**CELINA INÊS HEIDEMANN**

# CARIÓTIPO E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES SEXO-ESPECÍFICO EM *Diatraea saccharalis*

**MARINGÁ**

**PARANÁ-BRASIL**

**SETEMBRO-2009**

# Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

**CELINA INÊS HEIDEMANN**

# CARIÓTIPO E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES SEXO-ESPECÍFICO EM *Diatraea saccharalis*

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

**MARINGÁ**
**PARANÁ-BRASIL**
**SETEMBRO-2009**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

H465c

Heidemann, Celina Inês
Cariótipo e identificação de marcadores moleculares sexp-específico em *Diatrae saccharalis* / Celina Inês Heidemann . -- Maringá : [s.n.], 2009.
x, 48 f. : il. color.

Orientadora : Prof. Dr. Maria Aparecida Fernandes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, 2009.

1. Broca da cana (*Diatrae saccharalis*) - Características. 2. Broca da cana (*Diatrae saccharalis*) - Marcador molecular - Sexo específico. 3. Broca da cana (*Diatrae saccharalis*) - Caracterização citogenética - Controle. 4. Broca da cana (*Diatrae saccharalis*) - Polimorfismo - Análise. I. Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento. II. Título.

CDD 21.ed.633.61

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte.
(A autora)

Dedico este trabalho aos meus pais, Cláudia e Delmiro, de quem recebi todo apoio, carinho e compreensão.

## AGRADECIMENTO

A Deus, que me deu o dom da vida e me abençoou com pessoas maravilhosas ao meu lado.

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

À minha orientadora, professora doutora Maria Aparecida Fernandez pela orientação e confiança na minha capacidade para realizar este trabalho.

Aos Professores das disciplinas cursadas que me transmitiram conhecimento.

Ao Valmir que me ajudou na criação da *Diatraea saccharalis*.

Aos amigos do laboratório, Simone, Fabrícia, Lídia, Jeronimo, Roxelle, José Luis, Karen, Vânia, Fabiana, Kátia, Silvia, Quirino, Bruno, Leon, José Renato, Marli, pelo incentivo, colaboração e ótimos momentos de convivência.

Às minhas amigas, Alexandra, Ana Paula, Denise, Giovana, Isabela, pelo incentivo, companheirismo e amizade.

|À dona Cida e senhor Valter que me deram carona nas minhas idas e vindas de Paranavaí a Maringá.

Aos meus queridos avôs, Terezinha e João Back (in memorian), pelo amor, preocupação e tantas orações que fizeram por mim.

Em especial, aos meus pais, Cláudia e Delmiro que lutaram muito para me dar oportunidade de estudo e foram meu refúgio nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos Márcia e João Carlos que sempre me deram carinho, apoio e incentivo, sem eles minha vida não seria completa.

Ao Rômulo, pelo companheirismo, paciência, e ajuda.

A todas as pessoas que fazem parte da minha vida e, que participaram direta ou indiretamente, para que eu alcançasse meu objetivo.

## BIOGRAFIA

Celina Inês Heidemann nasceu em 31 de janeiro de 1985, na cidade de Paranavaí, Estado do Paraná.

Formou-se no ensino fundamental e médio no Colégio Estadual Bento Munhoz da Rocha Neto, em 1999 e 2002, respectivamente. Em dezembro de 2006, formou-se em Ciências Biológicas com Ênfase em Biotecnologia – habilitação em licenciatura e bacharelado, pela Universidade Paranaense – UNIPAR campus Paranavaí.

Em março de 2007, matriculou-se no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento, em nível de Mestrado, na Universidade Estadual de Maringá.

## ÍNDICE

RESUMO ..... vii
ABSTRACT ..... ix
1. INTRODUÇÃO ..... 1
2. REVISÃO DA LITERATURA ..... 5
2.1. Cultura da cana-de-açúcar ..... 5
2.1.1. Produção da cana-de-açúcar ..... 6
2.2. Biologia da Diatraea saccharalis ..... 7
2.2.1. Ciclo de vida ..... 8
2.2.2. Importância econômica ..... 9
2.3. Cariótipo em Lepidoptera ..... 10
2.4. Determinação do sexo em Lepidoptera ..... 12
2.4.1. Composição do cromossomo sexual ..... 14
2.5. Diversidade genética ..... 15
3. MATERIAL E MÉTODOS ..... 18
3.1. Material biológico ..... 18
3.2. Preparação de cromossomos mitóticos de larvas de 5° Instar de *D. saccharalis* em células de hemolinfa ..... 19
3.3. Extração de DNA genômico de mariposa e glândula sericígena de larvas de 5° Instar de *D. saccharalis* ..... 19
3.4. Amplificação dos DNAs genômico de *D. saccharalis* com o primer gyakuU-13 ..... 20
3.5. Análise da diversidade genética ..... 21
4. Resultados e Discussão ..... 22
4.1. Cariótipo de *Diatraea saccharalis* ..... 22
4.2. Marcador molecular sexo-específico de *D. saccharalis* ..... 24
4.3. Análise dos locos polimórficos ..... 29
5. CONCLUSÃO ..... 35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 36

## RESUMO

HEIDEMANN, Celina Inês. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, setembro de 2009. **Cariótipo e identificação de marcadores moleculares sexo-específico em *Diatraea saccharalis***. Orientadora: Dra. Maria Aparecida Fernandez. Professoras Conselheiras: Dra. Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki e Dra. Ana Sílvia Lapenta.

Uma das razões para o interesse na genética e citogenética de lepidópteros é a grande quantidade de espécies pragas pertencentes a este grupo que causam perdas consideráveis na agricultura. Conseqüentemente, há necessidade de obter novas estratégias para o controle destas pragas. A *Diatraea saccharalis* é um inseto que ocasiona consideráveis prejuízos nas plantações de cana-de-açúcar. Nessa área de atuação, a nossa proposta foi de contribuir com o conhecimento da biologia de *D. saccharalis*, especificamente com os seguintes objetivos: (1) caracterizar citogenéticamente os cromossomos mitóticos de *D. saccharalis*; (2) descrever fragmentos envolvidos na diferenciação de macho e fêmea desta espécie, com o marcador molecular RAPD GyakuU-13 que é específico para o cromossomo W de *Bombyx mori*; (3) avaliar a população de *D. saccharalis* mantida no Departamento de Biologia Celular (DBC) da Universidade Estadual de Maringá, em relação à heterose e à distância genética. Para o desenvolvimento desses experimentos, foram analisadas preparações de placas metafásicas dos cromossomos mitóticos de células de hemolinfa de *D. saccharalis*; deferido o perfil de fragmentos obtidos com o marcador sexual GyakuU-13 de *Bombyx mori*; e estimada a variabilidade genética desta população proveniente da Usina de Santa Terezinha, Distrito de Iguatemi, Município de Maringá, que já era mantida por endocruzamentos no laboratório da Usina e foram trazidas para o DBC em 2004. Os resultados mostraram que a *D. saccharalis* apresenta 16 pares de cromossomos holocêntricos e similares em tamanho e forma em mais de 100 metáfases analisadas, não sendo possível a diferenciação sexual pela cariotipagem. Com o uso do marcador molecular foram identificados dois fragmentos, um de aproximadamente 610 e outro de 1400 pares de base, sugeridos como marcadores de *D. saccharalis* machos e fêmeas, respectivamente. O número elevado de fragmentos amplificados possibilitou a estimativa da heterozigosidade total (Ht) da população estudada que foi de

0,3560. Esse resultado demonstra que a população estudada apresenta considerável reserva de variabilidade genética. Em resumo os resultados obtidos contribuem para o conhecimento da biologia de *D. saccharalis*, de interesse para o desenvolvimento de novas metodologias e estratégias no controle dessa praga.

Palavras-chave: *Diatraea saccharalis*, cariótipo, marcador molecular sexo-específico.

## ABSTRACT

HEIDEMANN, Celina Inês. M. Sc. Universidade Estadual de Maringá, September, 2009. **Karyotype and identification of sex-specific molecular markers in *Diatraea saccharalis***. Adviser: Dra. Maria Aparecida Fernandez. Co-Advisers: Dra. Maria Claudia Colla Ruvolo Takasusuki e Dra. Ana Sílvia Lapenta.

One of the reasons for the interest in genetics and cytogenetics of lepidoptera is the enormous number of species of pests on this group that cause considerable damage in agriculture. Therefore, there is need for new strategies to control this pest. The *Diatraea saccharalis* is an insect that cause considerable loss in the sugar cane culture. In this area of work, our proposal was to contribute to the knowledge of the biology of *D. saccharalis*, especificaly with this following objectives: (1) characterize the mitotic chromosomes of *D. saccharalis*; (2) describe fragments involved in the differentiation between male and female of this species, with the molecular marker RAPD GyakuU-13, which is specific for the W chromosome of *Bombyx mori*; (3) evaluate the population of *D. saccharalis* raise in the Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Estadual de Maringá (DBC), in face of heterosis and the genetic distance. For the development of these experiments were analyzed metaphasic plates of mitotic chromosomes from *D. saccharalis* hemolymph cells*;* deferred the profile of fragments obtained whit the sexual marker GyakuU-13 of *Bombyx mori*; and estimated the genetic variability of this population provided by Usina de Santa Terezinha, district of Iguatemi, city of Maringá, that already was maintained by inbreeding in the laboratory of the Usina Santa Terezinha and were brought for the DBC in the year 2004. The results showed that *D. saccharalis* has 16 pairs of holocentric chromosomes and similar in size and shape in more than 100 analyzed metaphases, but was not possible the sexual differentiation by karyotyping. The molecular marks analysis showed that two fragments, one of them with approximately 610 on the other one with 1400 pairs of base, could be correlated as markers of *D. saccharalis* male and female, respectively*.* The elevated number of amplified fragments allowed the estimation of total Heterozigosity (Ht) of the population, which was 0.3560. This result shows that the population has considerable reserve of genetic variability. In summary the results contribute to

knowledge of the biology of *D. saccharalis*, of interest for the development of new methodologies and strategies for the control of this pest.
Key-words: *D. saccharalis*, karyotype, maker sex-specific.

# 1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é originária do Sudeste da Ásia, pertence ao gênero *Saccharum ssp*, família Poaceae (Gramineae), sendo uma das espécies vegetais mais importantes para a agricultura mundial. O cultivo da cana-de-açúcar tem se destacado, entre outras culturas, pela sua produtividade e adaptação às condições climáticas e de solo de várias regiões do Brasil.

A importância dessa cultura pode ser atribuída à sua múltipla utilização, podendo ser empregada sob a forma de forragem, para alimentação animal, ou como matéria prima para a fabricação de açúcar, álcool, rapadura, melado e aguardente. Atualmente, a principal destinação da cana-de-açúcar cultivada no Brasil é a fabricação de açúcar e álcool. O setor sucroalcooleiro é parte importante do agronegócio brasileiro, além de ser referência nesse aspecto para os demais países (Strapasson et al., 2007).

Segundo a Conab (Companhia Nacional de Abastecimento), o Brasil apresenta uma área cultivada de cana-de-açúcar que cobre aproximadamente 7,8 milhões de hectares, sendo o maior produtor mundial seguido pela Índia e Austrália. Quase todos os estados brasileiros produzem cana, mas o maior estado produtor é São Paulo, com cerca de 367,693 milhões de toneladas, o que significa aproximadamente 60% da produção nacional. O Paraná é o segundo maior produtor com 54.193 milhões de toneladas, seguido por Minas Gerais com 51.840,3 milhões de toneladas.

Embora os índices de produtividade sejam altos, a produção brasileira de cana-de-açúcar ainda não atingiu o esperado. Isto se deve a vários fatores, como a deficiência nas operações agrícolas, suscetibilidade a infecções por microrganismos patogênicos, baixo potencial genético das variedades de plantas existentes e perdas causadas pelo ataque de inúmeros insetos (Castilho, 1982).

No Brasil, a broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794), é uma praga que causa prejuízos consideráveis à agroindústria sucro-alcooleira. A broca é originária das Antilhas, América Central e do Sul e sua

ocorrência verifica-se em todas as regiões onde se processa o cultivo da cana. Biologicamente, esta praga vem sendo controlada a partir da criação maciça da vespa *Cotesia flavipes* (Hymenoptera; Braconidae) em laboratórios especializados, uma vez que não existe até o momento um inseticida eficiente para o seu controle (Alleyne et al., 2001).

A *D. saccharalis* é um inseto de metamorfose completa e a duração do seu ciclo biológico é bastante variável, dependendo de inúmeros fatores, principalmente do clima e da planta hospedeira. O adulto desta espécie é uma mariposa de hábitos noturnos, que realiza a postura na parte dorsal das folhas. Nascidas, as larvas descem pela folha e penetram no colmo, perfurando-o na região nodal. Dentro do colmo cavam galerias, onde permanecem até o estágio adulto (Cruz, 2007).

Os danos causados pela *D. saccharalis à* cana-de-açúcar por efeitos indiretos são os mais importantes. As galerias abertas pela broca-da-cana deixam a planta vulnerável à entrada de fungos, que realizam inversão de sacarose; esta doença é conhecida como a “podridão vermelha” (Botelho, 1992).

O ataque de modo direto, causado pela formação das galerias, em plantas jovens, acarretam a morte das gemas apicais provocando o secamento dos ponteiros, sintoma conhecido como “coração morto”. Outros danos causados, decorrentes do desenvolvimento do inseto no vegetal é o brotamento lateral, perda de peso, enfraquecimento dos colmos com conseqüência aumento no número de canas quebradas, enraizamento aéreo e entrenós atrofiados (Graça, 1976; Gallo et al. 1978; Pádua, 1983). Portanto, o ataque desta praga a cultura da cana-de-açúcar altera a qualidade da cana, acarretando perdas no rendimento industrial desta matéria prima (Nardin, 2002).

A maior parte dos estudos sobre a *D. saccharalis* abordam aspectos de criação, dinâmica populacional, relações parasitóides-hospedeiros e alguns aspectos básicos da morfologia, fisiologia, biologia molecular. Porém, ainda não há nenhum estudo relacionado a citogenética deste inseto. A falta destes conhecimentos vem dificultando a implementação de técnicas para seu controle biológico, uma vez que há necessidade de conhecimentos básicos da biologia dos insetos para realizar avaliações das interações entre o parasita e seu hospedeiro

(Conte, 1994; Dossi e Conte, 2002; Ruvolo-Takasusuki et al., 2002; Beserra e Parra, 2004; Victoriano e Gregorio, 2004)

A caracterização de cromossomos mitóticos de insetos oferece possibilidades de investigação de processos mitóticos tais como a análise citogenética da organização da heterocromatina, análises moleculares, bem como estudos evolutivos. A análise do cariótipo é a primeira etapa neste processo de caracterização (Borges et al., 2000).

