (Lefebvre) populations in the Mediterranean area. **Environmental Entomology**, 37:1354-1360, 2008.
- RANSON, H.; JENSEN, B.; VULULE, J.M.; WANG, X.; HEMINGWAY, J.; COLLINS, F.H. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. **Insect Molecular Biology**, 9:491-497, 2000a.
- RANSON, H.; JENSEN, B.; WANG, X.; PRAPANTHADARA, L.; HEMINGWAY, J.; COLLINS, F.H. Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. **Insect Molecular Biology**, 9:499-507, 2000b.
- REAGAN, T.E.; HENSLEY, S.D.; GRAVES, J.B. *Diatraea saccharalis* reponse to laboratory selection with azinphosmethrhl and carborfuran. **Journal of Economic Entomology**, 66:1113-1116, 1973.
- REAGAN, T.E.; HENSLEY, S.D.; HUFFMAN, F.R.; FUCHS, T.W. Response to insecticides of the sugarcane borer in Louisiana and Texas. **Journal of Economic Entomology**, 72:94-96, 1979.
- RETNAKARAN, A.; GRANETT, J.; ENNIS, T. Insect growth regulators. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I (eds.). **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. New York: Pergamon, 1985. p. 529-601.
- RODRIGUEZ, L.M.; REAGAN, T.E.; OTTEA, J.A. Susceptibility of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) to Tebufenozide. **Journal of Economic Entomology**, 9:1464-1470, 2001.
- ROOKER, S.; GUILLEMAUD, T.; BERGE, J.; PASTEUR, N.; RAYMOND, M. Coamplification of esterase A and B genes as a single unit in *Culex pipens* mosquitoes. **Heredity**, 77:555-561, 1996.
- ROUSH, R.T.; MCKENZIE, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review Entomology**, 32:361-380, 1987.

- RUIGT, G.S.F. **Pyrethroids**. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (eds.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. p. 183-263.
- SODERLUND, D.M.; KNIPPLE, D.C. The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, 33:563-577, 2003.
- SUAZO, A.; MCTIERNAN, R.; HALL, H.G. Differences between African and European honey bees (*Apis mellifera L.*) in Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). **Heredity**, 9:32-36, 1998.
- VAUGHAN, A.; HEMINGWAY, J. Mosquito carboxylesterase Est2 (A2). Cloning and sequence of the full length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Biological Chemistry**, 270:17 044–17 049, 1995.
- VASCONCELOS, S.M. **Divergência genética entre populações de *M. rufiventris*** (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 1998. 49p. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica).
- VINES, R.C.; REAGAN, T.E.; POLLET, D.K. Laboratory selection of *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera: Crambidae) for resistance to fenvalerate and monocrotophos. **Journal of Economic Entomology**, 77: 857-863, 1984.
- VULULE, J.M.; BEACH, R.F.; ATIEMI, F.K.; MCALLISTER, J.C.; BROGDON, W.G.; ROBERTS, J.M.; MWANGI, R.W.; HAWLEY, W.A. Reduced susceptibility of *Anopheles gambiae* to permethrin associated with the use of permethrin-impregnated bednets and curtains in Kenya. **Medical and Veterinary Entomology**, 8:71-75, 1994.
- WALDSCHMIDT, A.M.; BARROS, E.G.; CAMPOS, L.A.O. Molecular marker distinguishes subspecies *Melipona quadrifasciata quadrifasciata* and *Melipona quadrifasciata anthidioides* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Genetics and Molecular Biology**, 23:609-611, 2000.

WALDSCHMIDT, A.M.; MARCO JUNIOR, P.; BARROS, E.G.; CAMPOS, L.A.O. Genetic Analysis of *Melipona quadrifasciata* Lep. (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae) with RAPD markers. **Brazilian Journal of Biology**, 62:923-928, 2002.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAR, K.J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18:6531-6535. 1990.

YADAV, R.P.; ANDERSON, H.L.; LONG, W.H. Sugarcane borer resistance to insecticides. **Journal of Economic Entomology**, 58:1122-1124, 1965.

CAPÍTULO I

Caracterização bioquímica das esterases e análise da expressão gênica em larvas de *Diatraea saccharalis* Fabr. (Lepidoptera: Crambidae), após contaminação com agrotóxicos

RESUMO

Devido à importância econômica de *D. saccharalis*, principal inseto praga da cana-de-açúcar e a utilização de inseticidas para o seu controle integrado, é necessário identificar alterações na expressão gênica de isoenzimas e proteínas que poderiam estar relacionadas ao desenvolvimento de mecanismos de resistência desses insetos. O emprego da contaminação em laboratório com concentrações subletais de inseticidas organofosforados, carbamatos e piretróides podem contribuir com esses estudos. Assim, larvas de broca da cana do segundo ao quinto ínstar foram contaminadas com diferentes concentrações desses pesticidas. Após 24 horas, as sobreviventes foram quantificadas, sacrificadas e submetidas à análise eletroforética. Após a contaminação com carbamato, foi verificado que apenas no terceiro ínstar não houve correlação entre a mortalidade e a concentração de inseticida; com o piretróide, não houve correlação entre a mortalidade e a concentração de inseticida; com o organofosforado, houve correlação entre a mortalidade e a concentração de inseticida nos quatro instars larvais da broca da cana. As análises eletroforéticas de extratos de larvas sobreviventes após a contaminação com organofosforado mostraram que houve inibição parcial das EST-7 (acetilesterase) e EST-8 nas concentrações de 0,6% e 0,4% e total da EST-3 (colinesterase I) em todas as concentrações empregadas. Após a contaminação com o piretróide, foi detectada uma nova região de proteína, que provavelmente pode ter papel na resistência a esse inseticida. As alterações na expressão gênica, identificadas após o contato com baixas concentrações de inseticidas, mostram que esses mecanismos podem estar associados a mecanismos de resistência da broca da cana.

Palavras-chave: broca da cana, doses subletais, isoenzimas, resistência, pesticidas.

ABSTRACT

Given the economic importance of *Diatraea saccharalis*, insect pests of sugar cane and the use of insecticides for its control part, is to identify changes in gene expression of isozymes and proteins that may be related to the development of mechanisms of insects resistance. The use of contamination in the laboratory with sublethal concentrations of organophosphate insecticides, carbamates and pyrethroids may contribute to these studies. Thus, the sugarcane borer from second to fifth instar were contaminated with different concentrations of these pesticides, after 24 hours the survivors were measured, sacrificed and subjected to electrophoretic analysis. After contamination with carbamate was found that only the third call there was is no correlation between mortality and concentration of insecticide with a pyrethroid, no correlation between mortality and the concentration of insecticide; with the organophosphate there no correlation between mortality and concentration of insecticide in four instars. The electrophoretic analysis of extracts of larvae surviving after contamination with organophosphate show that there was partial inhibition of EST-7 (acetylesterase) and EST-8 at concentrations of 0.6% and 0.4% respectively and total inhibition and EST-3 (cholinesterase I) at all concentrations employed. After contamination with the pyrethroid was found a new region of protein, which probably could have role in resistance to this insecticide. Changes in gene expression identified way after contact with low concentrations of insecticides and show that these mechanisms may be associated with mechanisms of resistance to the sugarcane borer.

Key words: sugarcane borer, sublethal doses, isozymes, resistance, pesticides

1. INTRODUÇÃO

Entre os insetos mais prejudiciais está a *D. saccharalis* (Fabricius, 1794) que, devido à grande expansão da cultura da cana-de-açúcar, passou a atacar outras culturas, dentre elas o sorgo e o milho (Boiça Júnior e Lara, 1993).

A broca da cana-de-açúcar é uma das principais pragas desta cultura e causa prejuízos diretos, como abertura de galerias que levam à perda de peso da cana, e provocam a morte das gemas, causando falhas no brotamento. Nas canas novas, a broca produz o secamento dos ponteiros, conhecido como “coração morto” (Wenzel, 2006).

Segundo a Conab (Companhia Nacional de Abastecimento, 2009) a safra da cana-de-açúcar 2009/2010 representaria um aumento de 8,6% a 10,7% do obtido na safra passada, ou seja, uma quantidade de 49,4 a 61,1 milhões de toneladas adicionais do produto.

A região Centro-Sul inclui os Estados da região Sudeste, Sul e Centro-Oeste, com participação próxima de 90,0% do total nacional. O desempenho dos estados revela que, na região Centro-Sul, o crescimento da produção ocorre em praticamente todos os Estados, com destaque para os Estados de Goiás, com acréscimo de 47,3%; seguido de Mato Grosso do Sul, com 28,7%; Paraná, com 20,2%; e Minas Gerais, com 14,9%. Esse resultado deve à entrada, nesta safra, de 25 novas usinas no sistema produtivo (Conab, 2009).

A cultura da cana-de-açúcar respondeu, em 2002, por 11,5% das vendas de agrotóxicos no Brasil, atrás somente da cultura da soja. Em 2003, essa cultura representou 8% das vendas, ocupando a quarta posição e movimentando 251 milhões de dólares (Armas et al., 2005).

Em países latino-americanos, principalmente no Brasil, o controle biológico é o método mais comum de conter *D. saccharalis*. Insetos parasitas da ordem Hymenoptera estão sendo extensivamente usados para o controle biológico de *D. saccharalis* (Conte, 1994).

Os primeiros registros do homem utilizando inseticida, com objetivo de reduzir perdas pelo ataque dos insetos às suas culturas, datam de 1000 a.C. e o

controle químico de pragas teve início na década de 40, com o emprego do DDT (Ware, 1994).

A broca da cana-de-açúcar tem um histórico de desenvolvimento de resistência a inseticidas de diferentes classes. Resistência para endrin foi detectado em populações no campo depois de seis estações de pulverização de hidrocarbonetos clorados para fixar a aplicação em Lousiana (Yadav et al., 1965). No Texas, resistência em populações de campo foi detectada para organofosforados e carbamatos após vários ciclos de aplicações (Reagan et al., 1979).

Os pesticidas mais empregados são os organofosforados e os carbamatos, cujos efeitos tóxicos resultam do acúmulo de acetilcolina na fenda sináptica, levando a uma estimulação excessiva dos receptores de acetilcolina, produzindo sintomas neurotóxicos (Stefanidou et al., 1996).

Rossiter et al. (2001) sugerem que a eletroforese pode ser empregada para detectar alterações na atividade esterásica. Esta ferramenta é simples e rápida, sendo mais eficiente que a determinação quantitativa dessas enzimas, devido à capacidade desta técnica para quantificar tanto diferenças quantitativas quanto qualitativas.

Uma das maneiras de realizar este estudo é através de análises eletroforéticas das esterases, verificando se há ausência ou presença de alguma região esterásica ou de proteína total. Assim, é possível utilizar esta região como marcador bioquímico para detectar a presença de determinado pesticida na região.