Nos Lepidópteros, a identificação de cromossomos individuais baseados no tamanho e nos padrões de bandeamento é difícil por causa do grande número de cromossomos, do tamanho pequeno e da aparente similaridade entre eles (Mandrioli et al., 2003). Com isso, também se torna difícil a identificação dos cromossomos sexuais destas espécies.

Nessa ordem, fêmeas são heterogaméticas para o cromossomo sexual. O sistema de cromossomos sexuais com fêmeas heterogaméticas é representado como WZ/ZZ e Z/ZZ, alternativamente designados WZ e Z0, dependendo da presença ou ausência do cromossomo W. Abe et al. (1998, 2005) identificaram marcadores moleculares para o cromossomo sexual de *Bombyx mori*, possibilitando assim o reconhecimento do sexo genético de um embrião ou larva, muito antes de qualquer marcador morfológico tornar-se visível.

O uso de marcadores moleculares também permite entender a movimentação de biótipos ou genótipos dos insetos, sua estratégia de convivência, sucesso reprodutivo e o padrão de dispersão geográfica das espécies de insetos-praga (Chandrasekhar et al., 2005).

Os parâmetros genéticos populacionais estimados com base em marcadores moleculares podem ser utilizados para fins de conservação, domesticação, utilização econômica, melhoramento genético e para melhor compreensão da dinâmica dos alelos na população. Estas informações, aliadas aos conhecimentos da história de vida e de características ecológicas da espécie, permitem conhecer parte da sua biologia.

Considerando as exposições acima, este trabalho teve os seguintes objetivos: (1) caracterizar citogenéticamente os cromossomos mitóticos de *D. saccharalis*; (2) descrever fragmentos envolvidos na diferenciação de macho e fêmea desta espécie, com o marcador molecular RAPD GyakuU-13 que é

específico para o cromossomo W de *Bombyx mori*; (3) avaliar a população de *D. saccharalis* mantida no Departamento de Biologia Celular (DBC) da Universidade Estadual de Maringá, em relação à heterose e à distância genética.

A população de *D. saccharalis* utilizada em nossos estudos era proveniente da Usina de Santa Terezinha, Distrito de Iguatemi, Município de Maringá, sendo mantidas por endocruzamentos no laboratório da Usina e foram trazidas para o DBC em 2004, continuando sua manutenção por endocruzamentos.

# 2. REVISÃO DA LITERATURA

## 2.1. Cultura da cana-de-açúcar

Originária do sudeste da Ásia, trazida ao Brasil em 1532 por Martim Afonso de Sousa, a cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum ssp*, família Poaceae (Gramineae), sendo uma das espécies vegetais mais importantes para a agricultura mundial. É cultivada em uma extensa área territorial, apresentando melhor rendimento em climas tropicais (Strapasson et al., 2007).

O cultivo da cana-de-açúcar tem se destacado, entre outras culturas, pela sua produtividade e adaptação às condições climáticas e solo de várias regiões do país. O clima ideal para a produção da cana-de-açúcar é aquele que apresenta duas estações distintas: uma quente e úmida para proporcionar a germinação, perfilhamento e desenvolvimento vegetativo; seguida de outra fria e seca, para promover a maturação e conseqüente acúmulo de sacarose. A época de plantio ideal para a região Centro-Sul é de janeiro a março, enquanto na Região Norte-Nordeste é de maio a julho. Segundo Wrege et al. (2005), no Paraná, as áreas de menor altitude do norte apresentam menor ocorrência de geadas, o que torna a região apta para plantio da cana-de-açúcar.

A importância da cana de açúcar pode ser atribuída à sua múltipla utilização, podendo ser empregada sob a forma de forragem, para alimentação animal, ou como matéria prima para a fabricação de açúcar, álcool, rapadura, melado e aguardente. Atualmente, a principal destinação da cana-de-açúcar cultivada no Brasil é a fabricação de açúcar e álcool. O setor sucroalcooleiro é parte importante do agronegócio brasileiro, além de ser referência nesse aspecto para os demais países. A cana-de-açúcar é a matéria-prima que permite os menores custos de produção de açúcar e álcool, devido à energia consumida no processo ser produzida a partir dos seus próprios resíduos (Strapasson et al., 2007).

O setor sucroalcooleiro está em plena ascensão em função da forte demanda interna e externa, o que justifica as pesquisas tecnológicas no processo de produção de cana-de-açúcar, tais como: obtenção de novas variedades adaptadas ao clima, tipo de solo, sistema de corte (manual e mecânico) e pesquisas relacionadas ao combate das pragas que atingem essa cultura.

### 2.1.1. Produção da cana-de-açúcar

Inicialmente, o principal pólo de produção da cana-de-açúcar era a Zona da Mata nordestina, com posterior expansão para a região Sudeste, notadamente no Estado de São Paulo. Hoje, quase todos os estados brasileiros produzem cana, mas o maior estado produtor é São Paulo, com cerca de 367,693 milhões de toneladas o que significa aproximadamente 60% da produção nacional. O Paraná é o segundo maior produtor do Brasil com produção de 54,193 milhões de toneladas.

O IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) estimou a safra 2009 em aproximadamente 691,790 milhões de toneladas, superior 6,6% a safra do ano passado que foi de aproximadamente 648,973 milhões de toneladas. Este volume representa uma quantidade de 42,817 milhões de toneladas adicionais do produto.

Um estudo realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) diz que a safra de 2009, para a região Centro-Sul, que inclui os Estados da região Sudeste, Sul e Centro-Oeste, pode chegar a aproximadamente 568,992 milhões de toneladas. Esse dado mostra a participação de 82,0% do total nacional, indicando 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.

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 (28,7%), Paraná (20,2%) e Minas Gerais com 14,9%. Esse resultado deve-se a entrada nesta safra, de 25 novas usinas no sistema produtivo.

Para os principais produtos derivados da cana-de-açúcar para esta safra observa-se a tendência de expansão mais acentuada para o açúcar. Neste sentido, a produção estimada de açúcar para o País, como um todo, deverá atingir de 36,42 a 37,91 milhões de toneladas, com um crescimento percentual de 15,18% a 19,88%. Para o álcool, o estudo indica um crescimento entre 4,1% e 7,2% devendo atingir uma produção entre 27,78 e 28,60 milhões de litros.

Embora os índices de produtividade sejam altos, a produção brasileira de cana-de-açúcar ainda não atingiu o esperado. Isto se deve a vários fatores como: deficiência nas operações agrícolas, suscetibilidade a infecções por microrganismos patogênicos, baixo potencial genético das variedades de plantas existentes e perdas causadas pelo ataque de inúmeros insetos (Castilho, 1982).

## 2.2. Biologia da Diatraea saccharalis

A *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera:Cambridae) é originária das Antilhas, América Central e do Sul, mas se espalhou para as regiões onde é cultivada a cana-de-açúcar e estabeleceu-se como uma praga, causando prejuízos consideráveis às indústrias sucro-alcooleiras (Alleyne et al., 2001).

Os principais danos causados pelas larvas dessa espécie ("brocas-da-cana") são decorrentes da alimentação dentro do colmo da planta. Em função desse hábito, as medidas convencionais de controle, por meio de inseticidas químicos direcionados para a larva, são praticamente ineficientes. Na realidade, qualquer tentativa de controle deve ser sempre baseada no conhecimento estreito sobre a biologia e o comportamento da praga (Randolph et al., 1967; Dinther, 1971).

Essa espécie é polífaga. Originalmente era uma espécie presente em pastos aquáticos e semi-aquáticos (Elias, 1970). Jepson (1964) afirma que a "broca-da-cana" pode infestar 65 espécies vegetais, sendo 30 espécies de pastagens de importância econômica, além de cana-de-açúcar, milho, milheto, sorgo sacarino, trigo, sorgo granífero e arroz.

### 2.2.1. Ciclo de vida

Cruz (2007) detalhou o ciclo de vida da *D.* saccharalis. A duração do ciclo esta em torno de 40 a 60 dias, sendo que podem ocorrer até quatro gerações anuais (em casos excepcionais até cinco), dependendo das condições do clima. A "broca-da-cana" tem metamorfose completa, ou seja, passa pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1).

Os ovos são depositados em agrupamentos, na parte dorsal da folha, contendo de dois a 50 ovos, estes são inicialmente brancos, tornando-se marrom com a idade. A duração da fase de ovo é de quatro a seis dias.

As larvas originadas de uma mesma massa de ovos eclodem quase que sincronicamente, ou pelo menos dentro de algumas horas. As larvas começam a alimentar-se logo após a eclosão. Depois da primeira ou segunda muda descem pela folha e penetram no colmo, perfurando-o na região nodal. Dentro do colmo abrem galerias, onde permanecem até o estágio adulto. As larvas apresentam de 5 a 6 ínstares característicos da ordem Lepidóptera. Quando criadas em dietas artificiais, a maioria das larvas tende a exibir seis instares (Hensley, 1971). Holloway et al. (1928) relatam durações dos ínstares de 3 a 9 dias para larvas alimentando-se em cana-de-açúcar, com tempo de desenvolvimento larval de 25 a 35 dias, estas podem chegar a um comprimento de 20 a 30 mm. Os órgãos reprodutores não são bem desenvolvidos nesta fase.

A fase de pupa acontece no interior da planta, nas galerias criadas pela larva. A larva limpa e amplia as galerias antes da metamorfose, deixando somente uma fina camada de tecido da planta que é removido pela mariposa quando saída. A pupa é alongada, fina, de coloração marrom-amarelada a marrom mais escuro, medindo entre 16 e 20 mm de comprimento e possuindo tubérculos pontudos e proeminentes nos segmentos distais. A duração da fase de pupa normalmente é de seis a quatorze dias, mas, sob condições mais amenas de temperatura, pode estender-se até 22 dias. Os órgãos reprodutores começam a diferenciar nesta fase do desenvolvimento.

O adulto é uma mariposa marrom-amarelada, com envergadura entre 18 e 28 mm, em machos, e 27 a 39 mm, em fêmeas. Os órgãos reprodutores já estão totalmente desenvolvidos nesta fase. Os adultos possuem hábitos noturnos,

e realizam a postura na parte dorsal das folhas. As fêmeas podem depositar ovos por até quatro dias. A duração da fase de adulto é de três a oito dias.

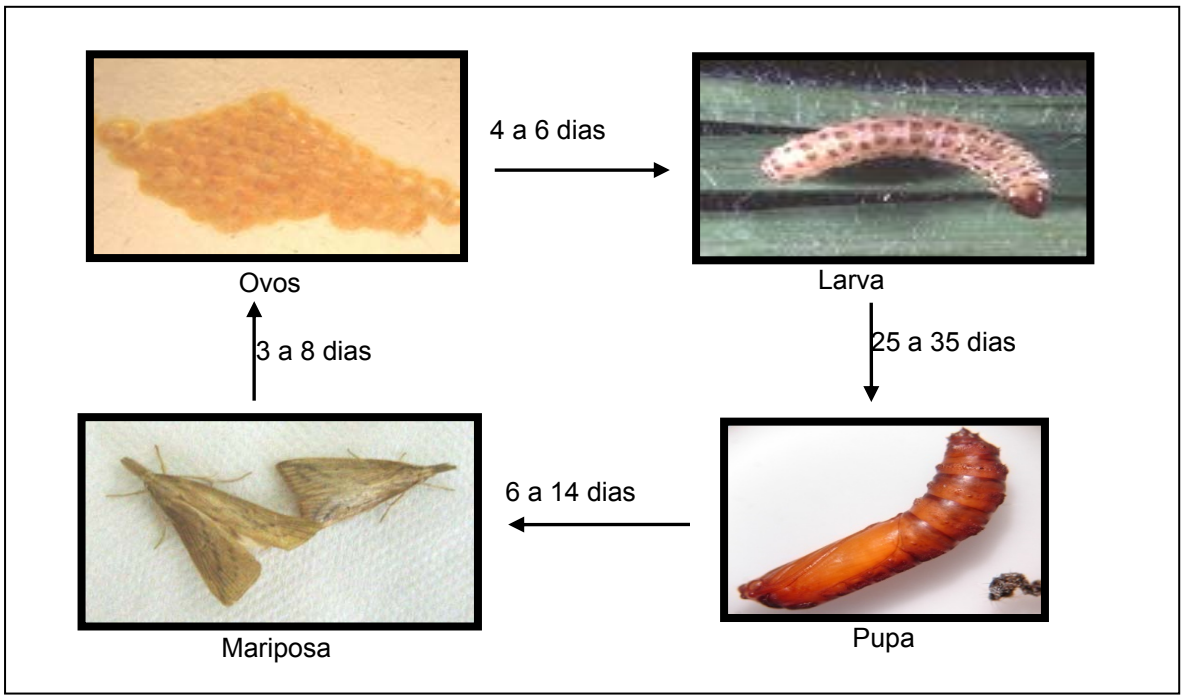


Figura 1 – Ciclo de vida da *D. saccharalis*. Metamorfose completa: ovo, larva, pupa e mariposa.

### 2.2.2. Importância econômica

Os danos por efeitos indiretos, causados pela *D. saccharalis* na cana-de-açúcar, são os mais importantes, uma vez que através dos orifícios e galerias abertos pelas larvas penetram fungos (*Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moliniforme*) que realizam inversão de sacarose, diminuindo a pureza do caldo de 10 a 20% e, conseqüentemente, o rendimento de açúcar e álcool; esta doença é conhecida como “podridão vermelha” por causa do vermelhão no interior dos entrenós (Botelho, 1992).

O ataque de modo direto, causado pela formação das galerias, em plantas jovens, acarretam a morte das gemas apicais provocando o secamento dos ponteiros, sintoma conhecido como “coração morto”. Outros danos causados, decorrentes do desenvolvimento do inseto no vegetal é o brotamento lateral, perda de peso, enfraquecimento dos colmos com conseqüente aumento no número de canas quebradas, enraizamento aéreo e entrenós atrofiados (Graça,

1976; Gallo et al. 1978; Pádua, 1983). Portanto, os danos causados pela *D. saccharalis* alteram a qualidade da cana-de-açúcar, acarretando perdas no rendimento industrial desta matéria prima (Nardin, 2002).