Aliado ao estudo de doses subletais de pesticidas, o objetivo desse trabalho foi verificar as alterações na atividade relativa das esterases e proteínas totais que estariam associadas à resistência a agrotóxicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

O desenvolvimento do estudo foi realizado com larvas de *Diatraea saccharalis*, mantidas em laboratório de criação do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá (DBC-UEM), sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 a 14 horas, umidade de 70 a 100% e dieta artificial desenvolvida por Hensley e Hammond (1968).

2.2. Preparo das amostras

As amostras foram homogeneizadas individualmente em solução a 0,1% de 2-mercaptoetanol, contendo glicerol a 10% (40 μL a 120 μL , conforme o ínstar da larva), e mais 15 μL de tetracloreto de carbono, centrifugadas a 11751 xg por 15 minutos a 4°C . Do sobrenadante resultante, 13 μL foram aplicados nos géis PAGE para análises das esterases e padrão de inibição dessas isozimas.

Para eletroforeses de proteínas totais foram retirados 15 μL do sobrenadante, os quais foram aplicados em tubos de 0,2 mL, acrescentados 15 μL de tampão contendo solução de azul de bromofenol, mais SDS a 10%. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 100°C por 3 min, em banho-maria. 25 μL foram utilizados para aplicação no gel SDS-PAGE.

2.3. Eletroforese PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*) e SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*)

Para detecção das esterases, eletroforeses PAGE foram realizadas, utilizando géis de visualização a 12% e de empilhamento a 5% .

Os géis de visualização SDS-PAGE, para proteínas totais, foram preparados a 14% e o gel de empilhamento a 5% .

O tampão de corrida utilizado foi o Tris-glicina 0,1M pH 8,3 para eletroforese de esterases e Tris-glicina 0,1M pH 8,3 + SDS 10% para eletroforese de proteínas totais. As eletroforeses PAGE e SDS-PAGE foram realizadas a 200V

por 6h, a 5°C e 90V em temperatura ambiente até a saída do fronte, respectivamente.

Para a realização da coloração para esterase, o gel foi incubado por 30min. em 50mL da solução de tampão fosfato de sódio (0,1M pH 6,2). Em seguida, o tampão foi descartado e o gel foi incubado com uma solução de coloração, contendo: 50mL de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 6,2; 0,03g de α -naftil acetato; 0,03g de β -naftil acetato; 0,06g do corante Fast Blue RR Salt. O gel foi incubado até o aparecimento das bandas.

Para coloração das proteínas totais, os géis foram incubados em uma solução fixadora, contendo etanol (50%), ácido acético (12%) e formaldeído (0.075%) por no mínimo 1 hora. Após este período, o gel foi lavado 3 vezes com solução de etanol 50%, seguida de tratado com solução de tiosulfato de sódio 0,02% por 1 minuto. Posteriormente, o gel foi lavado novamente com água destilada por três vezes, seguida com uma solução de nitrato de prata (0,2%) por 20 minutos e finalmente o gel foi incubado com uma solução reveladora, composta por: Bicarbonato de sódio (6%), solução de tiosulfato de sódio, formaldeído e água.

2.4. Testes de inibição

Os extratos de cada larva foram utilizados duas vezes no mesmo gel PAGE, a primeira como controle e a segunda vez para o teste de inibição. Para a realização da coloração, primeiramente, o gel foi cortado e separado em duas partes: controle e inibição. O controle foi incubado apenas com 50 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 6,2 por 30 min; enquanto que para inibição foi acrescentado um dos inibidores em cada teste: 80 μ L organofosforado (malathion), 0,06g paracloromercuriobenzoato (p-CMB) ou 0,06g sulfato de eserina. Após esse período, o tampão de incubação foi descartado e foi acrescentada a solução de coloração para esterases contendo um dos inibidores.

Healy et al. (1991) utilizaram os reagentes sulfato de eserina, pCMB e organofosforado para classificar as esterases de acordo com a sensibilidade a esses inibidores.

Para classificação, foi utilizado o método empregado por Healy et al.(1990). Nestes, as carboxilesterases seriam inibidas por organofosforados, mas insensíveis ao sulfato de eserina; as arilesterases não seriam inibidas por organofosforados, mas são sensíveis ao ρ -CMB; as acetilesterases não seriam inibidas por nenhum dos três grupos de inibidores e as colinesterases seriam inibidas pelo organofosforado e sulfato de eserina. As colinesterases poderiam ser classificadas como subclasse I, quando não são inibidas pelo ρ -CMB, e subclasse II, quando são inibidas por esse reagente.

2.5. Bioensaios

Para os bioensaios, foram utilizadas larvas recém eclodidas do laboratório de criação de *D. saccharalis* do DBC-UEM. As larvas de primeiro ínstar foram mantidas com alimentação artificial, segundo Hensley e Hammond (1968), até o final do 5º ínstar, quando entram em fase de pupa. Os bioensaios foram montados com larvas do 2º ao 5º ínstar com diferentes concentrações subletais de inseticidas. Cada bioensaio era composto de três repetições e um controle. Os testes foram realizados separadamente para cada ínstar em diferentes concentrações do inseticida. Os experimentos foram montados em placas de Petri de 20 cm de diâmetro, contendo papel de filtro embebido com 1,5 mL de solução com inseticida e alimento preparado no laboratório. Em cada placa de Petri foram colocadas 25 larvas e mantidas por um período de 24 horas.

Os inseticidas utilizados foram o Larvin (carbamato), Galgotrin (piretróide) e Malathion (organofosforado) em concentrações subletais (Quadros 2, 3 e 4 respectivamente). Após esse tempo, as sobreviventes foram contadas, sacrificadas e submetidas à eletroforese. As amostras foram estocadas a -20°C pelo menor espaço de tempo possível para análise das isozimas.

2.6. Análise de dados

Após a visualização das bandas, foi realizada a comparação entre o controle e a inibição para posterior classificação das esterases. Os dados de mortalidade foram submetidos ao programa SPSS 13.0, para análise de correlação entre

concentração do inseticida e mortalidade, e estimativa do coeficiente de determinação (R^2).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em larvas de *D. saccharalis* foram detectadas oito regiões de esterases denominadas de EST-1 a EST-8 de acordo com a mobilidade eletroforética (Figura 1). A caracterização bioquímica das esterases foi importante para o desenvolvimento do estudo sobre as alterações da expressão dessas isozimas após a contaminação com pesticidas.

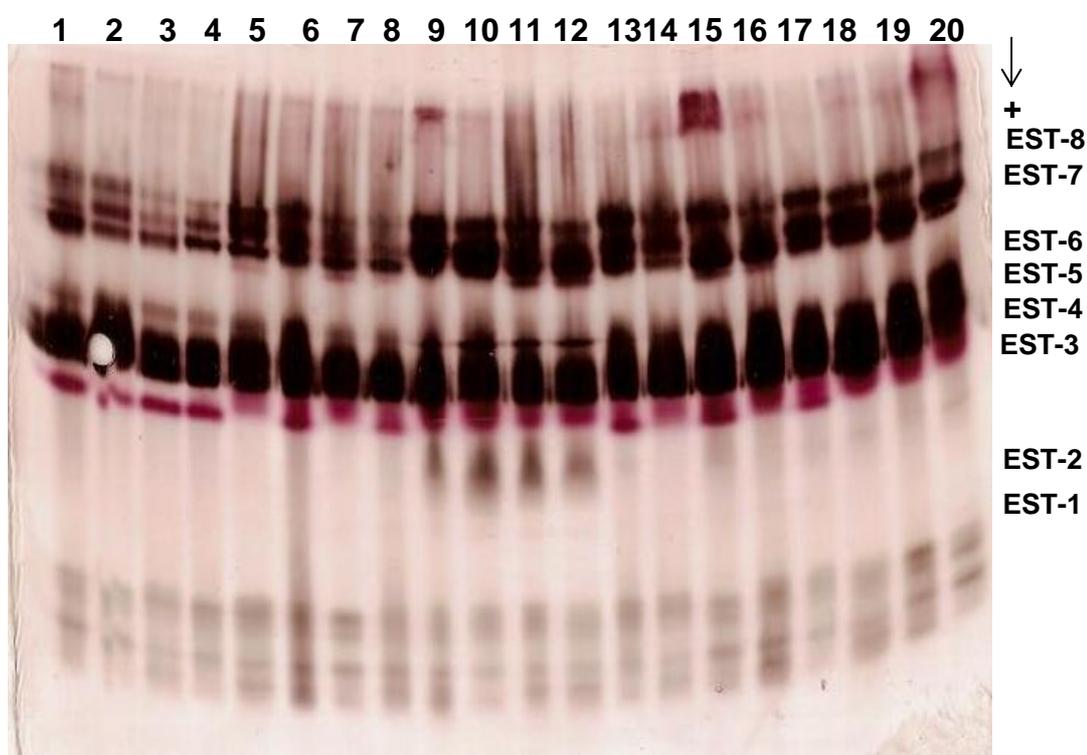


Figura 1 - Perfil eletroforético das esterases em extratos de larvas de segundo ínstar de *Diatraea saccharalis*, submetidas a doses subletais do organofosforado malathion: 1-4= 0,4%; 5-8= 0,2%; 9-12= controle; 13-16= 0,1%; 17 a 20= 0,025%.

O Quadro 1 mostra os resultados do padrão de inibição. As EST-1, EST-2, EST-6 e EST-8 não foram classificadas, pois não seguem o padrão de inibição para a classificação utilizada por Healy et al. (1991). A EST-3 é uma colinesterase I e as EST-5 e EST-7 são acetilesterases.

Quadro 1 - Classificação das esterases de larvas de *Diatraea saccharalis* acordo com Healy *et al.* (1991). (+) inibição, (-) não inibição

Esterases	Malathion	ρ -CMB	Sulfato de eserina	Classificação
EST-1	-	-	+	-----
EST-2	-	-	+	-----
EST-3	+	-	+	Colinesterase I
EST-4	-	+	+	-----
EST-5	-	-	-	Acetilesterase
EST-6	-	-	+	-----
EST-7	-	-	-	Acetilesterase
EST-8	-	-	+	-----

Os bioensaios com carbamato (Larvin) mostraram que somente no 3º instar não houve correlação entre a mortalidade e a concentração de inseticida utilizado (Figura 2). Os valores de R^2 obtidos foram semelhantes no 4º e 5º ínstars (Quadro 2).

Quadro 2 - Valores de mortalidade em porcentagem (%) e de coeficiente de determinação para as concentrações de Carbamato (Larvin) empregadas nos bioensaios com larvas de *Diatraea saccharalis*. R^2 = coeficiente de determinação

Ínstar	Concentração do Carbamato (%)				R^2
	7	6	5	4	
2º	68%	58%	52%	52%	0,865
3º	72%	56%	65%	61%	0,180
4º	57%	57%	49%	25,33%	0,743
5º	40%	32%	24%	2%	0,741

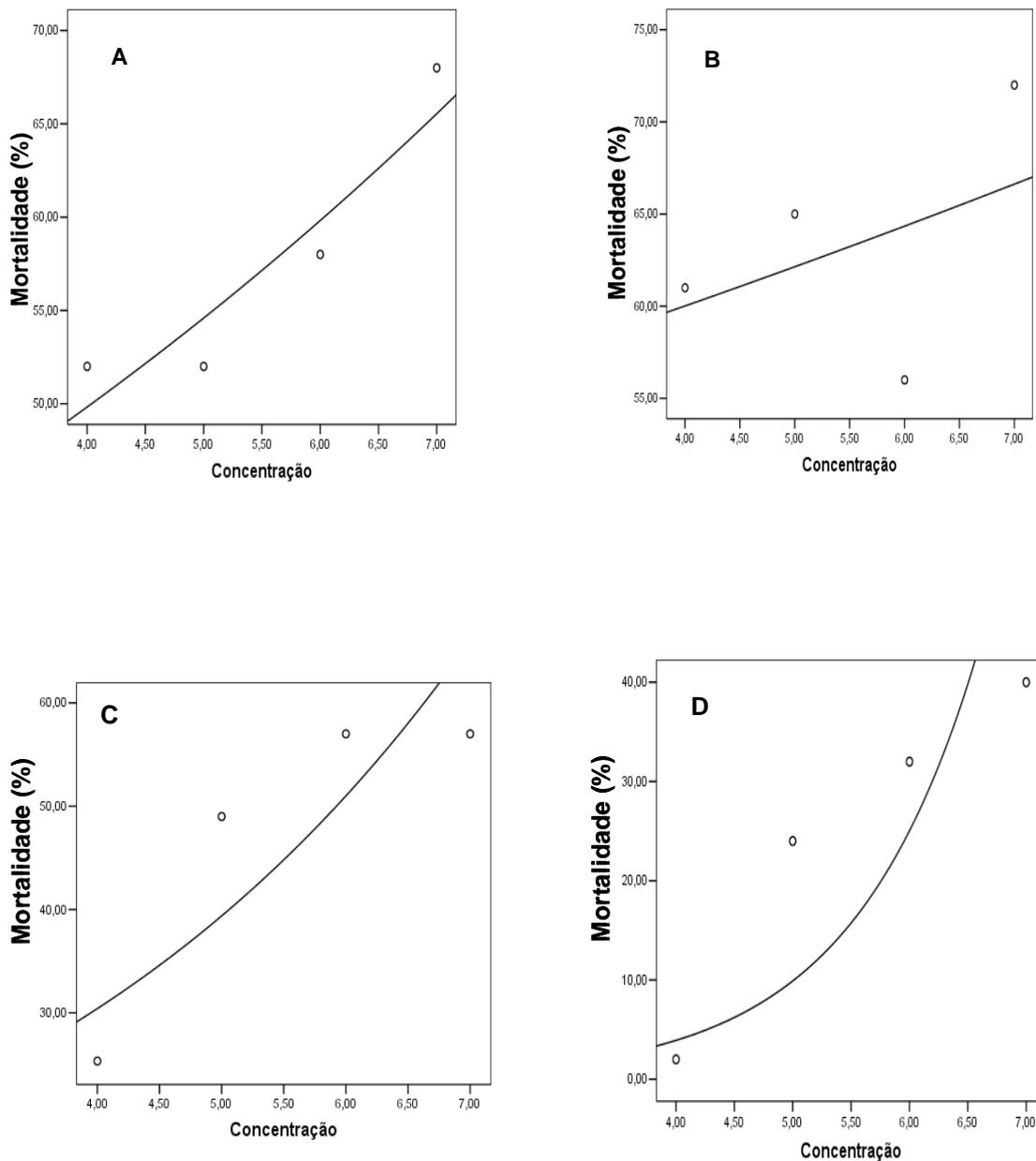


Figura 2 - Análise de regressão da mortalidade das larvas de *Diatraea saccharalis* após a contaminação com o inseticida carbamato (Larvin). A= segundo ínstar ($R^2= 0,865$); B= terceiro ínstar ($R^2= 0,180$); C= quarto ínstar ($R^2= 0,743$); D= quinto ínstar ($R^2= 0,741$).

Os resultados obtidos com o piretróide Galgotrin mostraram que não houve correlação entre a mortalidade e a concentração de inseticida empregado (Quadro 3 e Figura 3) em todas idades analisadas.

Quadro 3 - Valores de mortalidade em porcentagem (%) e de coeficiente de determinação para as concentrações de piretroíde (Galgotrin) empregadas nos bioensaios com larvas de *Diatraea saccharalis*. R²= coeficiente de determinação

Ínstar	Concentração do Piretroíde (%)				R ²
	10	8	7	6	
2º	40%	36%	26,6%	34,66%	0,356
3º	28%	45,33%	25,33%	10,66%	0,383
4º	30,66%	40%	26,66%	2,66%	0,479
5º	2,66%	28%	0%	1,33%	0,124

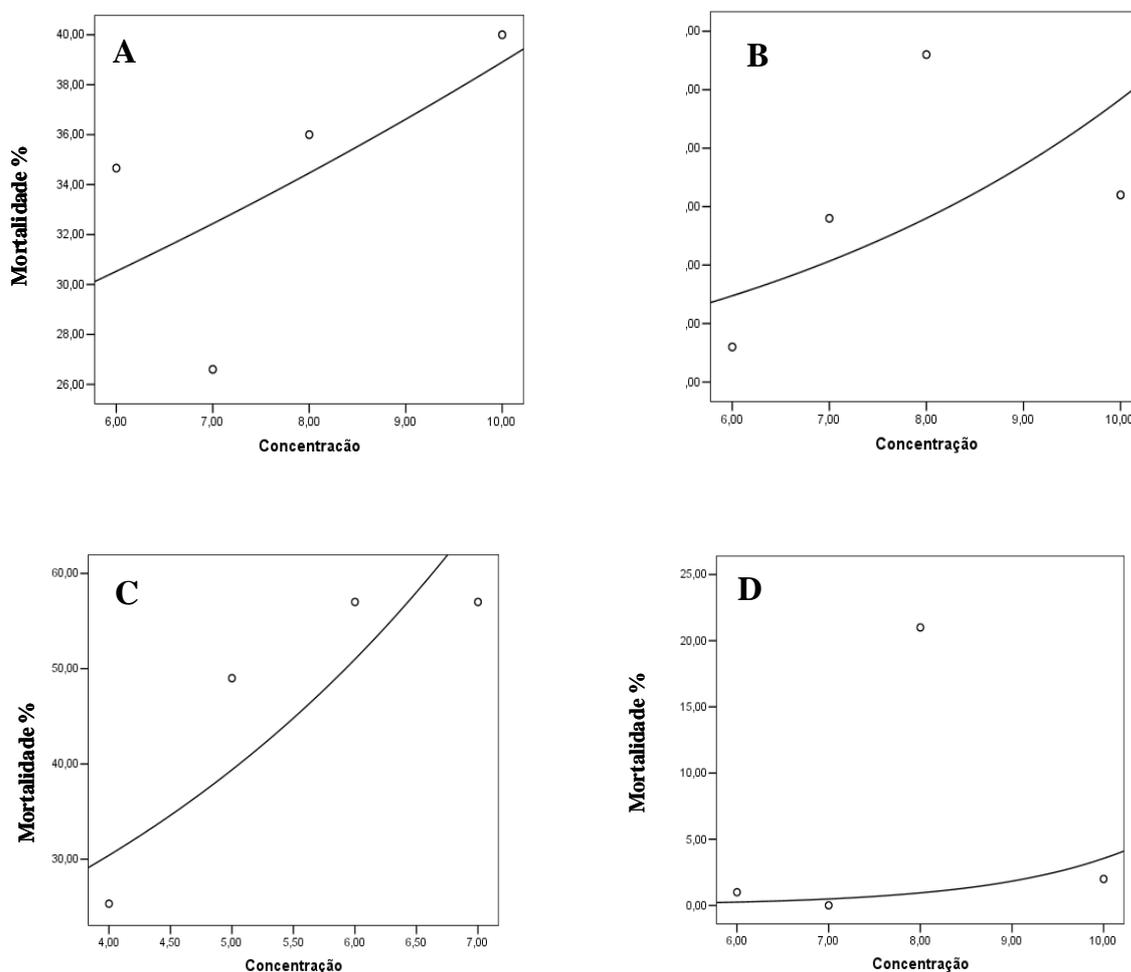


Figura 3 - Análise de regressão da mortalidade das larvas de *Diatraea saccharalis* após a contaminação com o inseticida piretróide (Galgotrin). A= segundo ínstar (R²= 0,356); B= terceiro ínstar (R²= 0,383); C= quarto ínstar (R²= 0,479); D= quinto ínstar (R²= 0,124).

Segundo Saleem et al. (2008), flutuações na resistência a inseticidas, na ausência de pressão de seleção, podem ser devidas a um *fitness* não medido de genes para resistência, ao movimento de insetos dentro da área global de cultivo e/ou diluição de resistência por meio de cruzamentos com indivíduos susceptíveis. Tal fato permite sugerir que a introdução de inseticidas com novos modos de ação poderiam ajudar na redução da frequência de genes para resistência (Razaq et al., 2007). Esta sugestão está sendo facilitada pela introdução contínua de novas classes de inseticidas, como neonicotinoides e reguladores de crescimento de inseto que seriam mais compatíveis com o controle integrado de insetos que os inseticidas mais velhos (Saleem et al., 2008).

A Figura 4 mostra que houve correlação entre a mortalidade e a concentração de organofosforado (Malathion), empregado nos quatro ínstaras das larvas da broca da cana. Foi verificada uma diminuição nessa correlação com aumento da idade das larvas, sendo que no quinto instar detectamos a menor correlação (Quadro 4).

Quadro 4 - Valores de mortalidade em porcentagem (%) e de coeficiente de determinação para as concentrações de organofosforado (Malathion) empregado nos bioensaios com larvas de *Diatraea saccharalis*. R²= coeficiente de determinação

Instar	Concentração do Organofosforado (%)						R ²
	0,8	0,6	0,4	0,2	0,1	0,025	
2°	-	74,6%	74,6%	29,33%	8%	2,67%	0,808
3°	-	72%	10,67%	8%	0%	0%	0,788
4°	64%	40%	25,33%	34,67%	0%	0%	0,609
5°	54,66%	52%	10,66%	16%	0%	1,33%	0,505

Resultado similar foi obtido por Urbaneja et al. (2009), trabalhando com *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Neste trabalho, encontraram 60% de mortalidade e efeitos subletais nos sobreviventes, como baixa fecundidade e baixa sobrevivência de fêmeas.