Os prejuízos causados pela broca-da-cana diminuíram pela utilização de programas de controle biológico com a criação maciça em laboratórios especializados da vespa *Cotesia flavipes* (Hymenoptera; Braconidae), parasita natural da *D. saccharalis* (Mendonça, 1996; Botelho e Macedo, 2002). No entanto, os prejuízos estimados em cerca de 20 milhões de dólares continuam sendo significativos para a indústria sucro-alcooleira (Jornal da Ciência, 2004).

A maior parte dos estudos existentes com a *D. saccharalis* é relacionada à sua morfologia (Victoriano e Gregorio, 2004), existindo também relatos sobre a análise de genes de importância para o controle biológico, como os envolvidos nos processos digestivos da lagarta (Azevedo et al., 2003) e sobre variabilidade isoenzimática (Ruvolo-Takasusuki et al., 2002). Trabalhos recentes relacionados com a resistência de plantas transgênicas à broca-da-cana iniciam outro importante campo de pesquisa (Rang et al., 2004). Embora muitos estudos relatem aspectos bioquímicos e morfológicos das interações parasita-hospedeiro e descrevam características do controle biológico, não se tem ainda conhecimento a respeito da citogenética de *D. saccharalis*, o que poderia nos fornecer subsídios para melhoria das técnicas de seu controle**.**

### 2.3. Cariótipo em Lepidoptera

A descrição do conjunto cromossômico de uma espécie é conhecida como cariótipo. Uma caracterização clara e precisa do cariótipo é de fundamental importância quando se quer comparar citogeneticamente espécies diferentes, ou examinar a variação entre indivíduos da mesma espécie. Os cariótipos não são estruturas rigidamente estáveis, e em praticamente todas as espécies se encontram variações cromossômicas que desempenham um papel importante na evolução das espécies. Essa variação pode ser numérica, quando há um aumento ou diminuição do número de cromossomos, ou estrutural, quando os cromossomos apresentam variações no seu tamanho, posição do centrômero, quantidade de DNA, quantidade de heterocromatina ou número e posição relativa

de suas bandas C e G. Os bandamentos são importantes para a identificação de cromossomas homólogos e na caracterização de polimorfismos ou de relações de parentesco entre espécies próximas, distinguindo possíveis rearranjos cromossômicos. (Guerra, 1988).

A caracterização de cromossomos de insetos oferece muitas possibilidades em investigações de processos mitóticos como a análise citogenética da heterocromatina (Gatti e Pimpinelli, 1992; Eugênio e Cella, 1996), estudos da cariocinese (Glover, 1990; Gatti e Goldberg,1991), análise molecular (Reed e Phillips, 1995) bem como estudos evolutivos (Baimai, 1998) e de delimitação zoográfica (Shyamala e Ranganath, 1989).

A origem de novas espécies, ou seja, especiação, envolve o estabelecimento do isolamento reprodutivo. O cariótipo das espécies pode estar relacionado à formação da separação pós-zigótica (White, 1973). Cruzamentos entre espécies com cariótipos diferentes produzem híbridos que são heterozigotos para os rearranjos cromossômicos. Estes híbridos possuem a fertilidade reduzida devido à segregação não regular dos cromossomos homólogos durante a primeira divisão meiótica (Lorkovıc, 1974; John et al., 1983; Forejt 1996). Embora os diferentes tipos de rearranjos cromossomáticos tenham vários efeitos na fertilidade do híbrido heterozigoto (King, 1993), a fertilidade híbrida geralmente esta correlacionada negativamente com a divergência cariotípica dos parentais (White 1973; Gropp et al., 1982).

As espécies em alguns gêneros animais exibem extrema diversidade cariotípica interespecífica. Nos mamíferos, por exemplo, o gênero *Muntiacus* (Mammalia:Cervidae) inclui espécies com diferentes cariótipos que variam de uma escala de n = 3 a n = 23 (Yang et al., 1997), e o gênero *Sigmodon* (Mammalia:Cricetidae) tem uma diversidade cariotípica interspecifica de n = 11 a n = 26 (Zimmerman, 1970). As maiores escalas em números de cromossomos, a nível de gênero, são encontradas nos insetos, como por exemplo no gênero *Apiomorpha* (Hemípteros:Eriococcidae) que tem diversidade cariotípica interespecífica de n = 2 a n = 96 (Cook, 2000).

Os números de cromossomos dos Lepidoptera estão geralmente entre 28 e 32 pares (Suomalainen, 1969; Robinson, 1971), mas podem variar extensamente. O exemplo mais impressionante em nível de gênero é encontrado

em *Agrodiaetus*, com número haplóide de cromossomos que varia entre 10 e 134 (Kandul et al., 2007). Algumas subespécies como *Samia cynthia* mostram, além de diferentes números de cromossomos, um polimorfismo elevado dos cromossomos sexuais (Yoshido et al., 2005), que pode ter um papel importante na população e na divergência das espécies (Charlesworth et al., 1987; Prowell, 1998).

Toda essa variação pode ser conseqüência de um arranjo cromossômico holocêntrico, ou seja, quando os cromossomos não apresentam um centrômero distinto, e sim difuso, portanto, eles não podem ser caracterizados pela posição do centrômero. Os centrômeros são difusos supostamente para facilitar a fusão e a divisão dos cromossomos (Suomalainen, 1969).

Os cromossomos são geralmente pequenos e numerosos e as cromátides irmãs separam-se pela disjunção paralela na metáfase mitótica (Murakami e Imai, 1974). Algumas descobertas sugerem que os cromossomos de lepidóptera não são verdadeiramente holocêntricos, mas exibem um cinetócoro que, em contraste com um típico cromossomo monocêntrico, envolve uma grande porção, cerca de 30 a 70%, da superfície cromossomal. Estas descobertas favorecem um tipo intermediário de cromossomo entre os holocêntricos e monocêntricos tradicionais (Wolf, 1996).

Nos Lepidópteros, a identificação de cromossomos individuais baseados no tamanho e nos padrões de bandeamento é difícil por causa do seu grande número, do pequeno tamanho e da aparente similaridade entre eles.

### 2.4. Determinação do sexo em Lepidoptera

Na maioria dos animais, ocorre a predominância de machos heterogaméticos, baseado no mecanismo do cromossomo sexual XX/XY (ou em variações XX/XY XX/XY1Y2). No entanto, nos Lepidópteros, fêmeas são heterogaméticas para o cromossomo sexual. O sistema de cromossomos sexuais com fêmeas heterogaméticas é representado como WZ/ZZ e Z/ZZ, alternativamente designado WZ e Z0, dependendo da presença ou ausência do cromossomo W (Lukhtanov, 2000).

Em sistemas de fêmeas heterogaméticas, a constituição dos cromossomos sexuais nos ovos é que decide o desenvolvimento sexual do embrião. Os embriões ZZ tornam-se machos, embriões WZ (ou embriões Z0 em sistemas Z/ZZ) tornam-se fêmeas.

Embora o sistema de fêmeas heterogaméticas seja conservado em todas as espécies de lepidópteros investigadas até agora, o papel do cromossomo sexual na determinação do sexo ainda não é bem claro. Sistemas WZ não são diferentes dos sistemas XY. Teoricamente, o primeiro sinal de determinação do sexo em um sistema WZ/ZZ pode ser gerado (1) pela ativação de genes no cromossomo W envolvidos na determinação do sexo feminino enquanto o desenvolvimento do sexo masculino é reprimido; assim a presença do W proporciona o desenvolvimento de fêmeas e a ausência do W promove o desenvolvimento de machos; ou (2) pela ativação de genes no cromossomo Z que age inibe genes envolvidos na determinação do sexo feminino localizados nos autossomos; ou (3) a ativação de genes de efeito materno, que podem estar presentes em qualquer cromossomo incluindo o W. Estes dois últimos sistemas de determinação sexual são mecanismos de soma de Z: um único cromossomo Z promove o desenvolvimento de fêmeas, dois Z promovem o desenvolvimento do macho. Embora não se conheça precisamente os genes envolvidos na geração do primeiro sinal de determinação do sexo, ambos sistemas o “W dominante” e o “Z recessivo” ocorrem nos lepidópteros (Traut et al., 2008)

No que diz respeito à recombinação gênica, os lepidópteros mostram que nos machos ocorre recombinação entre seus cromossomos Z, e as fêmeas não fazem cruzamentos nos cromossomos sexuais (Sturtevant, 1915). A meiose masculina segue o esquema citogenético convencional com típicas figuras de quiasma nos cromossomos sexuais (Maeda, 1939; Traut, 1977; Banno et al., 1996; Traut e Clarke, 1996). A meiose feminina, entretanto, não apresenta quiasmas, isto é, não ocorrem cruzamentos entre os cromossomos sexuais (Maeda, 1939; Suomalainen, 1965; Traut, 1977; Nokkala, 1987).

### 2.4.1. Composição do cromossomo sexual

O genoma do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) foi seqüenciado, independentemente, por pesquisadores chineses e japoneses (Mita et al., 2004; Xia et al., 2004). Em ambos os grupos, os genomas masculinos também foram seqüenciados para evitar interferência do cromossomo W. As seqüencias do cromossomo Z não mostram nenhuma diferença na em relação aos autossomos. Mapas genéticos convencionais têm sido estabelecidos não somente para o bicho da seda, mas também para a broca do milho *Ostrinia nubilalis* (Dopman et al., 2004), *Helicoius* melpomene (Jiggins et al., 2005) e para *Heliconius erato* (Tobler et al., 2005). O cromossomo Z possui muitos genes funcionais, o que leva à evidência da conservação de pelo menos uma parte dele lepidópteros. (Yasukochi et al., 2006; Scriber et al., 1996; Dopman et al., 2005; Gotter et al., 1999).

Os genes do cromossomo Z parecem contribuir em uma maior proporção para o processo de especiação (Sperling, 1994; Naisbit et al., 2002; Dopman et al., 2005). Particularmente, as respostas comportamentais masculinas ao feromônio têm um papel claro nas barreiras reprodutivas e são muitas vezes ligadas ao Z, supondo a distribuição aleatória, dado o número geralmente elevado de grupos de linhagens nos Lepidoptera.

Poucos genes foram encontrados ligados ao cromossomo W. O fator determinante de fêmea, *Fem*, no *B. mori*, é o mais proeminente (Tazima, 1964). O gene *Esd* de gigantismo no ovo é associado com o cromossomo de W, mas sua localização não foi confirmada ainda (Kawamura, 1988, 1990). Resultados obtidos com mutantes do cromossomo sexual de *Ephestia kuehniella* sugerem a presença de um fator “male-killing” no cromossomo W (Marec et al., 2001). Em *Papilo glaucus*, a mancha escura observada nas borboletas é transmitida pela fêmea e, conseqüentemente, considerada ligada ao W, mas a ligação é interrompida em alguns cruzamentos, supostamente devido a um supressor ligado ao Z (Scriber et al., 1996).

Para analisar o cromossomo W de *B. mori* a nível molecular, foram obtidos marcadores moleculares. Abe et al. (1998, 2005) identificaram 13 marcadores RAPD W-específico. As seqüências de nucleotideos da maioria

desses fragmentos RAPD W-específicos apresentaram identidade significativa a retrotransposons previamente relatados no *B. mori* e em outros organismos.

A análise da presença ou ausência do cromossomo sexual apresenta-se como uma maneira eficiente de reconhecer o sexo genético de um embrião ou larva muito antes de qualquer marcador morfológico tornar-se visível. No caso do bicho da seda, que possui grande importância comercial, este conhecimento possibilita a seleção de embriões masculinos, já que estes produzem aproximadamente 20% mais seda do que fêmeas (Tazima, 1964; Strunnikov, 1975; Ohnuma e Tazima, 1983; Ohnuma, 1988; Ohnuma, 2005).

Há também uma crescente necessidade de desenvolver um mecanismo de esterilidade em insetos pragas (SIT). O SIT tem como objetivo a liberação de um grande número de insetos geneticamente estéreis em uma população selvagem o que, conseqüentemente, levará à diminuição da população (Marec et al., 2005).

## 2.5. Diversidade genética

Ao examinarmos os organismos que nos rodeiam, pertençam eles ao reino animal ou vegetal, observamos uma grande diversidade genética. Esta diversidade determina a variação genética dentro de cada espécie, tanto entre populações geograficamente separadas como entre os indivíduos de uma dada população. A variabilidade genética avalia a tendência dos diferentes alelos de um mesmo gene apresentar variabilidade entre si, numa dada população (Primack, 2006).

A capacidade de uma população para se adaptar a um ambiente em mudança depende da variabilidade genética. A contínua produção de novas variedades é garantida pelo processo de mutação e recombinação, enquanto o processo de adaptação ao ambiente e a deriva genética moldam a distribuição da diversidade genética no espaço e no tempo. A amplitude do modo pelas quais as populações podem responder aos desafios do ambiente é determinada pela variação genética contida nas populações que compõem a espécie (Endler, 1986).

A diversidade genética pode ser abordada sob o ponto de vista estatístico, uma vez que é também uma propriedade de um grupo de indivíduos, populações ou amostra, sendo deste modo caracterizado por média e variância (Paim, 1995).

A aplicação de técnicas multivariadas em estudos de diversidade genética tem permitido a potencialização da discriminação genotípica. Os marcadores moleculares são uma dessas técnicas, pois permitem o estudo da variação genética em nível do DNA (Cruz e Regazzi, 1997).

Referindo-se aos marcadores moleculares, Ferreira e Grattapaglia (1998) relatam que esses recursos permitem ao pesquisador mais informações sobre o genótipo, que, associadas aos dados fenotípicos, complementam os resultados desejados para os programas de melhoramento, exemplificando-se o planejamento de cruzamentos, o agrupamento de genótipos e a identificação de híbridos.

O uso de marcadores moleculares tem possibilitado descobertas nas diferentes áreas da biologia, através da caracterização e identificação de populações, raças e/ou espécies como, por exemplo, trabalhos para a caracterização de arroz (Tcacenco et al., 2005), fungos entomopatogênicos (Wang et al., 2002) e insetos (Sósa-Gómez, 2004). Estudos moleculares permitem entender a movimentação de biótipos ou genótipos dos insetos, sua estratégia, sucesso reprodutivo e qual o padrão de dispersão geográfica ocorre nas espécies de insetos-praga (Chandrasekhar et al., 2005).