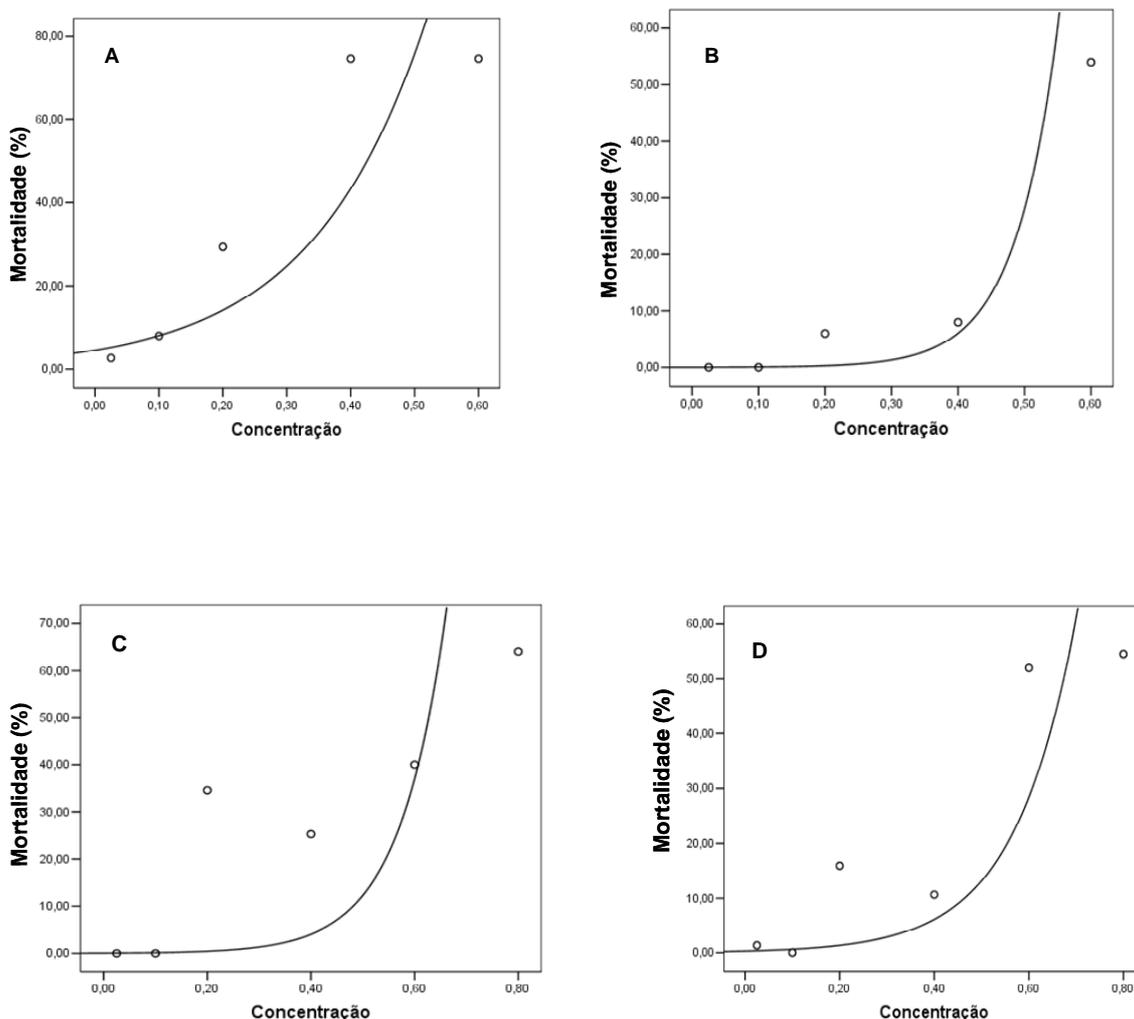


Figura 4 - Análise de regressão da mortalidade das larvas de *Diatraea saccharalis* após a contaminação com o inseticida organofosforado (Malathion). A= segundo ínstar ($R^2= 0,808$); B= terceiro ínstar ($R^2= 0,788$); C= quarto ínstar ($R^2= 0,609$); D= quinto ínstar ($R^2= 0,505$).

As análises eletroforéticas de extratos de larvas sobreviventes, após a contaminação com organofosforado (Malathion), mostraram que houve inibição parcial das EST-7 e EST-8, nas concentrações de 0,6%, 0,4% e 0,2%, e total da EST-3 em todas as concentrações empregadas (Figura 1). Esses resultados mostram que a EST-3, que é uma colinesterase I, pode se tornar uma isozima importante para o estudo da resistência de *D. saccharalis* após a contaminação com doses subletais de malathion. Na literatura, há duas hipóteses sobre o mecanismo de resistência aos organofosforados. A primeira sugere que há um aumento na atividade de

detoxicação de enzimas (Gunning et al., 2005). A segunda sugere modificação na enzima acetilcolinaesterase, que seria o sítio alvo desse inseticida (Hama, 1983).

Alterações na atividade relativa das esterases foram obtidas por Attencia et al. (2005) após contaminação de abelhas *A. mellifera* com concentrações subletais do organofosforado Malathion. Nesse estudo, os autores obtiveram tanto aumento quanto à redução da atividade relativa dessas isozimas após a contaminação com o inseticida.

Os organofosforados e os carbamatos, têm sido largamente utilizados como inseticidas, pois inibem a enzima acetilcolinaesterase (AChE) no sistema nervoso de vertebrados e de invertebrados (Segall e Casida, 1982). O principal sítio de ação dos inseticidas organofosforados (Steenland, 1996) é o sistema nervoso na junção neuromuscular, interagindo com a AChE, cuja função é catalisar a hidrólise da acetilcolina (ACh) em ácido acético e colina, interrompendo a transmissão de impulsos nervosos nas sinapses dos neurônios colinérgicos do sistema nervoso central e periférico (O'Brien, 1960; Marrs, 1993). A ACh é um mediador químico, necessário para transmissão dos impulsos nervosos, presente nos mamíferos e insetos e, quando a AChE é inibida, ocorre a paralisia e morte do inseto (Karczmar, 1998).

O processo de inibição da AChE depende muito da estrutura do organofosforado inibidor (Sultatos, 1994). A interação entre a acetilcolinaesterase e seu inibidor organofosforado parece envolver somente o sítio esterásico, formando um complexo bastante estável, sendo esta estabilidade relacionada fundamentalmente à estrutura química do inibidor. A inibição da AChE é irreversível; ela é impedida de reagir com o sítio esterásico, ocorrendo seu acúmulo onde é normalmente liberada, resultando em toda a sintomatologia da intoxicação por ACh, ocasionada por compostos organofosforados (Segall e Casida, 1983; Seanaayake et al., 1987; Lotti, 1992; Ecobichon, 1996).

Os resultados obtidos das análises das esterases presentes em larvas de *D. saccharalis* após a contaminação com carbamato e piretroíde mostraram que a atividade relativa dessas isozimas não foi alterada após os bioensaios realizados.

A análise de proteínas totais para todas as concentrações com organofosforado e carbamato mostrou que não houve nenhuma alteração na expressão destas proteínas.

Após a contaminação com o piretróide galgotrin foi detectada uma nova região de proteína. A contaminação com o piretróide provavelmente ativou a expressão de genes que atuam de alguma maneira na detoxificação do organismo do inseto. Estes resultados permitem sugerir que essa proteína pode ter papel na resistência ao piretróide.

Os piretróides têm como alvo os canais de sódio dependentes de voltagem (Savage et al., 1988; Rosenstock, et al., 1991; Hirata, 1995). Estes inseticidas interferem na condutância iônica da membrana nervosa pelo prolongamento da corrente de sódio, estimulando os nervos a descarregarem repetidamente e causando hiperexcitabilidade nos animais contaminados.

Os principais sistemas de metabolismo do piretróide envolvem a quebra de éster por ação de esterase e oxidação de várias partes da molécula. Dessa maneira, em nosso estudo, após a contaminação com o piretróide, pode ter ocorrido a ativação de genes para esterases que não seriam detectados nas colorações com α e β -naftil acetato, mas que atuaram no metabolismo desse inseticida. Assim, será importante o desenvolvimento de estudo para a identificação desse peptídeo, detectado após a contaminação pelo piretróide, para entendermos melhor o seu mecanismo de desintoxicação e possivelmente resistência ao inseticida.

Esses diferentes mecanismos de resistência surgem com a contaminação por doses subletais dos inseticidas. Nossos resultados mostraram que esses mecanismos podem estar associados à expressão gênica diferencial após o contato com baixas concentrações de inseticidas, principalmente organofosforado e piretróide, pois foi detectada a inibição total da EST-3 e parcial das EST-7 e EST-8, após contaminação com o malathion e identificação de um novo peptídeo após contaminação com o galgotrin.

A partir desses dados, serão necessários novos estudos de sequenciamento dessas proteínas e se possível identificação dos genes em nível molecular para podermos inferir a sua atuação na resistência de larvas de *D. saccharalis*.

4. CONCLUSÕES

- a) Houve inibição parcial da EST-7 e EST-8 e inibição total da EST-3 após o contato com organofosforado Malathion.
- b) Os bioensaios com o inseticida organofosforado malathion permitiram verificar que houve correlação entre a mortalidade e a concentração desse inseticida após contaminação por contato em todos os ínstares analisados.
- c) Foi detectada uma nova região de proteína após o contato com o inseticida piretróide Galgotrin.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, M.; ARIF, M.I.; AHMAD, Z. Monitoring insecticide resistance of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae) in Pakistan. **Journal of Economic Entomology**, 88:771-776, 1995.
- ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R.T.R.; AMÂNCIO, A.W.; CORREA, R.M.L.; GUERCIO, M.A. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do rio corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Química Nova**, 28:975-982, 2005.
- ATTENCIA, V.M.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M.C.C.; TOLEDO, V.A.A. Esterase activity in *Apis mellifera* after exposure to organophosphate insecticides (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, 45:587-595, 2005.
- BOIÇA JÚNIOR, A.L.; LARA, F.M. Resistência de genótipos de sorgo ao ataque de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) e determinação dos tipos envolvidos. **Sociedade Entomológica do Brasil**, 22:245-252,1993.
- CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em www.conab.gov.br. Acesso em: 16, junho, 2009.
- CONTE, H. **Morfologia do corpo gorduroso em larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera; Piralidae) não parasitadas e parasitas por *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae)**. Rio Claro: UNESP, 1994. 120p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular).
- DENOLM, I.; ELLIOT, M. Roman Mieczyslaw Sawicki. **Biographical Memoirs of Fellows of the Royal Society**, 41:396-418, 1995.
- ECOBICHON, D.J. **Toxic effects of pesticides**. New York: D. Klaussen, 1996. 643p.
- GALLO, D.; ALVES, S.B.; BAPTISTA,G.C.; BERTI FILHO, E.; CARVALHO, R.P.L.; LOPES, J.R.S.; MARCHINI, L.C.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; OMOTO, C.; PARRA, J.R.P.; VENDRAMIM, J.D.; ZUCCHI, R.A. **Entomologia Agrícola**, 86:450-462, 2002.

- GUNNING, R.V.; DANG, H.T.; KEMP, F.C.; NICHOLSON, I.C.; MOORES, G.D. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry 1 Ac toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, 71:2558-2563, 2005.
- HAMA, H. Resistance to insecticides due to reduced sensitivity of acetylcholinesterase. In: GEORGHIOU, G.P.; SAITO, T. (eds.). **Pest resistance to pesticides**. New York: Plenum Press, 1983. p. 299-331.
- HEALY, M.J.; DUMANCIC, M.M.; OAKESHOTT, J.G. Biochemical and physiological studies of soluble esterases from *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Genetics**, 29:365-387, 1991.
- HENSLEY, S.; D.; HAMMOND, A.M. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. **Journal of Economic Entomology**, 61:1742-1743, 1968.
- HIRATA, R. Piretróides: Estrutura química – atividade biológica. **Química Nova**, 18:368-373, 1995.
- JAMAL, A.G.; HANSEN, S.; JULU, P.O.O. Low level exposures to organophosphorus esters may cause neurotoxicity. **Toxicology**, 181:23-33, 2002.
- KARCZMAR, A. Anticholinesterase: dramatic aspects of their use and misuse. **Neurochemistry**, 32:401-411, 1998.
- LAPENTA, A.S.; BICUDO, H.E.M.C.; CERON, C.R.; CORDEIRO, J.A. Esterase patterns of species in the *Drosophila buzattii* cluster. **Cytobios**, 84:18-29, 1995.
- LOTTI, M. The pathogenesis of organophosphate polyneuropathy. **Toxicology**, 21:465-487, 1992.
- MARRS, T.C. Organophosphate poisoning. **Pharmacology & Therapeutics**, 58:51-66, 1993.
- O'BRIEN, R.D. **Toxic phosphorus esters: chemistry, metabolism, and biological effects**. New York: Academica, 1960. 434p.

- RAZAQ, M.; SUHAIL, A.; ARIF, M.J.; ASLAM, M.; SAYYED, A.H. Effect of rotational use of insecticides on pyrethroids resistance in *Helicoverpa armigera* (Lep.: Noctuidae). **Journal Applied Entomology**, 131:460-465, 2007.
- REAGAN, T.E.; HENSLEY, S.D.; HUFFMAN, F. R.; FUCHS, T.W. Response to insecticides of the sugarcane borer in Louisiana and Texas. **Journal of Economic Entomology**, 72:94-96, 1979.
- ROSENSTOCK, L.; KEIFER, M.; DANIELL, W.E.; MCCONNELL, R.; CLAYPOOLE, K. Chronic central nervous system effects of acute organophosphate pesticide intoxication. The Pesticide Health Effects Study Group. **The Lancet**, 338:223-227, 1991.
- ROSSITER, L.C.; GUNNING, R.V.; ROSE, H.A. The use of polyacrylamide gel electrophoresis for the investigation and detection of fenitrothion and clorpyrifos-methyl resistance in *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 69:27-34, 2001.
- SALEEM, M.; AHMAD, A.; AHMAD, M.; ASLAM, M.; SAYYED, A.H. Resistance to selected organochlorin, organophosphate, carbamate and pyrethroid, in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuide) from Pakistan. **Journal of Economic Entomology**, 101:1667-1675, 2008.
- SAVAGE, E.P.; KEEFE, T.J.; MOUNCE, L.M.; HEATON, R.K.; LEWIS, J.A.; BURCAR, P. J. Chronic neurological sequelae of acute organophosphate pesticide poisoning. **Arch Environ Health**, 43:38-45, 1988.
- SEGALL, Y.; CASIDA, J.E. Oxidative conversion of phosphorothiolates to phosphinyloxysulfonates probably via phosphorothiolate S-oxides. **Tetrahedron Lett**, 23:139-142, 1982.
- SEGALL, Y.; CASIDA, J.E. Oxidation of sulfallate and related alkyl dialkyldithiocarbamates to dialkylformamides via sulfine and iminium ion intermediates. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 18:209-211, 1983.

- SEANAAYAKE, N.; KARALIEDDE, L. Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. An intermediate syndrome. **Journal of Medicinal Chemistry**, 316:761-763, 1987.
- STEENLAND, K.J. Chronic neurological effects of organophosphate pesticides. **Medical**, 312:1312 -1313, 1996.
- STEFANIDOU, M.; KOUTSELINIS, A.; PAPPAS, F.; METHENITOU, G. Bee head acetylcholinesterase as an indicator of exposure to organophosphate and carbamate insecticides. **Veterinary Human Toxicology**, 38:420-422, 1996.
- SULTATOS, L.G. Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. **Journal of Toxicology Environmental Health**, 43:271-289, 1994.
- URBANEJA, A.; CHUECA, P.; MONTÓN, H.; PASCUAL-RUIZ, S.; DEMBILIO, O.; VANACLOCHA, P.; ABAD-MOYANO, R.; PINA, T.; CASTAÑERA, P. Chemical alternatives to malathion for controlling *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), and their side effects on natural enemies in Spanish *Citrus orchards*. **Journal of Economic Entomology (Ecotoxicology)**, 102:144-151, 2009.
- WARE, G.W. **The pesticide book**. Califórnia: Fresno, 1994. 74p.
- WENZEL, I.M.; GIACOMETTI, F.H.C.; ALMEIDA, J.E.M. Patogenicidade do isolado IBCB 66 de *Beauveria bassiana* à broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* em condições de laboratório. **Instituto Biológico**, 73:259-261, 2006.
- YADAV, R.P.; ANDERSON, H.L.; LONG, W.H. Sugarcane borer resistance to insecticides. **Journal Economic Entomology**, 58:1122-1124, 1965.

CAPÍTULO II

Genética de populações de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) por meio de RAPD

RESUMO

As brocas do gênero *Diatraea*, como a *D. saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae), são consideradas as principais pragas da cana-de-açúcar, estando distribuídas em todas as regiões canavieiras do país. A espécie *D. saccharalis* é encontrada em todo o Brasil, infestando várias gramíneas e provocando perdas econômicas. Em países latino-americanos, o controle integrado é o método mais comum de conter esta praga. Embora não haja informações sobre a estrutura genética de populações de *D. saccharalis*, a análise da variabilidade genética é especialmente importante para o bem sucedido programa de controle de pragas em larga escala. O objetivo desse trabalho foi o estudo da genética de populações por meio de marcadores RAPD em *D. saccharalis*. As amostras foram coletadas em quatro regiões do estado do Paraná: Paranacity, Engenheiro Beltrão, Tapejara e Centenário do Sul; e uma do estado de São Paulo: Itororó do Paranapanema. Foram empregados 12 *primers* RAPD, os quais produziram 216 fragmentos, com 99,54% de polimorfismo. O índice de Shannon foi em média 0,3797 ($\pm 0,1729$) e o valor médio encontrado do G_{ST} nas cinco populações foi de 0,0909, mostrando que as populações não estão diferenciadas e poderiam estar ocorrendo fluxo gênico entre elas. O alto grau de polimorfismo dentro e entre as populações mostrou que esses insetos provavelmente apresentam resistência a inseticidas ou que rapidamente poderão desenvolver esse tipo de resistência. De acordo com os resultados do trabalho, o controle e o manejo dessa praga necessita de constantes avaliações de variabilidade genética para que estratégias adequadas sejam encaminhadas.

Palavras-chave: *Diatrea saccharalis*, genética de populações, polimorfismo.

ABSTRACT

The borer of the genus *Diatraea* such *D. saccharalis* is regarded as the main pests of sugar cane, being distributed in all regions of the country. *D. saccharalis*. The species is found throughout Brazil infesting various grasses and causing at times economic losses. In Latin American countries, the integrated control is the most common method of containing *D. saccharalis*. Although no information on the genetic structure of populations *D. saccharalis*, the analysis of genetic variability is especially important for the successful program to control pests in large scale, and based on that the aim of this work was to study the genetics of populations by means of RAPD markers in *D. saccharalis*. Samples were collected in four regions of the northwest of Paraná: Paranacity, Engenheiro Beltrão, Primeiro Centenário and Tapejara; and a state of São Paulo: Itororó de Paranapanema. We used 12 RAPD primers, which produced 216 fragments, with 99, 54% of polymorphism. The Shannon index was on average 0.3797 ($\pm 0, 1729$), and the average value of the GST found in the five populations was 0.0909, showing that populations are not differentiated and may be occurring gene flow between them. The high degree of polymorphism within and between populations shows that these insects probably have resistance to quickly insecticides or that can develop this type of resistance. These results provide indication that the control and management of this pest requires a constant assessment of genetic variability that appropriate strategies are implemented.

Key words: *Diatraea saccharalis*, polymorphisms, genetics of populations

1. INTRODUÇÃO

À medida que as áreas de plantio de cana-de-açúcar vêm se expandindo, ocorre um aumento proporcional da população das pragas-chave da cultura, dentre estas, destaca-se a broca *D. Saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) (Folegatti, 1985).

As brocas do gênero *Diatraea*, como a *D. saccharalis*, são consideradas as principais pragas da cana-de-açúcar, estando distribuídas em todas as regiões canavieiras do país (Planalsucar, 1977). Os prejuízos decorrentes das infestações por *Diatraea* em cana-de-açúcar alcançam cifras significativas entre 1% a 6%.

Além da cana-de-açúcar, esses insetos infestam várias outras gramíneas e provocando, às vezes, perdas econômicas (Ferreira, 1998; 1999; Ferreira et al., 2001).

As lagartas da broca da cana causam prejuízo direto pela abertura de galerias, que ocasionam perda de peso da cana e provocam a morte das gemas, causando falhas na germinação. Quando a broca faz galerias circulares (transversais), seccionando o colmo, elas provocam o tombamento da cana pelo vento. Enraizamento aéreo e brotações laterais podem também ocorrer devido ao ataque da praga (Gallo et al., 2002). Uma vez no interior do colmo, o controle das larvas torna-se muito difícil e, devido a essa dificuldade, passou-se a enfatizar trabalhos que busquem obter medidas alternativas, dentre elas a resistência de plantas, podendo ela ser constitutiva ou induzida (Lara, 1991).

As condições climáticas e ecológicas prevalecem no Brasil. A broca da cana-de-açúcar também aumenta a susceptibilidade de patógenos, permitindo a invasão deles por podridão do caule das larvas através dos túneis, com infecção vermelha causada por fungos (*Physalospora tucumanensis*), particularmente freqüente.

Em países latino-americanos, o controle biológico é o método mais comum de conter *D. saccharalis* (William et al., 1969; Guagliumi, 1973). Insetos parasitas hymenopteras estão sendo extensivamente usados para o controle biológico de *D. saccharalis* (Conte, 1994).