Trabalhos recentes têm demonstrado a existência de biotipos de insetos associados a plantas hospedeiras. Busato et al. (2004) utilizaram marcadores AFLP (Amplified Fragment Lenght Polymorphism) e identificaram biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) ocorrendo em lavouras de milho e arroz. Sósa-Gómez et al. (2004) caracterizaram populações de *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae), utilizando marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), demonstrando que as populações estudadas diferem entre si e são geograficamente isoladas. De acordo com os autores, a identificação desse isolamento geográfico e do polimorfismo existente entre cada população permite associá-lo a genes de resistência a inseticidas, subsidiando programas de manejo de *E. heros* na cultura da soja (*Glycine max*).

O RAPD é uma dentre as técnicas moleculares disponíveis para a identificação de polimorfismo nas espécies. Esta técnica utiliza um único “primer” de seqüência arbitrária de poucos nucleotídeos, o qual é capaz de amplificar as seqüências de DNA incluídas entre dois sítios de anelamento (Welsh e McClelland, 1990; Williams et al., 1990). Apesar de ser uma técnica que usa seqüências arbitrárias, alguns trabalhos têm demonstrado sua eficiência na identificação de populações de insetos (Carvalho e Vieira, 2001; Oliveira et al., 2002; Lopes-da-Silva et al., 2004).

Há necessidade de mais estudos empregando métodos moleculares para investigar a diversidade genética em Lepidoptera. Há poucos estudos de variação e diferenciação populacional intra-específica, sendo um tema de maior importância para o campo da biodiversidade e suas aplicações ao manejo, conservação e utilização sustentável (Lewinsohn e Prado, 2009).

# 3. MATERIAL E MÉTODOS

## 3.1. Material biológico

As larvas da *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera; Crambidae) foram obtidas nos canaviais da Usina Santa Terezinha, distrito de Iguatemi, município de Maringá/PR, em 2004, onde já eram mantidas através de endocruzamentos no laboratório da usina, por um período não conhecido. Essas larvas foram mantidas na sala de criação do DBC (Departamento de Biologia Celular e Genética), Universidade Estadual de Maringá-UEM, alimentando-se de dieta artificial desenvolvida por Hensley e Hammond (1968), sendo incubadas em caixas plásticas em estufa Biologic Oxygen Demand (B.O.D.) com fotoperíodo de 12 horas, temperatura de 25 ± 2$^{o}$ C e umidade relativa de 70 ± 10%. Nas condições acima descritas, o ciclo biológico completo, com duração de aproximadamente 40 dias, era mantido obtendo ovos, larvas, pupas e adultos. Os adultos permanecem em câmara de acasalamento construídas com tubo de PVC com aproximadamente 10 cm de diâmetro x 25 cm de altura e revestido internamente com papel sulfite, os cruzamentos eram feitos somente com os indivíduos criados no departamento. Após a postura dos ovos, esses foram coletados e lavados em soluções de formol 0,5%, água destilada e sulfato de cobre 1% para que estes eclodam em período mais curto na mesma época.

Nos experimentos, foram utilizadas larvas de quinto instar e mariposas machos de *D. saccharalis* desde que não é possível diferenciar machos e fêmeas na fase larval. Larvas de quinto instar foram escolhidas por fornecerem uma quantidade de hemolinfa suficiente para a preparação das lâminas e um DNA da glândula sericígena com maior grau de pureza.

Para encontrar fragmentos sexo-específicos e determinar a diversidade genética desta população de *D. Saccharalis*, foram utilizados 31 indivíduos (larva) de sexo não identificado e 4 indivíduos machos (mariposa), utilizado como padrão na diferenciação molecular entre machos e fêmeas.

### 3.2. Preparação de cromossomos mitóticos de larvas de 5° Instar de *D. saccharalis* em células de hemolinfa

As preparações dos cromossomos mitóticos de *D. saccharalis* foram feitas de acordo com o protocolo descrito por Odierna et al. (1993), com algumas modificações. A coleta da hemolinfa foi realizada através de um pequeno corte na última perna em larvas no 5° instar de *D. saccharalis*. À hemolinfa coletada foi adicionado o mesmo volume de tampão antioxidante (Pawell et al., 2001), sendo que essa mistura foi mantida a 4ºC e centrifugada a 500 xg, por 5 minutos a 4°C. As células foram hipotonizadas com 100 µl de ácido cítrico 0,6%, por 45 minutos e fixadas duas vezes com 50 µl de metanol/ácido acético (3:1) por 1 minuto, sendo utilizado 15 µl dessa preparação em cada lâmina.

As lâminas foram coradas com Giemsa e DAPI (4´,6-diamidino-2phenylindole) seguindo o protocolo de Vitturi et al., (1996) e Donlon e Magenis, (1983), respectivamente. Após a coloração, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz Olympus CBA e fotografadas no Axioscop 100 Carl Zeiss.

### 3.3. Extração de DNA genômico de mariposa e glândula sericígena de larvas de 5° Instar de *D. saccharalis*

O DNA genômico foi extraído conforme descrito por Monesi et al. (1998), com modificações. As mariposas machos foram maceradas em nitrogênio líquido até a formação de um pó fino. Ao pó foi acrescentado 350 µl de tampão de homogeinização (Tris HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM pH 8,00, sacarose 5%, espermidina 0,15 mM, espermina 0,15 mM). Para remoção de proteínas foi adicionado o mesmo volume de tampão de proteinase K (Tris HCl 200 mM pH 9,0 1M, EDTA 30 mM pH 8,00, SDS 2%) e 100 µg/ml de proteinase K, incubando a mistura por 1 hora a 60°C.

Para a extração do DNA da glândula sericígena de larvas de 5° instar seguiu-se um protocolo diferente. As larvas foram resfriadas a 4°C por 15 minutos e fixadas em placa de Petri, contendo uma camada de cera. A dissecção da glândula foi feita por um corte ao longo da região ventral com o auxílio de uma lupa, gotejando-se solução salina 0,7% (NaCl). A glândula foi macerada com

pistilo descartável em tubo eppendorf com auxílio de um “motor cordless” em 350 µl de tampão de homogeinização. À mistura foi adicionado tampão da proteinase K e proteinase K, conforme descrito acima. A purificação do DNA, tanto da mariposa como da glândula sericígena, foi realizada por meio de extração com fenol/clorofórmio. Os DNAs foram precipitados com isopropanol e NaCl, ressuspendidos em TE (Tris 10mM, EDTA 1mM) e armazenados a -20ºC.

A análise da qualidade e quantidade de DNA foi realizada através de eletroforese em géis de agarose 0,7% corado com 0,1 µg/ml de brometo de etídeo. A concentração de DNA foi estimada pela comparação com o padrão de DNA λ Hind III (Biolabs). Os géis foram fotografados sob luz UV.

### 3.4. Amplificação dos DNAs genômico de *D. saccharalis* com o primer gyakuU-13

O primer gyakuU-13, com seqüência 5’ CCTTGGTCGG 3’, descrito por Abe et al. (2005), é um marcador RAPD específico para o cromossomo W de *Bombyx mori.* Esse marcador foi utilizado para as reações de amplificação de DNA genômico de *D. saccharalis*, com a finalidade de encontrar uma possível diferenciação molecular entre machos e fêmeas dessa espécie. As reações de amplificação (Polymerase Chain Reaction, PCR) foram realizadas segundo as recomendações do fabricante da enzima Taq Polimerase: tampão 1 X da enzima Taq, 2,5mM de cada dNTPs, 0,75mM de $MgCl_2$, 25mMol do primer; 150ng do DNA e 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), em um volume final de 15µl.

As condições de temperaturas utilizadas para essa reação foram 10 minutos a 94º; seguido por 45 ciclos de 1 minuto a 94ºC; 1 minuto a 37ºC; 1 minuto a 72ºC e uma etapa final de 10 minutos a 72ºC.

Após a amplificação, o produto obtido foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% por 1 hora a 100 V, e em gel de poliacrilamida 6% por 8 horas a 110V.

### 3.5. Análise da diversidade genética

Foi construída uma matriz com os dados binários de presença e ausência de bandas de tamanhos moleculares idênticos (mesmo fragmento), com identificações de cada indivíduo. Esta matriz de similaridade, codificando "1" como a presença da banda no gel e "0" como sua ausência, foi utilizada para gerar distâncias genéticas entre todos os possíveis pares de indivíduos.

A variabilidade genética foi estimada entre indivíduos em estágio larval de *D. saccharalis*, através do marcador RAPD GyakuU-13, utilizando o método da distância genética não-tendenciosa de Nei (1978). Estas análises foram feitas no programa estatístico PopGene 1.32 (Yeh et al., 1997), que é um software gratuito para estudo de genética de populações (http://www.ualberta.ca/~fyeh), considerando os parâmetros para dados diplóides com marcadores dominantes. A fim de representar graficamente o padrão de divergência genética, foi construído um dendrograma da distância genética, baseado em Nei (1978), pelo algorítmo de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using na Arithmetic Average).

Os cálculos necessários para estimar as distâncias genéticas envolvem as freqüências gênicas das populações. Como os marcadores RAPD são dominantes, logo, não é possível identificar os heterozigotos e nem saber se a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Portanto, para calcular a distância genética entre populações com heterozigosidade, neste caso, é preciso admitir que estejam em equilíbrio e estimar as freqüências gênicas a partir da freqüência dos genótipos recessivos (ausência de banda). Para tanto, a distância genética não-tendenciosa de Nei (1978), usada para estimar a divergência genética entre populações, é a análise estatística mais adequada.

# 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1. Cariótipo de *Diatraea saccharalis*

Aproximadamente 100 figuras metafásicas de *D. saccharalis* coradas com Giemsa e DAPI, foram obtidas na tentativa de uma melhor diferenciação dos cromossomos. As melhores figuras apresentaram um número diplóide de 2n=32 cromossomos (Figura 2 A e B), mostrando que está abaixo do número modal dos Lepidópteros que é geralmente entre 28 e 32 pares (Suomalainen, 1969; Robinson, 1971). Entretanto, este número pode variar imensamente, sendo o exemplo mais impressionante em nível de gênero encontrado em *Agrodiaetus*, com número haplóide de cromossomos que variam entre 10 e 134 (Kandul et al., 2007). Uma extraordinária variação no número de cromossomos também foi relatada no gênero *Philaethria*, variando de n=12 a n=88. Este gênero era considerado como uma única espécie, mas híbridos entre indivíduos de populações simpátricas com diferentes números de cromossomos foram encontrados, sendo classificados como novas espécies deste gênero (Suomalainen e Brown Jr, 1984; Brown et al., 1992).

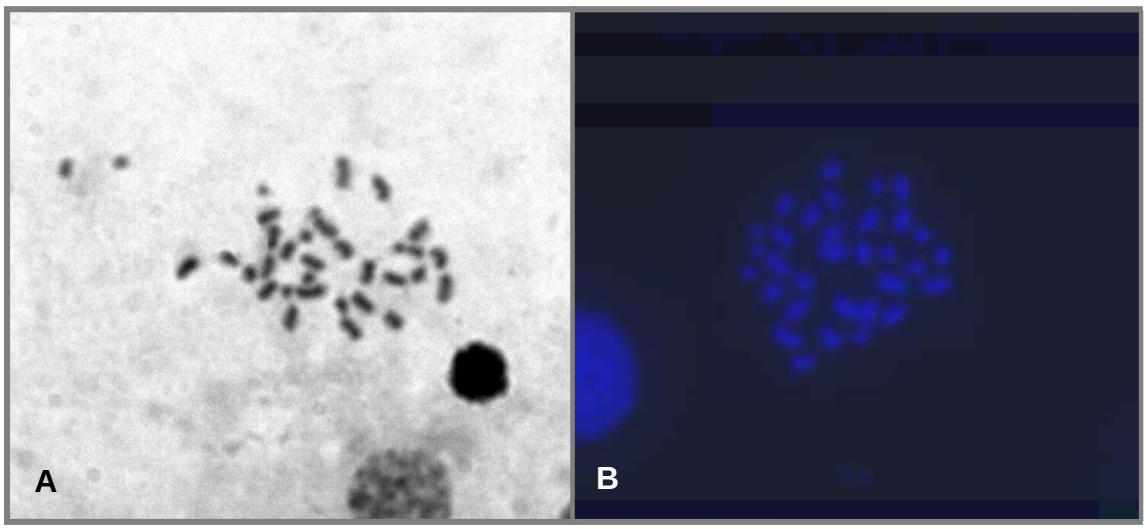


Figura 2 – Cromossomos mitóticos de *D. saccharalis.* Placas metafásicas de células de hemolinfa. (A) Giemsa, (B) DAPI. Aumento 1000 vezes.

A variação cariotípica dentro do gênero *Bicyclus* é menor, com exceção da espécie *B. auricrudus*, que tem um número de cromossomos de n=14, todas as espécies cariotipadas deste gêneros têm entre 26 e 29 pares, com n=28 predominante (De Lesse e Condamin, 1965; De Lesse, 1968). Entretanto, variação dentro da mesma espécie em locais diferentes tem sido observada para *B. funebris*, onde foram encontrados n=28 em Uganda e n=29 no Senegal (De Lesse e Condamin, 1962; De Lesse, 1968).

Nas figuras metafásicas da broca-da-cana não houve diferença entre as duas técnicas de colorações na caracterização dos cromossomos. Figuras metafásicas foram observados com cromossomos pequenos, que não possuem um centrômero definido e são similares no tamanho e forma, o que torna a identificação, baseando-se nesses parâmetros, difícil. Estas características são típicas dos cromossomos em Lepidópteros.

Os cromossomos que não possuem centrômero distinto são chamados de holocêntricos. Os centrômeros são difusos, supostamente para facilitar a fusão e a divisão dos cromossomos (Suomalainen, 1969). Na disjunção paralela das cromátides irmãs na metáfase mitótica, os microtúbulos se unem a uma grande placa do cinetócoro, que cobre parte significativa da superfície do cromossomo (Murakami e Imai, 1974). Algumas descobertas sugerem que os cromossomos de lepidóptera não são verdadeiramente holocêntricos, mas exibe um cinetócoro que, em contraste com um típico cromossomo monocêntrico, envolve uma grande porção, cerca de 30 a 70%, da superfície cromossomal. Estas descobertas favorecem um tipo intermediário de cromossomo entre os holocêntricos e monocêntricos tradicionais (Wolf, 1996).