Ruvolo-Takasusuki et al. (2002) avaliaram o polimorfismo de esterases em pupas de *D. saccharalis* mantidas em laboratório. Nesse estudo foram detectadas oito regiões de atividade esterásica, mas somente a EST-3 foi polimórfica. Os autores detectaram a presença de dois alelos para essa isozima, com alta heterozigosidade e inferiram que a EST-3 poderia ser utilizada como marcador molecular para esse inseto.

Até o momento não há estudos sobre genética de populações de *D. Saccharali*, mas estão sendo desenvolvidas pesquisas com outras espécies de Lepidoptera, como *Spodoptera frugiperda* (Smith), praga do algodão, milho e arroz, e *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre), praga do milho.

A utilização de marcadores moleculares dominantes, como o AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*) e RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction*), poderiam contribuir com o conhecimento sobre a diversidade e a estrutura genética das populações desses insetos pragas. A diversidade genética e o fluxo gênico dentro e entre populações dessas espécies têm papel importante na resistência ou susceptibilidade a inseticidas. Essas informações são importantes para o estabelecimento de manejo e controle desses insetos.

Busato et al. (2004) analisaram a estrutura e a diversidade molecular de quatro populações de *S. frugiperda* associadas às culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul por meio do marcador AFLP. Nesse estudo foi estimado que 95% dos locos eram polimórficos. Os índices de diversidade evidenciaram que 88% da diversidade genética foram observadas dentro das populações e 12% entre as populações de *S. frugiperda*. Os autores verificaram que houve diferenciação entre as populações de acordo com a planta hospedeira, ou seja, foram detectados dois biótipos “milho” e “arroz” de *S. frugiperda*.

Martinelli et al. (2006) analisaram 10 populações de *S. frugiperda*, coletadas em culturas de milho (*Zea mays* L.) ou algodão (*Gossypium hirsutum* L.), em várias regiões geográficas do Brasil, com o marcador molecular RAPD-PCR. Os autores detectaram 98% de polimorfismo. Os resultados obtidos permitiram aos autores verificar considerável fluxo gênico entre populações desse inseto associado

com as culturas de milho e algodão nas mesmas regiões geográficas. Estas evidências são extremamente importantes, porque *S. frugiperda* é conhecida por se alimentar de ambas as culturas. Os autores ainda sugeriram que será importante desenvolver marcadores moleculares apropriados para estudar o fluxo gênico entre populações do inseto, associadas com outras plantas hospedeiras em diferentes regiões do Brasil.

A estrutura de populações de *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre), a broca do milho do mediterrâneo, foi analisada por meio de RAPD-PCR. Nesse estudo Poza et al. (2008) utilizaram populações da broca do milho da Espanha, da França, da Itália, da Grécia e da Turquia. Todas as populações analisadas estavam significativamente diferenciadas, formando grupamentos geográficos. Os autores verificaram que há uma limitada troca genética entre populações de *S. nonagrioides* da Europa, que pode contribuir para uma diminuição na taxa de propagação de alelos para resistência, uma vez que a resistência tenha sido desenvolvida em determinada localidade.

Os estudos sobre genética de populações das brocas ainda é inicial. O objetivo deste trabalho foi demonstrar a importância do conhecimento e entendimento do fluxo de genes entre as populações dessas pragas, para o entendimento da resistência a pesticidas. Nesse sentido o estudo da variabilidade genética por meio de marcadores RAPD em *D. saccharalis* foi realizado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

As amostras de larvas *D. saccharalis* foram coletadas em quatro regiões do noroeste do Paraná e uma do Estado de São Paulo, pertencentes a três usinas (Quadro 1, Figura 1). Após a coleta, os insetos foram sacrificados, colocados em gelo, levados ao laboratório e estocadas a -20°C para isolamento de DNA o mais rápido possível.

Quadro 1 - Identificação das populações de *Diatraea saccharalis*, local de coleta das amostras e a quantidade de amostras utilizadas para isolamento de DNA

Populações	Usinas	Coordenadas geográficas	Cidade	Estado	Número de amostras
pop1	Santa Terezinha	22°55'48"S 52°09'03"O	Paranacity	Paraná	12
Pop2	Sabarálcool	23°47'49" S 52°16'08" O	Engenheiro Beltrão	Paraná	12
Pop3	Santa Terezinha	23°43'59"S 52°52'24"O	Tapejara	Paraná	12
Pop4	Alto Alegre	22°49'15"S 51°35'42" O	Centenário do Sul	Paraná	12
pop5	Alto Alegre	22° 36'35"S 51° 43'16" O	Itororó do Paranapanema	São Paulo	12

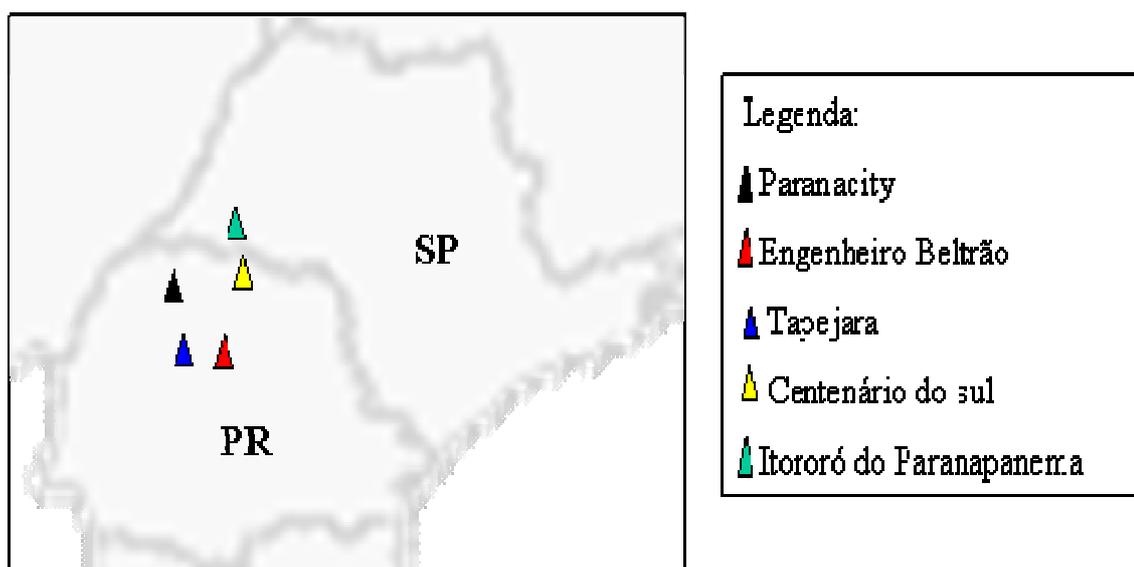


Figura 1 - Mapa dos Estados do Paraná e São Paulo, identificando os locais de coleta de *Diatraea saccharalis*.

2.2. Métodos – RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*)

2.3. Isolamento de DNA Genômico

As larvas de broca foram coletadas, sacrificadas e armazenadas a -20°C por um curto período de tempo. O número de larvas utilizadas por localidade é mostrado no Quadro 1.

O DNA genômico foi extraído de acordo com a metodologia de Doyle & Doyle (1990) modificado. As amostras foram maceradas individualmente em 500µL de solução tampão (Tris-HCl pH 8,0 0,1M; NaCl 1,4M; 2% CTAB e 0,02M EDTA) e 5 µL de proteinase K, permanecendo em banho-maria por 2 horas a 65°C. Em seguida, foram centrifugadas a 11751 xg por 10 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi retirado e acrescentado 500µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), e foi centrifugado a 11751 xg por 10min em temperatura ambiente. Após este período o sobrenadante foi retirado, transferido e acrescentado duas fases de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) consecutivas. Após a homogeneização e centrifugação da última fase de clorofórmio: álcool isoamílico, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e acrescentado 250 µL de isopropanol para precipitação do DNA por 12 horas. Após este período, o DNA foi lavado duas vezes com etanol 70% gelado e deixado secar em temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em 60 µL de tampão TE (0,01M Tris-HCl pH 8,0, 0,001M EDTA) e armazenado a -20°C .

A integridade e quantificação do DNA foram avaliadas em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (Tris, Ácido acético, EDTA, pH 8,0). A quantidade de DNA presente em cada amostra foi estimada por meio de comparação com concentrações conhecidas e graduadas de DNA-padrão (phago λ). Os géis foram corados com banho de brometo de etídio (0,5 µg/mL), as bandas de DNA visualizadas sob luz ultravioleta e a imagem capturada por sistema da EDAS (Kodak 1 D Image Analysis 3.5).

2.4. Amplificação de DNA

Para as análises RAPD foram realizados testes com 80 *primers* aleatórios desenvolvidos pela Operon Technologies Inc - Alameda, CA, USA, dos quais 12 foram amplificados (Quadro 2). As reações de amplificação foram feitas em um

termociclador Techne, conforme o protocolo original descrito por Williams et al. (1990) com pequenas modificações.

As reações foram realizadas em um volume final de 25 μL , contendo 0,2 μM de *primers*, 2 unidades de *Taq*-DNA polimerase (Gibco - BRL), 2,5 μL de tampão de reação 10X (Gibco - BRL), 0,1 mM de cada dNTP e 2,5-3,0 mM de MgCl_2 .

A desnaturação inicial do DNA foi a 94 °C por 5 minutos. Esta etapa foi seguida por 45 ciclos de amplificação (94 °C : 1 min.; 35 °C : 1 min.; 72 °C : 2 min.). Após os 45 ciclos, foi realizada uma extensão final de 7 min a 72 °C.

Os produtos das amplificações foram preparados e separados em gel de agarose 1,5% com tampão TBE 1X (89 mM Tris, 89 mM ácido bórico e 2 mM EDTA). Após este período, os géis foram corados em banho de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os fragmentos de DNA foram visualizados sob luz ultravioleta e a imagem capturada por sistema EDAS (Kodak 1 D Image Analysis 3.5).

Um marcador de peso molecular de DNA (1Kb Kadder - Gibco-BRL) foi usado para determinar o tamanho dos fragmentos gerados.

2.5. Análise da genética de populações

As análises dos dados moleculares envolveram a interpretação dos fragmentos (bandas) de DNA genômico obtidos. Os indivíduos foram comparados dentro e entre as populações, sendo as comparações feitas pela presença (1) ou ausência (0) de fragmentos de tamanhos moleculares idênticos (localizados no mesmo loco) para cada indivíduo analisado.

A variabilidade genética, dentro e entre as populações, foi determinada pela porcentagem de locos polimórficos. A diversidade genética das populações analisadas foi calculada pelo índice de Shannon (I). Também foram calculados os valores de G_{ST} . Para o cálculo dessas análises foi utilizado o programa Popgene 1.31 (Yeh et al., 1999).

A matriz de similaridade foi submetida a uma análise de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*) para construção de um dendrograma. Para esta análise foi utilizado o programa NTSYS

1.7 (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*) (Rohlf, 1989), baseado no complemento aritmético do coeficiente de Jaccard e o programa Popgene 1.31 (Yeh et al., 1999), com base no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Quadro 2 mostra que foram obtidos 216 fragmentos, sendo 215 polimórficos, correspondendo a 99,54% de polimorfismo. Esses resultados mostraram que a broca da cana *D. saccharalis* apresentou alto polimorfismo RAPD. Neste quadro, pode-se observar que o *primer* OPP-17 (25 fragmentos) apresentou o maior número de fragmentos. O menor número foi detectado com o *primer* OPA-02 (11 fragmentos).

O número e a proporção de fragmentos polimórficos detectados nas cinco populações de *D. saccharalis* analisadas estão apresentados no Quadro 3. Na população de Paranacity (PR), foi identificada a maior proporção de fragmentos polimórficos (87,50%) e na população de Centenário do Sul (PR) a menor (75,46%).

Quadro 2 - Seqüência de nucleotídeos dos *primers* utilizados, número de fragmentos obtidos e fragmentos polimórficos por *primer* utilizado nas análises RAPD de *Diatraea saccharalis*

Primer	Seqüências de nucleotídeos	Número de fragmentos	Número de fragmentos polimórficos
OPA- 01	5'- CAGGCCCTTC – 3'	16	16
OPA- 02	5'-TGCCGAGCTG-3'	11	11
OPA -08	5'- GTGACGTAGG -3'	20	20
OPA- 11	5'- CAATCGCCGT -3'	21	21
OPB- 04	5' - GGACTGGAGT -3'	19	19
OPB- 08	5'- GTCCACACGG -3'	20	20
OPB- 10	5'- CTGCTGGGAC -3'	15	14
OPB- 18	5'- CCACAGCAGT- 3'	15	15
OPC- 11	5'- AAAGCTGCGG -3'	21	21
OPC- 19	5' - GTTGCCAGCC -3'	15	15
OPP- 10	5'- TCCCGCCTAC -3'	18	18
OPP- 17	5'- TGACCCGCCT -3'	25	25
Total		216	215

Resultado similar foi obtido por Martinelli et al. (2006), trabalhando com variabilidade genética em 10 populações de *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), com marcadores dominantes RAPD. Utilizando 10 *primers*, obtiveram em média 98% de polimorfismo dos 208 fragmentos amplificados.

Poza et al. (2008) utilizaram 8 *primers* de RAPD para análise de estrutura de populações em *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) e detectaram menor polimorfismo: 65 fragmentos polimorfismos, com média de 78%.

Quadro 3 - Número e proporção de fragmentos polimórficos obtidos nas análises RAPD em cinco populações de *Diatraea saccharalis*

População	Número de Amostra	Número de fragmentos polimórficos	Fragmentos polimórficos (%)
Paranacity	12	189	87,50
Engenheiro Beltrão	12	171	79,17
Tapejara	12	171	79,17
Centenário do Sul	12	163	75,46
Itororó do Paranapanema	12	176	81,48
Total	60	216	99,54

Outros autores, estudando a variabilidade genética em Lepidoptera por meio do marcador molecular AFLP, detectaram altos valores de polimorfismo. Busato et al. (2004), utilizando cinco combinações de oligonucleotídeos em quatro populações de *S. frugiperda*, obtiveram um total de 241 bandas, sendo 229 polimórficas, representando 95% de polimorfismo. Resultado similar foi obtido por Timm et al. (2008), empregando 5 combinações de oligonucleotídeos. Os pesquisadores analisaram a estrutura de populações de *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae), obtendo 95% de locos polimórficos.

Em *D. saccharalis*, a estimativa da diversidade genética pelo índice de Shannon foi em média 0,3797 ($\pm 0,1729$) em todas as populações. Na população de Paranacity foi detectada a maior diversidade genética: 35,77% ($\pm 0,2153$). Na população de Itororó do Paranapanema (São Paulo) foi verificada a menor

diversidade genética: 31,30% ($\pm 0,2108$). Os valores do índice de Shannon estão apresentados no Quadro 4.

Quadro 4 - Índice de Diversidade de Shannon (I) das cinco populações de *Diatraea saccharalis* analisadas

População	Índice de Shannon (I)	Desvio- padrão
Paranacity	0,3577	$\pm 0,2153$
Engenheiro Beltrão	0,3536	$\pm 0,2355$
Tapejara	0,3368	$\pm 0,2328$
Centenário do Sul	0,3222	$\pm 0,2402$
Itororó do Paranapanema	0,3130	$\pm 0,2108$
Total	0,3797	$\pm 0,1729$

O valor de G_{ST} obtido para as cinco populações foi de 0,0909, indicando que as populações não foram diferenciadas e podem ser consideradas como população única.

Com esses resultados observa-se que a broca, ou tem a capacidade de voar longas distâncias, o que discorda de Hayward (1943) que verificou que a *D. saccharalis* não seria uma boa voadora, uma vez que seu vôo tem uma extensão de aproximadamente 200 a 300 metros, podendo chegar a 700 metros com auxílio do vento. Ou, o mecanismo que seria mais provável é que as brocas são levadas para várias localidades nos deslocamentos humanos entre as usinas.

Quadro 5 - Valores da identidade genética e distância Genética de Nei (1978) obtidos pelo programa Popgene 1.31 para as cinco populações de *Diatraea saccharalis* analisadas

Pop/ID	Paranacity	Engenheiro Beltrão	Tapejara	Centenário do Sul	Itororó do Paranapanema
Paranacity	***	0,9835	0,9784	0,9763	0,9807
Eng. Beltrão	0,0166	***	0,9717	0,9729	0,9719
Tapejara	0,0219	0,0288	***	0,9753	0,9832
Cent. do Sul	0,0240	0,0274	0,0250	***	0,9862
It. Paranap.	0,0195	0,0285	0,0170	0,0139	***

*Os valores da Identidade genética de Nei estão representados acima da diagonal e a Distância genética de Nei estão abaixo da diagonal.

Os valores de identidade genética e a distância genética de Nei (1978) entre as cinco populações estão apresentadas no Quadro 5. As populações que obtiveram a maior similaridade foram Centenário do Sul e Itororó do Paranapanema, provavelmente devido à pequena distância geográfica entre as localidades.

No dendrograma baseado na distância genética de Nei (1978) pode-se observar que as populações de Paracity e Engenheiro Beltrão podem ser agrupadas, assim como as populações de Centenário do Sul e Itororó do Paranapanema puderam ser agrupadas com a população de Tapejara (Figura 2).

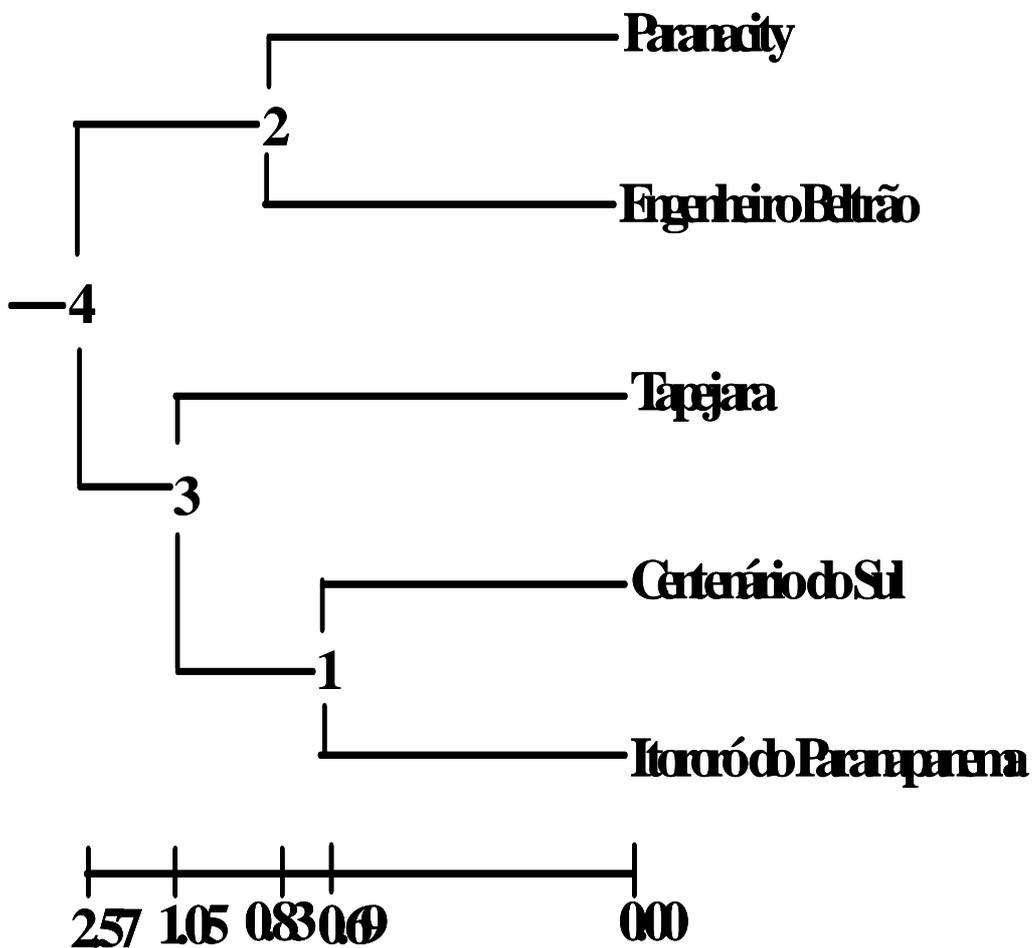


Figura 2 - Dendrograma baseado no complemento aritmético da distância genética de Nei (1978), obtido por marcadores RAPD. Os indivíduos das populações de *Diatraea saccharalis*, coletados em Paracity, Engenheiro Beltrão, Tapejara, Centenário do Sul e Itororó do Paranapanema, foram agrupados pelo método UPGMA, utilizando o programa Popgene 1.31.

Quando as análises de agrupamento foram realizadas pelo coeficiente Jaccard, o dendrograma obtido (Figura 3) mostrou que as populações de Paranacity, Centenário do Sul, Tapejara e Itororó do Paranapanema não se separaram, apresentando grande similaridade.

Os resultados obtidos mostraram que as populações de *D. saccharalis* analisadas possuem alto polimorfismo RAPD e não estariam diferenciadas ($G_{ST}=0,0909$) o que poderia levar à ocorrência de cruzamentos entre elas, como pode ser observado nas Figuras 2 e 3. Esses prováveis cruzamentos entre mariposas adultas das diferentes localidades podem levar à resistência a inseticidas de duas maneiras: populações que não eram resistentes a um inseticida passariam a ser pela troca de genes nos cruzamentos entre populações; ou poderia ocorrer resistência cruzada a inseticidas, ou seja, indivíduos de uma população resistente a um tipo de inseticida se reproduziriam com indivíduos de uma população resistente a outro tipo de inseticida e seus descendentes seriam resistentes aos dois tipos de agrotóxico.