Devido à impossibilidade da identificação dos cromossomos sexuais nas figuras metafásicas analisadas, foi necessário avaliar outro tipo de análise para sua caracterização. Um método que poderia fornecer esta identificação é o uso de marcadores moleculares de DNA, como o RAPD, com a correlação de fragmentos amplificados sexo-específicos. Esses fragmentos poderiam caracterizar machos e fêmeas de um embrião ou larva, muito antes de qualquer marcador morfológico tornar-se visível.

### 4.2. Marcador molecular sexo-específico de *D. saccharalis*

Vários marcadores RAPD para o cromossomo W de *Bombyx mori* foram relatados por Abe et al. (2005). Dentre esses, o marcador GyakuU-13 foi escolhido na tentativa de relacionar uma ou mais bandas sexo-específicas em *D. saccharalis*.

Primeiramente, foi avaliado o perfil de amplificação do primer GyakuU-13 no DNA genômico de dois indivíduos de *D. saccharalis* (GL31 e Ds). O DNA de *B. mori* foi utilizado como controle de amplificação. A Figura 3 mostra a amplificação do DNA de *B. mori,* que produziu um fragmento de 600 pares de base (pb) (flecha vermelha), conforme descrito por Abe et al. (2005). Um perfil de bandas também foi obtido nas amostras de *D. saccharalis*, mostrando que este primer também amplifica seu DNA. Esta prévia avaliação possibilitou a realização dos experimento de diferenciação molecular sexual de indivíduos de *D. saccharalis*.

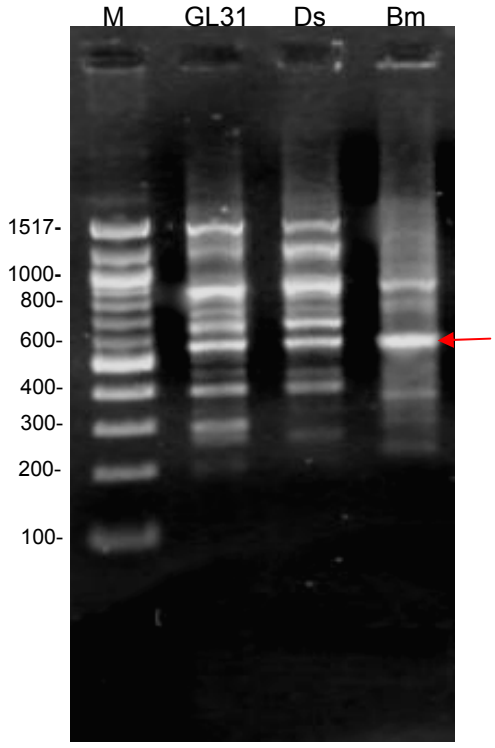


Figura 3 – Produto de amplificação do DNA de *D. saccharalis* (GL31 e Ds) *e B. mori* (Bm) utilizando o primer GyakuU-13. A flecha vermelha indica o fragmento W-específico com 600 pb de *B. mori*. M, marcador de tamanho molecular 100 pb (*Biolabs*). Gel de agarose 1,5%.

A diferenciação sexual molecuar foi obtida a partir da amplificação com o primer GyakuU-13 com DNAs genômicos da glândula sericígena de 31 larvas do 5° instar e de 4 mariposas macho de *D. saccharalis*. A boa qualidade e concentração do DNA extraído destas amostras foi observada em gel de agarose 0,7%, a Figura 4 mostra estas características para 7 amostras. Os indivíduos machos foram identificados como M1, M2, M3, M4. As amostras das extrações de DNA da glândula sericígena de larvas de 5° instar, as quais não eram possíveis de caracterização morfológica sexual, foram nomeadas GL1 a GL31.

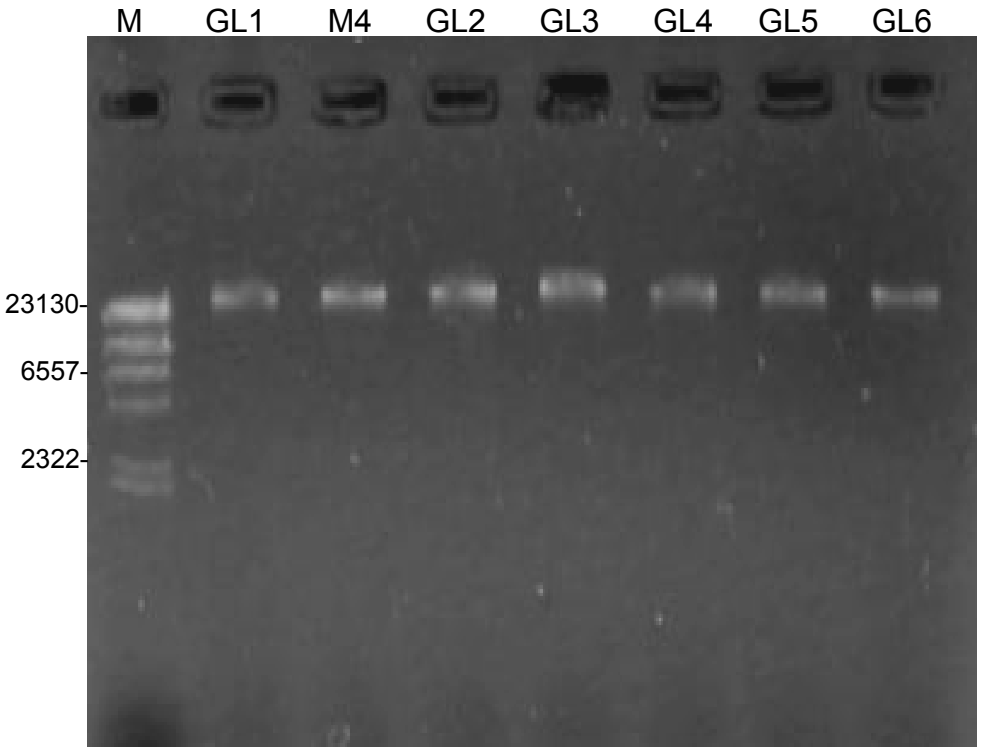


Figura 4 – Amostras de DNA de *D. saccharalis*. DNA purificado de sete indivíduos sem identificação sexual, com exceção da amostra M4 (macho). Gel de agarose 0,7%. M, marcador de tamanho molecular λ *Hind*III (Invitrogen).

Duas concentrações de DNA de dois indivíduos, um sem identificação sexual (GL1) e o outro uma mariposa macho (M4), foram amplificados e o resultado é apresentado pela Figura 5. Nota-se que foram observadas diferenças entre os indivíduos, mas não entre as concentrações. Entretanto foram produzidos fragmentos com mobilidade muito próxima, o que dificultou a análise em gel de agarose 1,5%.

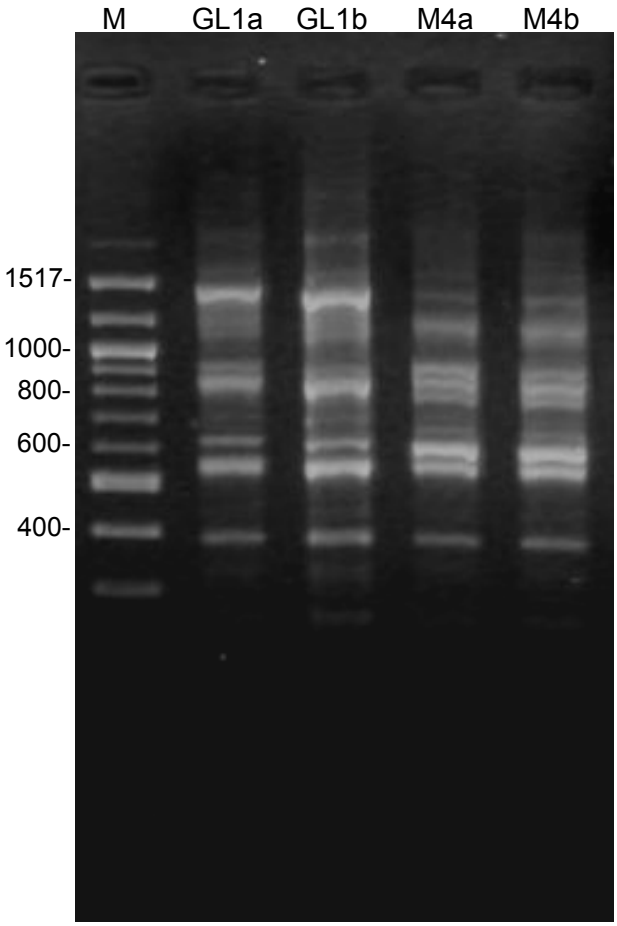


Figura 5 – Perfil RAPD de indivíduos de *D. saccharalis*. O produto de amplificação, utilizando o primer GyakuU-13 de duas amostras (GL1 e M4) em concentrações diferentes (a e b), foram analisados em gel de agarose 1,5%. M, marcador de tamanho molecular 100 pb (*Biolabs*).

Desse modo, os fragmentos obtidos com a amplificação de amostras de 35 indivíduos (31 larvas de 5° instar e 4 de mariposas machos) foram analisados em gel de poliacrilamida 6%. A Figura 6 apresenta o resultado para 8 amostras. Os indivíduos M3 e M4, os quais são amostras de mariposas machos, foram utilizados como parâmetro de comparação para identificar fragmentos sexo-específico. Foram identificados um fragmento de aproximadamente 610 pb, exclusivo para as amostras de machos (flecha amarela), e um fragmento de aproximadamente 1400 pb (flecha vermelha), exclusivo das demais amostras. Os fragmentos de 610 e 1400 pb são, portanto, candidatos a marcadores sexo-específico em *D. saccharalis.* Esses dados demosntram que o primer GyakuU-13 pode ser utilizado como um marcador molecular sexo-específico em *D. saccharalis*.

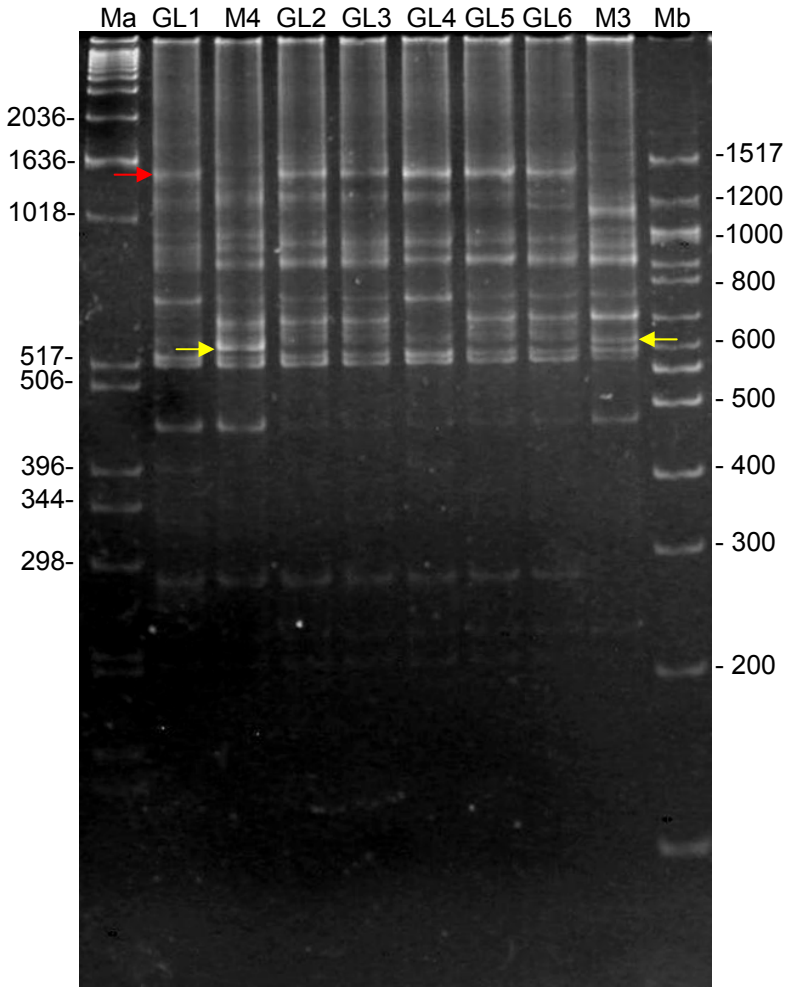


Figura 6 – Perfil RAPD de indivíduos de *D. saccharalis*. O produto de amplificação utilizando o primer GyakuU-13 de oito indivíduos foram analisados em gel de poliacrilamida 6%. A flecha amarela indica o fragmento de 610 pb exclusivo para amostras de machos e a flecha vermelha o fragmento de 1400 pb presente nas demais amostras (fêmeas), caracterizando dois fragmentos sexo-específico neste lepidóptero. Ma marcador de tamanho molecular 1 Kb (Invitrogen), Mb marcador de tamanho molecular 100pb (*Biolabs*).

A análise molecular detalhada nos cromossomos sexuais de lepidópteros é difícil, principalmente no cromossomo W, devido à ausência de genes funcionais e ao acúmulo de seqüências repetitivas e transposons. No *B. mori*, dois tipos de estudos foram utilizados para esta análise. O primeiro identificou seqüências W-específicas utilizando marcadores RAPD (Abe et al., 1998) e o segundo seqüenciou por shotgun clones BAC (bacterial artificial chromosome) W-específicos selecionados de uma biblioteca de BAC usando marcadores RAPD para o cromossomo W (Abe et al., 2005). Ambos os estudos revelaram vários elementos transponíveis neste cromossomo.

Ainda em *B. mori*, Nagaraja et al. (2005) construíram um mapa genético a partir de marcadores RAPD, SSR (*simple sequence repeats*) e FISSR (*fluorescent intersimple sequence repeat*) para o cromossomo Z. Quatro marcadores RAPD e SSR ligados ao cromossomo W também foram identificados. Neste trabalho, eles discutem a importância econômica e evolucionária de genes ligados ao Z e W nos lepidópteros, particularmente no bicho da seda. Embora o cromossomo W de *B mori* seja o fator determinante de fêmea, nenhum gene para caráter morfológico ligado ao W foi encontrado até agora. Em contrapartida, o cromossomo Z carrega genes de importância econômica e de características fenotípicas.

Fuková et al. (2007) apresentaram uma alternativa para obter sequencias do cromossomo W de *Cydia pomonella* baseada na micro dissecção a laser da W-cromatina em células poliplóides do tubo de Malpighi. O DNA das amostras de W-cromatina foi amplificado por DOP-PCR (*degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction*). Os produtos da amplificação foram utilizados para a identificação do cromossomo W através da técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*). Para analise da seqüência, os fragmentos gerados na amplificação foram clonados, avaliados pela técnica de *Southern*. Os resultados mostram que essa técnica é eficiente para a identificação molecular do cromossomo W de *C. pomonella*, e que esta análise não mostrou muitas diferenças com o cromossomo W de *B. mori*. O cromossomo W acumulou as seqüências repetitivas durante a evolução, entretanto ainda conserva seqüências dos ancestrais dos Lepidoptera atuais.

Contudo a hibridação comparativa do genoma (CGH) é o método mais utilizado na identificação e diferenciação molecular do cromossomo sexual em lepidóptero (Traut et al., 2001; Kageyama e Traut, 2003; Fuková et al. 2005; Traut et al., 2008). Este método é utilizado em espécies com cromossomos numerosos e semelhantes em tamanho e forma, e/ou quando não é possível a realização de métodos de bandeamento. Neste método, o DNA genômico de fêmeas é usado como uma sonda ligando aos cromossomos alvos (cromossomo W). A fácil aplicação do método oferece a possibilidade de utilizá-lo mesmo quando poucas espécies são disponíveis, por exemplo, quando as espécies tenham que ser coletadas em campo (Traut et al., 2001).

O conhecimento do sexo genético de indivíduos antes de qualquer marcador morfológico, possibilita a seleção do sexo desejado nos programas de melhoramento genético (Tazima, 1964; Strunnikov, 1975; Strunnikov, 1987; Ohnuma e Tazima, 1983; Ohnuma, 1988; Ohnuma, 2005).

A detecção de um grande número de fragmentos polimórficos gerados pela amplificação com o marcador RAPD GyakuU-13 em nossos experimentos, possibilitou analisar a diversidade genética desta população estudada.

### 4.3. Análise dos locos polimórficos

O primer gyakuU-13 produziu, nos diferentes experimentos, 39 fragmentos com tamanho molecular entre 220-3054 pb. Observou-se que todos eram polimórficos (100%). A heterozigosidade total (Ht) estimada neste estudo foi relativamente alta (Ht= 0, 3560 $\pm$ 0,0199), mostrando que nessa espécie os indivíduos estudados representam uma população com considerável reserva de variabilidade genética. A heterozigosidade de um marcador é a probabilidade de um indivíduo ser heterozigoto no locus marcado e depende do número de alelos e de sua freqüência na população.

O valor de heterozigosidade encontrado para essa população de *D. saccharalis* é particularmente elevado quando comparado com valores de Ht obtidos em outros lepidópteros, e pode refletir a natureza da distribuição populacional, assim como a relação entre seus indivíduos. Pradeep et al. (2005), avaliando a diversidade genética em linhagens de *Bombyx mori* com marcadores ISSR e RAPD relatam Ht=0,26. Este índice revela a homogeneidade genética em linhagens de bicho-da-seda. Por outro lado, Clark et al. (2007) estudaram populações naturais de lagarta-do-cartucho, (*Spodoptera frugiperda*) e estimaram Ht=0,4580 por meio de marcadores AFLP. No entanto, nem sempre a ampla distribuição natural de uma população pede ser associada a uma alta heterozigosidade. Sosa-Gómez (2004) comparou populações naturais da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) e encontrou valores de Ht inferiores a 0,15 sugerindo que há muito fluxo gênico entre estas.

No presente estudo, os indivíduos de *D. saccharallis* eram provenientes da Usina Santa Terezinha, distrito de Iguatemi, município de Maringá/PR, sendo

mantidos por endocruzamentos no laboratório da usina. Quando, em 2004, foram trazidos para criação no DBC (Departamento de Biologia Celular e Genética), Universidade Estadual de Maringá-UEM, continuando sua manutenção através de endocruzamentos. Por este motivo, era de se esperar uma maior uniformidade genética, refletida em valores menores de Ht. Esses dados demonstram que a população estudada por este marcador RAPD não apresenta ainda erosão genética.

Os parâmetros genéticos populacionais estimados com base em marcadores moleculares podem ser utilizados para fins de conservação, domesticação, utilização econômica, melhoramento genético e para melhor compreensão da dinâmica dos alelos na população. Estas informações, aliadas aos conhecimentos da história de vida e de características ecológicas da espécie, permitem conhecer parte da sua biologia.

Os indivíduos de ambos os sexos de *D. saccharalis* foram comparados quanto às similaridades e dissimilaridades no parâmetro distância genética de Nei (1978) (Quadro 1) e agrupados por UPMGA em um dendrograma (Figura 7).

O Quadro 1 mostra a distância genética de todos os indivíduos comparados entre si. Nessa análise, quanto mais próximo de 1 for o valor, maior será a distância genética entre eles. Por exemplo, o valor estipulado aos indivíduos GL2 e GL10 é de 0,9555, o que significa que eles são muito distantes geneticamente, diferentemente da distância genética calculada para os indivíduos M1 e M2 (0,0800).

Vários grupos e subgrupos foram formados de acordo com o polimorfismo gerado pelo primer GyakuU-13 de indivíduos de ambos os sexos (Figura 7). Pode-se destacar o grupo 24 em que os indivíduos M1 e M2, que são machos, foram agrupados com o indivíduo GL1, que é fêmea. A identidade sexual de indivíduos geneticamente próximos pode não ser passível de ser determinada por um único marcador molecular sexo-específico, quando analisados através da distancia genética. A mesma interpretação é válida para os indivíduos M3 e M4, que foram identificados morfologicamente como machos, e agruparam-se com outros indivíduos em outros grupos, não o 24. Este fato pode ser explicado em decorrência desse primer gerar um grande número de loci polimórficos, não estando todos, provavelmente, relacionados a características sexuais.

Quadro 1 – Análise da distância genética quanto às similaridades e dissimilaridades de Nei (1978) entre os 35 indivíduos de ambos os sexos de *Diatraea saccharalis*

| ID | M1 | M2 | M3 | GL1 | M4 | GL2 | GL3 | GL4 | GL5 | GL6 | GL7 | GL8 | GL9 | GL10 | GL11 | GL12 | GL3 | GL14 | GL15 | GL16 | GL17 | GL18 | GL19 | GL 20 | GL21 | GL22 | GL23 | GL24 | GL25 | GL26 | GL27 | GL28 | GL29 | GL30 | GL31 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| M1 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M2 | 0,0800 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M3 | 0,4447 | 0,4855 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GL1 | 0,2296 | 0,2624 | 0,2296 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| M4 | 0,2963 | 0,4055 | 0,2963 | 0,2296 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GL2 | 0,2963 | 0,4055 | 0,2963 | 0,2296 | 0,0001 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GL3 | 0,4855 | 0,5281 | 0,1372 | 0,4055 | 0,3314 | 0,3314 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GL4 | 0,2296 | 0,2624 | 0,3677 | 0,3677 | 0,1671 | 0,1671 | 0,1978 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GL5 | 0,2624 | 0,2963 | 0,4055 | 0,3314 | 0,1372 | 0,1372 | 0,2296 | 0,0260 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GL6 | 0,1671 | 0,2624 | 0,4447 | 0,2963 | 0,1671 | 0,1671 | 0,4055 | 0,1671 | 0,1372 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GL7 | 0,2296 | 0,3314 | 0,4447 | 0,3677 | 0,1082 | 0,1082 | 0,4055 | 0,1671 | 0,1372 | 0,1082 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GL8 | 0,3314 | 0,4447 | 0,2624 | 0,4055 | 0,2624 | 0,2624 | 0,2296 | 0,2624 | 0,2963 | 0,2624 | 0,1978 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GL9 | 0,4855 | 0,5281 | 0,4055 | 0,4055 | 0,7732 | 0,7732 | 0,5281 | 0,7732 | 0,8303 | 0,6678 | 0,7732 | 0,4447 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GL10 | 0,6190 | 0,5725 | 0,4447 | 0,6190 | 0,9555 | 0,9555 | 0,4855 | 0,8303 | 0,8910 | 0,8303 | 0,8303 | 0,5725 | 0,1372 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GL11 | 0,5281 | 0,5725 | 0,4447 | 0,4447 | 0,8303 | 0,8303 | 0,5725 | 0,8303 | 0,8910 | 0,7191 | 0,7191 | 0,5725 | 0,0800 | 0,1671 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GL12 | 0,6678 | 0,7191 | 0,4855 | 0,5725 | 0,7732 | 0,7732 | 0,6190 | 0,7732 | 0,8303 | 0,7732 | 0,7732 | 0,7191 | 0,2296 | 0,2624 | 0,1978 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GL13 | 0,4447 | 0,4855 | 0,3677 | 0,3677 | 0,5281 | 0,5281 | 0,1978 | 0,3677 | 0,4055 | 0,5281 | 0,5281 | 0,4055 | 0,3314 | 0,3677 | 0,2963 | 0,4055 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GL14 | 0,4055 | 0,4447 | 0,4855 | 0,4055 | 0,5725 | 0,5725 | 0,2963 | 0,4055 | 0,4447 | 0,4855 | 0,4855 | 0,3677 | 0,3677 | 0,4055 | 0,3314 | 0,4447 | 0,0800 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GL15 | 0,2296 | 0,2624 | 0,5281 | 0,2963 | 0,4447 | 0,4447 | 0,3314 | 0,2963 | 0,3314 | 0,3677 | 0,3677 | 0,4055 | 0,5725 | 0,5281 | 0,5281 | 0,6678 | 0,2296 | 0,1372 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GL16 | 0,6678 | 0,7191 | 0,4855 | 0,5725 | 0,8910 | 0,8910 | 0,6190 | 0,8910 | 0,9555 | 0,8910 | 0,8910 | 0,8303 | 0,2296 | 0,2624 | 0,1978 | 0,0526 | 0,4055 | 0,4447 | 0,6678 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | | |
| GL17 | 0,7191 | 0,7732 | 0,3677 | 0,5281 | 0,8303 | 0,8303 | 0,4855 | 0,8303 | 0,8910 | 0,8303 | 0,8303 | 0,5725 | 0,1372 | 0,1671 | 0,1671 | 0,1978 | 0,3677 | 0,4055 | 0,6190 | 0,1372 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | | |
| GL18 | 0,7191 | 0,6678 | 0,4447 | 0,7191 | 0,8303 | 0,8303 | 0,4855 | 0,7191 | 0,7732 | 0,8303 | 0,8303 | 0,7732 | 0,3314 | 0,1671 | 0,2963 | 0,1372 | 0,4447 | 0,5725 | 0,7191 | 0,1372 | 0,2296 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | | |
| GL19 | 0,5281 | 0,4855 | 0,3677 | 0,4447 | 0,6190 | 0,6190 | 0,4055 | 0,5281 | 0,5725 | 0,6190 | 0,6190 | 0,5725 | 0,1978 | 0,1671 | 0,1671 | 0,1372 | 0,2963 | 0,4055 | 0,5281 | 0,1978 | 0,2296 | 0,1671 | 0,0000 | | | | | | | | | | | | |
| GL20 | 0,2296 | 0,3314 | 0,4447 | 0,2963 | 0,4447 | 0,4447 | 0,4855 | 0,3677 | 0,4055 | 0,3677 | 0,2963 | 0,3314 | 0,5725 | 0,7191 | 0,5281 | 0,6678 | 0,4447 | 0,4055 | 0,2963 | 0,6678 | 0,7191 | 0,8303 | 0,6190 | 0,0000 | | | | | | | | | | | |
| GL21 | 0,4055 | 0,5281 | 0,4055 | 0,4855 | 0,4855 | 0,4855 | 0,3677 | 0,4055 | 0,4447 | 0,4055 | 0,3314 | 0,1671 | 0,5281 | 0,6678 | 0,5725 | 0,7191 | 0,4055 | 0,3677 | 0,4055 | 0,7191 | 0,5725 | 0,7732 | 0,6678 | 0,1372 | 0,0000 | | | | | | | | | | |
| GL22 | 0,5281 | 0,6678 | 0,5281 | 0,6190 | 0,5281 | 0,5281 | 0,4055 | 0,4447 | 0,4855 | 0,5281 | 0,3677 | 0,1978 | 0,5725 | 0,7191 | 0,6190 | 0,7732 | 0,4447 | 0,4055 | 0,4447 | 0,7732 | 0,6190 | 0,8303 | 0,7191 | 0,2963 | 0,1372 | 0,0000 | | | | | | | | | |
| GL23 | 0,4447 | 0,5725 | 0,5281 | 0,4447 | 0,5281 | 0,5281 | 0,4055 | 0,4447 | 0,4055 | 0,4447 | 0,3677 | 0,3314 | 0,5725 | 0,7191 | 0,5281 | 0,6678 | 0,3677 | 0,3314 | 0,3677 | 0,6678 | 0,7191 | 0,8303 | 0,6190 | 0,2296 | 0,1978 | 0,2296 | 0,0000 | | | | | | | | |
| GL24 | 0,3677 | 0,4855 | 0,3677 | 0,3677 | 0,4447 | 0,4447 | 0,2624 | 0,3677 | 0,4055 | 0,4447 | 0,4447 | 0,2624 | 0,4855 | 0,7191 | 0,5281 | 0,6678 | 0,2963 | 0,2624 | 0,2963 | 0,6678 | 0,7191 | 0,8303 | 0,6190 | 0,2296 | 0,1978 | 0,1671 | 0,1671 | 0,0000 | | | | | | | |
| GL25 | 0,4855 | 0,6190 | 0,3314 | 0,4055 | 0,4055 | 0,4055 | 0,3677 | 0,4855 | 0,5281 | 0,5725 | 0,4855 | 0,2963 | 0,5281 | 0,7732 | 0,5725 | 0,6190 | 0,4855 | 0,5281 | 0,5725 | 0,6190 | 0,5725 | 0,6678 | 0,5725 | 0,3314 | 0,2963 | 0,2624 | 0,3314 | 0,1978 | 0,0000 | | | | | | |
| GL26 | 0,5281 | 0,5725 | 0,4447 | 0,5281 | 0,5281 | 0,5281 | 0,4855 | 0,5281 | 0,5725 | 0,6190 | 0,5281 | 0,3314 | 0,6678 | 0,8303 | 0,7191 | 0,7732 | 0,6190 | 0,6678 | 0,6190 | 0,7732 | 0,7191 | 0,7191 | 0,7191 | 0,3677 | 0,2624 | 0,2963 | 0,3677 | 0,2963 | 0,1372 | 0,0000 | | | | | |
| GL27 | 0,4055 | 0,4447 | 0,4855 | 0,4055 | 0,5725 | 0,5725 | 0,4447 | 0,4855 | 0,5281 | 0,4855 | 0,4855 | 0,2963 | 0,3677 | 0,5725 | 0,4055 | 0,6190 | 0,2624 | 0,2296 | 0,4055 | 0,6190 | 0,5725 | 0,7732 | 0,5725 | 0,4055 | 0,3677 | 0,2624 | 0,3314 | 0,1978 | 0,3677 | 0,3314 | 0,0000 | | | | |
| GL28 | 0,5725 | 0,5281 | 0,8910 | 0,5725 | 0,7732 | 0,7732 | 0,7191 | 0,5725 | 0,6190 | 0,6678 | 0,5725 | 0,5281 | 0,6190 | 0,6678 | 0,6678 | 0,7191 | 0,4055 | 0,2963 | 0,3314 | 0,7191 | 0,6678 | 0,8910 | 0,7732 | 0,3314 | 0,3677 | 0,3314 | 0,4855 | 0,4055 | 0,6190 | 0,4855 | 0,2296 | 0,0000 | | | |
| GL29 | 0,4447 | 0,4855 | 0,5281 | 0,4447 | 0,6190 | 0,6190 | 0,4855 | 0,5281 | 0,5725 | 0,5281 | 0,4447 | 0,3314 | 0,5725 | 0,7191 | 0,5281 | 0,6678 | 0,3677 | 0,3314 | 0,3677 | 0,6678 | 0,7191 | 0,8303 | 0,6190 | 0,2296 | 0,1978 | 0,1671 | 0,2296 | 0,1671 | 0,3314 | 0,2296 | 0,1372 | 0,1978 | 0,0000 | | |
| GL30 | 0,4055 | 0,3677 | 0,5725 | 0,6678 | 0,4855 | 0,4855 | 0,4447 | 0,3314 | 0,3677 | 0,2624 | 0,4055 | 0,4447 | 0,7191 | 0,7732 | 0,7732 | 0,8303 | 0,5725 | 0,6190 | 0,5725 | 0,9555 | 0,8910 | 0,7732 | 0,5725 | 0,6678 | 0,6190 | 0,6678 | 0,6678 | 0,6678 | 0,7191 | 0,7732 | 0,7191 | 0,9555 | 0,7732 | 0,0000 | |
| GL31 | 0,3677 | 0,4855 | 0,3677 | 0,4447 | 0,4447 | 0,4447 | 0,3314 | 0,3677 | 0,4055 | 0,2963 | 0,2963 | 0,2624 | 0,4855 | 0,5281 | 0,4447 | 0,4855 | 0,3677 | 0,3314 | 0,2963 | 0,5725 | 0,4447 | 0,6190 | 0,4447 | 0,2963 | 0,2624 | 0,3677 | 0,4447 | 0,4447 | 0,5725 | 0,5281 | 0,4855 | 0,4855 | 0,3677 | 0,3314 | 0,0000 |