Esse tipo de ocorrência foi descrito no estudo realizado por Saleem et al. (2008) com resistência a organoclorina, organofosforado, carbamato e piretróide em *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) do Paquistão. Os autores propuseram que a resistência a inseticidas detectada pode ter ocorrido devido a migração de insetos de áreas onde a resistência já havia sido descrita.

Programas integrados de controle da broca da cana precisam de uma supervisão maior. Seria necessário analisar o polimorfismo das *D. saccharalis* presentes nas culturas de cana para avaliar com mais cautela quais inseticidas seriam utilizados e quando liberar *Cotesia* para o controle biológico dessa praga. Seria importante que as usinas trabalhassem em conjunto para que inseticidas diferentes não fossem aplicados, evitando, assim, a resistência cruzada, devido ao grande polimorfismo e a facilidade de cruzamento entre brocas de diferentes localidades.

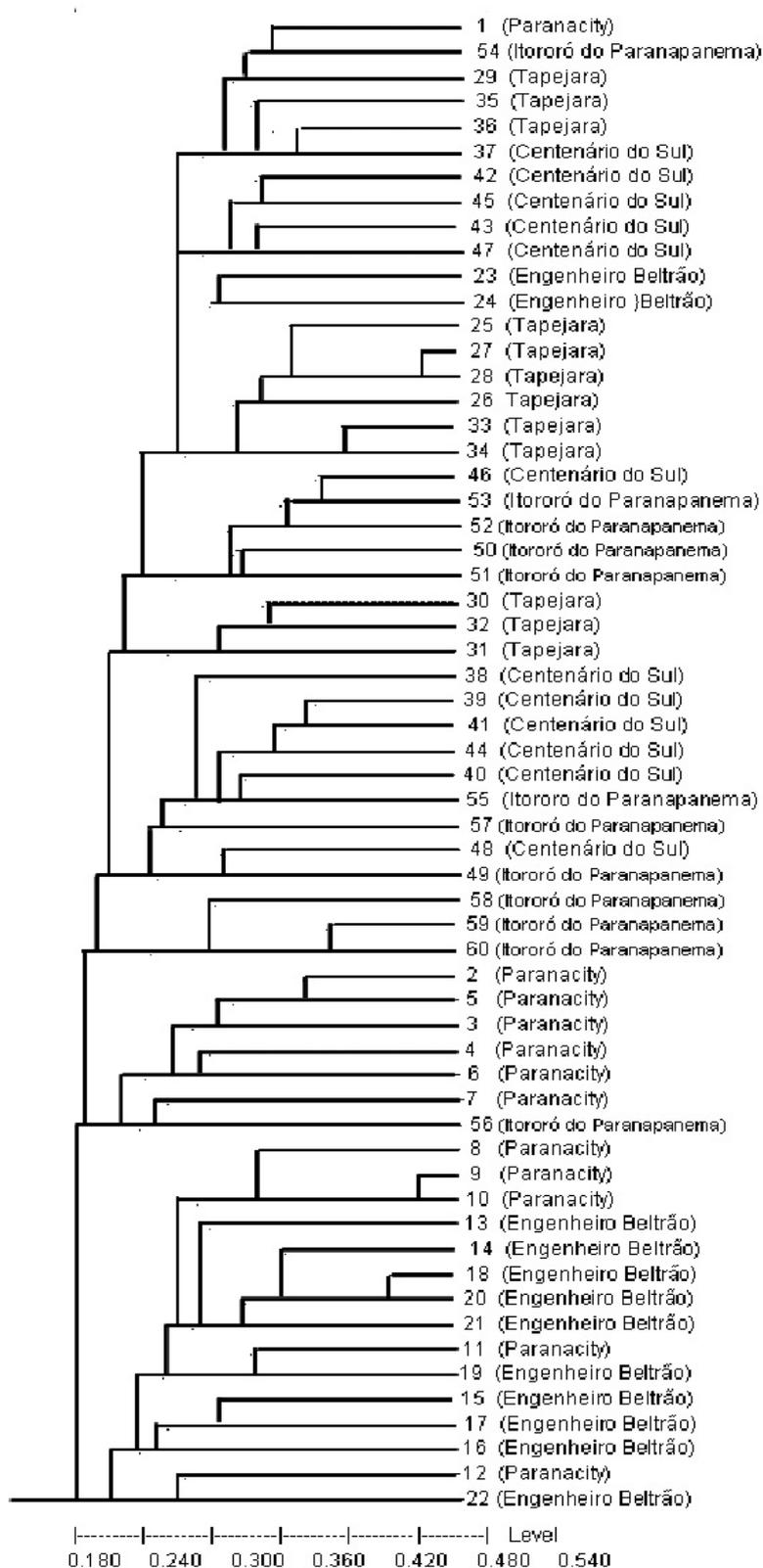


Figura 3 - Dendrograma baseado no complemento aritmético do coeficiente de Jaccard, obtido por marcadores RAPD. Os indivíduos 1-12 (Paranacity), 13-24 (Engenheiro Beltrão), 25-36 (Tapejara), 37-48 (Centenário do Sul), 49-60 (Itororó do Paranapanema). Os indivíduos analisados foram agrupados pelo método UPGMA, utilizando o programa NTSYS.

4. CONCLUSÕES

- a) As cinco populações de *D. saccharalis* analisadas apresentaram alto polimorfismo RAPD.
- b) As populações não estão diferenciadas e está ocorrendo fluxo gênico entre elas, o que poderá levar à resistência a inseticidas em localidades onde as brocas não são resistentes.
- c) Seria importante que os responsáveis pelos programas de controle integrado da broca realizassem periodicamente análise da variabilidade genética das *D. saccharalis* presentes nas diferentes localidades, para um melhor manejo e controle dessa praga.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUSATO, G.R.; GRÜTZMACHER, A.D.; OLIVEIRA, A.C.; VIERA, E.A.; ZIMMER, P.D.; KOPP, M.M.; BANDEIRA, J.M.; MALAGALHÃES, 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**, 33:709-716, 2004.

CONTE, H. **Morfologia do corpo gorduroso em larvas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) não parasitadas e parasitadas pelo *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae)**. Rio Claro: UNESP, 1994. 188p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas).

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12:13-15, 1990.

FERREIRA, E. **Manual de identificação de pragas do arroz**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa-CNPAP, 1998. 110p. (documentos, 90).

FERREIRA, E. Pragas e seu controle. In: VIEIRA, N.R.A.; SANTOS, A.B. SANT'ANA, E.P. (eds.). **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 1999. p. 197-261.

FERREIRA, E.; BRESEGHELLO, F.; CASTRO, E.M.; BARRIGOSI, J.A.F. **Broca-do-colmo nos agroecossistemas de arroz do Brasil**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa, 2001. 42p. (Documentos 114).

FOLEGATTI, M.E.G. **Interação entre o fungo *Beauveria bassiana* e os principais parasitóides da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis***. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 1985, 101p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas).

GALLO, D.; ALVES, S.B.; BAPTISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; CARVALHO, R.P.L.; LOPES, J.R.S.; MARCHINI, L.C.; NAKANO, O.; NETO, S.S.; OMOTO,

C.;PARRA, J.R.P.; VENDRAMIM, J.D.; ZUCCHI, R.A. **Entomologia Agrícola**, 86:450-462, 2002.

GUAGLIUMI, P. **Pragas da cana-de-açúcar**. Nordeste do Brasil. Rio de Janeiro: Instituto do Açúcar e Alcool, 1973. 622p.

HAYWARD, K.J. A broca da cana-de-açúcar. **Brasil açucareiro**, 22:69-74, 1943.

LARA, F.M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. São Paulo: Ícone, 1991. 336p.

MARTINELLI, S.; BARATA, R.M.; ZUCCHI, M.I.; SILVA-FILHO, M.C.; OMOTO, C. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Nocuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, 99:519-526, 2006.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89:583-590, 1978.

PLANALSUCAR. **Relatório Anual**. Rio de Janeiro: Instituto do Açúcar e do Alcool, 1977. 100p.

POZA, M.D.; FARINÓS, G.P.; BEROIZ, B.; ORTEGO, F.; HERNÁNDEZ-CRESPO.; CASTAÑERA, P. Genetic structure of *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) populations in the Mediterranean area. **Journal Environmental Entomology**, 37:1354-1360, 2008.

RUVOLO-TAKASUSUKI, M.M.C; MACHADO, M.F.P.S; CONTE, H. Esterase-3 polymorphism in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera, Pyralidae). **Genetics and Molecular Biology**, 25:61-64, 2002.

ROHLF, F.J. **NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. New York: Exeter Publishers, 1989.

SALEEM, M.A.; AHMAD, M.; AHMAD, M.Q.; ASLAM, M.; SAYYED, A.H. Resistance to Selected Organochlorin, Organophosphate, Carbamate and

Pyrethroid, in *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) from Pakistan. **Journal Economic Entomology**, 101:667-1675, 2008.

TIMM, A.E.; GEERTSEMA, H.; WARNICH, L. Populations genetic structure of *Gapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in south Africa. **Annual Entomology Society Am**, 101:197-203, 2008.

WILLIAM, J.R.; METCALFE, J.R.; MUNGOMERY, R.W.; MATHES, R. Pests of Sugar Cane. New York: **Elsevier Publishers Co.**, 1969. 568p.

WILLIAMS, J.G.K; KUBELIK, A.R; LIVAR, K.J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18:6531-6535, 1990.

YEH, F.C.; YANG, R.; BOYLE, T. **POPGENE Version 1.31**: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.

6. CONCLUSÕES GERAIS

- a) A inibição parcial da EST-7 e EST-8 e a inibição total da EST-3, após o contato com organofosforado malathion, a correlação estimada entre a mortalidade e a concentração empregada desse inseticida após contaminação por contato em todos os ínstares analisados indicam que esses parâmetros poderão ser utilizados como marcadores para novos estudos com resistência a inseticidas organofosforados em *D. saccharalis*.
- b) A nova região de proteína detectada, após a contaminação por contato com o inseticida piretróide galgotrin, poderá ser utilizada para o entendimento de resistência a esse inseticida após a caracterização e identificação desse polipeptídeo.
- c) A alta porcentagem de polimorfismos RAPD e a similaridade entre as populações de *D. saccharalis* avaliadas mostraram que está ocorrendo fluxo gênico dentro e entre as populações. Esse contato pode levar ao aumento de resistência a inseticidas utilizados nas culturas de cana de açúcar da região.
- d) Seria importante que novas estratégias de manejo e controle dessa praga sejam desenvolvidas, dentre elas, a avaliação periódica do polimorfismo genético da *D. saccharalis* presente na região, para dificultar a ocorrência de resistência a inseticidas.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)