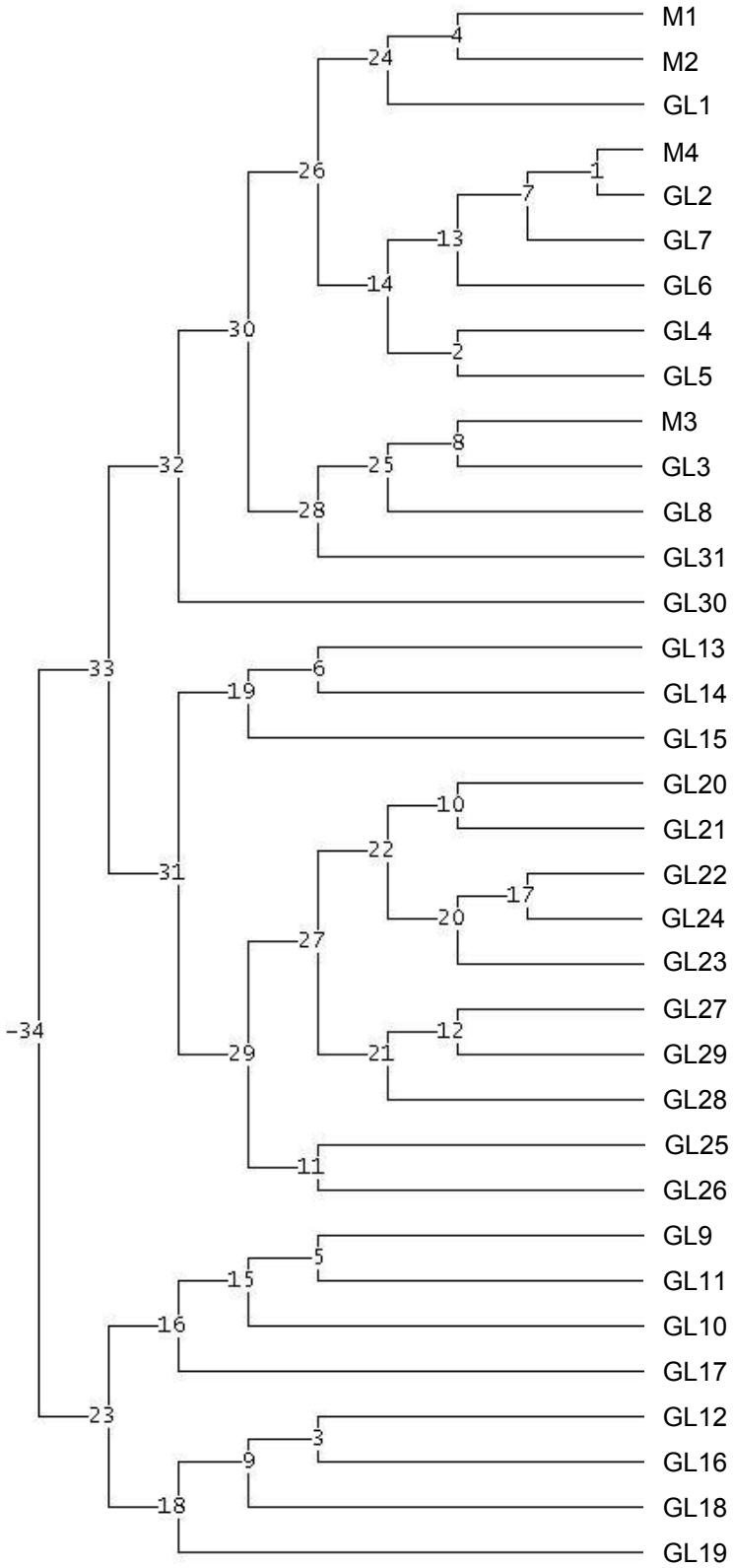


Figura 7 – Dendograma dos 35 indivíduos de *D. saccharalis* baseado na Distância Génetica de Nei (1978) usando o método de agrupamento UPGMA. Os indivíduos M1, M2, M3 e M4 foram caracterizados morfologicamente como machos.

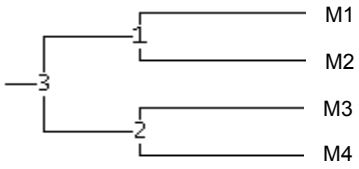


Figura 8 – Dendograma dos 4 indivíduos do sexo masculino de *D. saccharalis* baseado na Distância Génetica de Nei (1978) usando o método de agrupamento UPGMA.

A análise separada de indivíduos de mesmo sexo gerou novos agrupamentos, que podem ser observados nas Figuras 8 e 9.

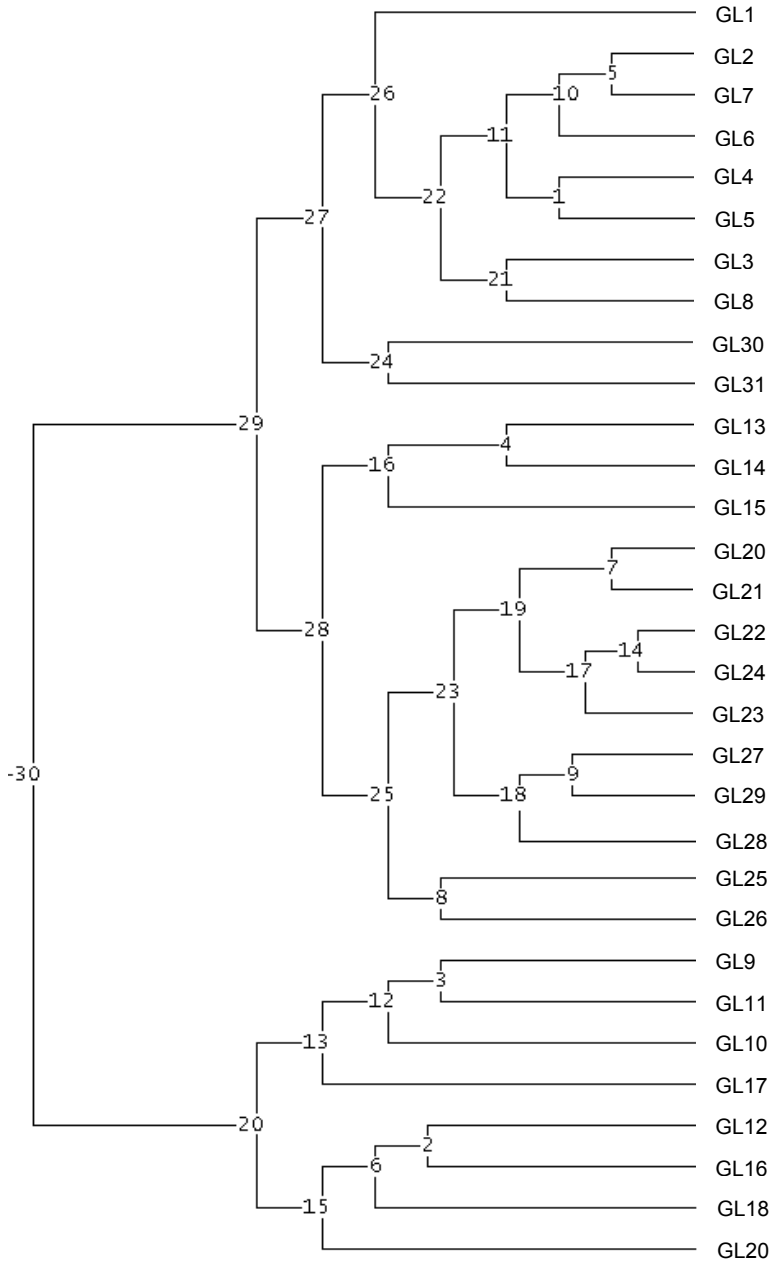


Figura 9 – Dendograma dos 31 indivíduos de sexo não identificado de *D. saccharalis* baseado na Distância Génetica de Nei (1978), usando o método de agrupamento UPGMA.

Na Figura 8, o dendrograma representa os agrupamentos de indivíduos identificados morfologicamente como machos. Dois grupos foram obtidos, que abrigam separadamente os indivíduos M1 e M2 e os indivíduos M3 e M4. Este já era um dado esperado para os indivíduos M1 e M2. Os outros indivíduos, apesar de ocuparem grupos muito diferentes quando analisados com todas as amostras (Figura 7), se agruparam-se mostrando similaridade genética entre eles.

No dendograma da Figura 9 estão representados os agrupamentos dos indivíduos que não foram caracterizados sexualmente. Observa-se que o indivíduo GL1 não se agrupou com nenhum outro indivíduo, demonstrando que este é mais distante geneticamente de todos os demais.

## 5. CONCLUSÃO

A *Diatraea saccharalis* apresenta 16 pares de cromossomos pequenos, holocêntricos e similares em tamanho e forma o que torna difícil a identificação baseada nesses parâmetros. Estas características são típicas dos cromossomos de Lepidoptera. A identificação dos cromossomos sexuais não foi possível. O marcador RAPD GyakuU-13, utilizado para encontrar fragmentos sexo-específicos, gerou várias bandas, porém destacamos dois fragmentos distintos, um de aproximadamente 610 pb, exclusivo para as amostras de machos e outro de aproximadamente 1400 pb, exclusivo das demais amostras. O número elevado de bandas geradas pela amplificação com esse primer possibilitou estimar a heterozigosidade total (Ht) da população estudada que foi de 0,3560, um número relativamente alto por se tratar de uma pequena amostra de uma população que se manteve por endocruzamentos. Por este motivo, era de se esperar uma maior uniformidade genética, refletida em valores menores de Ht. Essa informação demonstra que a população estudada apresenta considerável reserva de variabilidade genética.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


ABE, H.; KANEHARA, M.; TERADA, T.; OHBAYASHI, F.; SHIMADA, T.; KAWAI, S.; SUZUKI, M.; SUGASAKI, T.; OSHIKI, T. Identification of novel random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) on the W chromosome of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, and the wild silkworm, *B. mandarina*, and their retrotransposable element-related nucleotide sequences. **Genes Genet. Syst.**, 73:243-254, 1998.

ABE, H.; SEKI, M.; OHBAYASHI, F.; TANAKA, N.; YAMASHITA, J.; FUJII, T.; YOKOYAMA, T.; TAKAHASHI, M.; BANNO, Y.; SHARA, K.; YOSHIDO, A.; IHARA, H.; YASUKOCHI, Y.; MITA, K.; AJIMURA, M.; SUZUKI, M.G.; OSHIKI, T.; SHIMADA, T. Partial deletions of the W chromosome due to reciprocal translocation in the silkworm *Bombyx mori*. **Insect Mol Biol.**, 14:339-352 2005.

ALLEYNE, M.; WIEDENMANN, R.N.; DIAZ, R.R. Quantification and development of teratocytes in novel-association host-parasitoid combinations. **J. Insect Physiol.**, 47:1419-1427, 2001.

AZEVEDO, T.R.; TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Purification and characterization of three beta-glycosidases from midgut of the sugar cane borer, *Diatraea saccharalis*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 33:81-92, 2003.

BAIMAI, V. Heterochromatin accumulation and karyotipic evolution in some dipteran insects. **Zoological Studies**, 37:75-88, 1998

BANNO, Y.; KAWAGUCHI, Y.; KOGA, Y.; DOIRA, H. Chromosomal features at different meiotic stages during spermatogenesis in *Bombyx mori*. **Sericologia**, 36:51-57, 1996.

BESERRA, E.B.; PARRA, J.R.P. Biologia e parasitismo de Trichogramma *atopovirilia* Oatman & Platner e *Trichogramma pretiosum Riley* (Hym.; Trichogrammatidae) em ovos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lep.; Noctuidae). **Rev. Bras. Entomol.**, 48:119-126, 2004.

BORGES, A.R.; GASPAR, V.P.; FERNANDEZ, M.A. Unequal X chromosomes in *Bradyzia hygida* (Diptera:Sciaridae) famales: karyotype assembly and morphometric analysis. **Genetica**, 108:101-105, 2000.

BOTELHO, P.S.M. Quinze anos de controle biológico da *Diatraea saccharalis* utilizando parasitóides. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 27:254-262, 1992.

BOTELHO, P.S.M.; MACEDO, N. *Cotesia flavipes* para o controle de *Diatraea saccharalis*. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S. (Ed.). **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 409-426.

BROWN, F.M.Jr. Borboletas da serra do Japi: diversidade, hábitats, recursos alimentares e variação temporal. In: MORELLATO, L.P.C. **História natural da serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil**. Campinas: Unicamp/Fapesp, 1992. p.142-187.

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

CARVALHO, A.O.R.; VIEIRA, L.G.E. Determinação das condições ótimas para análises de PCR-RAPD em *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae). **Neotrop. Entomol.**, 30:593-600, 2001.

CASTILHO, H.J. **Introdução de *Apanteles flavipes* (Cam., 1891) (Hymenoptera, Braconidae) para o controle biológico da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1974) (Lepidóptera, Pyralidae), na região de Santa Bárbara d'Oeste, SP**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, 1982. 79p. Dissertação (Mestrado em Entomologia).

CHANDRASEKHAR, N.; SAJEEV, T.V.; SUDHEENDRAKUMAR, V.V.; BANERJEE, M. Population dynamics of the teak defoliator (*Hyblaea puera* Cramer) in Nilambur teak plantations using Randomly amplifi ed gene encoding primers (RAGEP). **BMC Ecology**, 5:1-11, 2005.

CHARLESWORTH, B.; COYNE, J.A.; BARTON, N.H. The relative rates of evolution of sex chromosomes and autosomes. **Am Nat.**, 130:113-146, 1987.

CLARK, P.L.; MOLINA-OCHOA, J.; MARTINELLI, S.; SKODA, S.R.; ISENHOUR, D.J.; LEE, D.J.; KRUMM, J.T.; FOSTER, J.E. Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in the Western Hemisphere. **Journal of Insect Science**, 7:1-10, 2007.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira cana-de-açúcar: safra 2009 primeiro levantamento abril/2009**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/1cana_de_acucar.pdf>. Acesso em: 18, julho, 2009.

CONTE, H. **Morfologia do corpo gorduroso em larvas de *Diatraea saccharalis* (Lep.; Pyralidae) não parasitadas e parasitadas pelo *Cotesia flavipes* (Hym.; Braconidae)**. Rio Claro, SP: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 1994. 160p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular).

COOK, L.G. Extraordinary and extensive karyotypic variation: a 48-fold range in chromosome number in the gall-inducing scale insect *Apiomorpha* (Hemiptera: Coccoidea: Erioccidae). **Genome**, 43:255-263, 2000.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 1997. 390p.

CRUZ, I. A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*, em milho, no Brasil. **Circular Técnica**, 90:1679-1682, 2007.

DE LESSE, H.; CONDAMIN, M. Formules chromosomiques de quelques Lepidopteres Rhopaloceres du Senegal. **Bulletin de l'IFAN**, 24:464-473, 1962.

DE LESSE, H.; CONDAMIN, M. Formules chromosomiques de quelques Lepidopteres Rhopaloceres du Senegal et de Cote d'Ivoire. **Bulletin de l'IFAN**, 27:1089-1094, 1965.

DE LESSE, H. Formules chromosomiques de Lepidopteres Rhopaloceres d'Uganda et du Kenya. **Ann. Soc. Ent. Fr. (NS)**, 4:581-599, 1968.

DINTHER, J.B.M. A method of assessing rice yield losses caused by the stem borer *Rupela albinilla* and *Diatraea saccharalis* in Surinam and the aspect of economic thresholds. **Entomophaga**, 16:320-326, 1971.

DOLON, T.A.; MAGENIS, R.E. Methyl green is a substitute for distamycin A in the formation of distamycin A/DAPI C-bands. **Hum. Genet.**, 65:144-146, 1983.

DOPMAN, E.B.; BOGDANOWICZ, S.M.; HARRISON, R.G. Genetic mapping of sexual isolation between E and Z pheromone strains of the European corn borer *(Ostrinia nubilalis )*. **Genetics**, 167:301-309, 2004.

DOPMAN, E.B.; PEREZ, L.; BOGDANOWICZ, S.M.; HARRISON, R.G. Consequences of reproductive barriers for genealogical discordance in the European corn borer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 102:14706-14711, 2005.

DOSSI, F.C.A.; CONTE, H. Embriologia de D. saccharalis (Lep.; Pyralidae). **Arq. Apadec**, 6:36, 2002.

ELIAS, L.A. **Maize resistance to stalk borer in *Zeadiatraea* Box and *Diatraea* Guilding (Lepidoptera: Pyralidae) at five localities in Mexico**. Kansas State: University Manhattan, 1970. 172p. Tese (Ph.D.).

ENDLER, J.A. **Natural selection in the wild**. New Jersey, Princeton Univ. Press, 1986. 336p.

EUGÊNIO, J.M.; CELLA, D.M. Cytogenetic analysis of *Sitalces dorsualis* (orthoptera- Acrididae-Ommatolampinae): Karyotype variability, C bands and NORs. **Naturalia**, 21:63-68, 1996.

FERREIRA, M.E; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.

FOREJT, J. Hybrid sterility in the mouse. **Trends Genet.**, 12:412-417, 1996.

FUKOVÁ, I.; NGUYEN, P.; MAREC, F. Codling moth cytogenetics:Karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. **Genome**, 48:1083-1092, 2005.

FUKOVÁ, I.; TRAUT, W.; VITKOVÁ, M.; NGUYEN, P.; KUBICKOVÁ, S.; MAREC, F. Probing the W chromosome of the codling moth, Cydia pomonella, with sequences from microdissected sex chromatin. **Chromosoma**, 116:135-145, 2007.

GALLO, D.; NAKANO, O.; WIENDI, F.M.; SIQUEIRA, S.N.; CARVALHO, R.P.L. Manual entomologia agrícola. **Agronômica Ceres**, 7:421, 1978.

GATTI, M.; GOLDBERG, M.L. Mutations affecting cell division in *Drosophila*. In: **Methods in Cell Biology**. San Diego:B.A Hamkalo and S.C.R. Elgin, Academic Press, 1991. p. 543-585.

GATTI, M.; PIMPINELLI, S. Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. **Annu. Rev. Genet.**, 26:239-275, 1992.

GLOVER, D. Abbreviated and regulated cell cycles in *Drosophila*.Curr. **Opin. Cell Biol.**, 2:258-261, 1990.

GOTTER, A.L.; LEVINE, J.D.; REPPERT, S.M. Sex-linked period genes in the silkmoth, *Antheraea pernyi*: implications for circadian clock regulation and the evolution of sex chromosomes. **Neuron**, 24:953-965, 1999.

GRAÇA, L.R. Estimativa econômica dos prejuízos causados pelo complexo broca da cana-de-açúcar. **Brasil Açucareiro**, 88:12-34, 1976.

GROPP, A.H.; WINKING, H; REDI, C. Consequences of Robertsonian heterozygosity: sergeration impairment of fertility versus male-limited sterility. In: CROSIGNANI, P.G.; RUBIN, B.L.; FRACCARO, M. **Genetic control of gamete production and function**. New York: Academic Press, 1982. p. 115-134.

GUERRA, M.S. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro:Guanabara, 1988. 142p.

HENSLEY, S.D.; HAMMOND, A.M. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. **J. Econ. Entomol**., 6:1742-1743, 1968.

HENSLEY, S.D. Management of sugar cane borer populations in Louisiana, a decade of change. **Entomophoga**, 16:133-146, 1971.

HOLLOWAY, T.E.; HALEY, W.E.; LOFTIN, U.C.; HEINRICH, C. **The sugar-cane borer in the United States**. Washington: USDA, 1928. 77p.

IBGE. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1313&id_pagina=1>. Acesso em: 18, julho, 2009.

JEPSON, W.F. **A critical review of the world literature on the lepidopterous stalk borers of tropical graminaceous crops**. London: Commonwealth Institute of Entomology, 1964. 127p.

JIGGINS, C.D.; MAVAREZ, J.; BELTRAN, M.; McMILLAN, W.O.; JOHNSTON, J.S.; BEERMINGHAM, E. A genetic linkage map of the mimetic butterfly *Heliconius melpomene* . **Genetics**, 171:557-570, 2005.

JOHN, B.; LIGHTFOOT, D.C.; WEISSMAN, D.B. The meiotic behavior of natural F1 hybrids between *Trimerotropis suffusa* Scudder and *T. cyaneipennis* Bruner (Orthoptera: Oedipodinae). **Can. J. Genet. Cytol.**, 25:467-477, 1983.

JORNAL DA CIÊNCIA. **Contra as pragas, insetos de fábrica.** Disponível em: <http://www.jornaldaciencia.org.br/Detalhe.jsp?id=23764> Acesso em: 20, julho, 2009.

KAGEYAMA, D. TRAUT, W. Opposite sex-specific effects of Wolbachia and interference with the sex determination of its host Ostrinia scapulalis. **The Royal Society**, 271:251-258, 2003.

KANDUL, N.P.; LUKHTANOV, V.A.; PIERCE, N.E. Karyotypic diversity and speciation in Agrodiaetus butterflies. **Evolution**, 61:546-559, 2007.

KAWAMURA, N. Is the egg size determining gene, *Esd* , on the W chromosome identical with the sex-linked giant egg gene, *Ge* , in the silkworm. **Genetica**, 81:205-210, 1990.

KAWAMURA, N. The egg size determining gene, *Esd* , is a unique morphological marker on the W chromosome of *Bombyx mori* . **Genetica**, 76:195-201, 1988.

KING, M. **Species evolution**. Cambridge:Cambridge University Press, 1993. 336p.

LEWINSOHN, T.M.; PRADO, P.I. **Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento**. Disponível em: http://books.google.com/books?id=r1pygm8BOoQC&pg=PA84&lpg=PA84&dq=diversidade+gen%C3%A9tica+em+lepidoptero&source=bl&ots=uGwOpriDhj&sig=9kGnJm3DnKOPULjV_JsuwmCUCs&hl=ptBR&ei=rXxgSr3bBKqltgf4yZnMDA&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=3. Acesso em: 18, julho, 2009.

LOPES, M.S.; TONET, G.E.L.; VIEIRA, L.G.E. Characterization and genetic relationships among brazilian biotypes of *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae) using RAPD markers. **Neotrop. Entomol.**, 33:43-49, 2004.

LORKOVIC, Z. Meiotic chromosome behaviour in *Pieris napi* x *P. melete* hybrids (Lep., Pieridae) and its taxonomic significance. **Perid. Biol.**, 76:93-103, 1974.

LUKHATANOV, V.A. Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera (Insecta). **J. Zool. Syst. Evol. Research**, 38:73-79, 2000.

MAEDA, T. Chiasma studies in the silkworm *Bombyx mori*. **Jap. J. Genet.**, 15:118-127, 1939.

MANDRIOLI, M.; MANICARDI, G.C. MAREC, F. Cytogenetic and molecular characterization of the MBSAT1 satellite DNA in holokinetic chromosomes of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera). **Chromosome Research**, 11:51-56, 2003.

MAREC, F.; NEVEN, L.G.; ROBINSON, A.S.; VREYSEN, M.; GOLDSMITH, M.R.; NAGARAJU, J.; FRANZ, G. Development of genetic sexing strains in Lepidoptera: From traditional to transgenic approaches. **J. Econ. Entomol.**, 98:248-259, 2005.

MAREC, F.; TOTHOVA, A.; SAHARA, K.; TRAUT, W. Meiotic pairing of sex chromosome fragments and its relation to atypical transmission of a sexlinked marker in *Ephestia kuehniella* (Insecta: Lepidoptera). **Heredity**, 87:659-671, 2001.

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

MITA, K.; KASAHARA, M.; SASAKI, S.; NAGAYASU, Y.; YAMADA, T.; YASUKOCHI, Y.; KADONO-OKUDA, K.; YAMAMOTO, K.; AJIMURA, M.; RAVIKUMAR, G.; SHIMOMURA, M.; NAGAMURA, Y.; SHIN-I, T.; ABE, H.; SHIMADA, T.; MORISHITA, S.; SASAKI, T. The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori* . **DNA Research**, 11:27-35, 2004.

MONESI, N.; JACOBS-LORENA, M.; PAÇÓ-LARSON, M.L. The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hygida* is specifically transcribed in early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster.* **Chromosoma**, 107:559-569, 1998.

MURAKAMI, A.; IMAI, H.T. Cytological evidence for holocentric chromosomes of the silkworms, Bombyx mori and B. mandarina (Bombycidae, Lepidoptera). **Chromosoma**, 47:167-178, 1974.

NAGARAJA, G.M.; MAHESH, G.; SATISH, V.; MADHU, M.; MUTHULAKSHMI, M.; NAGARAJU, J. Genetic mapping of Z chromosome and identification of W chromosome-specific markers in the silkworm, *Bombyx mori*. **Heredity**, 95:148-157, 2005.

NAISBIT, R.E.; JIGGINS, C.D.; LINARES, M.; SALAZAR, C.; MALLET, J. Hybrid sterility, Haldane's rule and speciation in *Heliconius cydno* and *H. melpomene*. **Genetics**, 161:1517-1526, 2002.

NARDIN, R.R. Treinamento do setor de entomologia de grupo Virgolino de Oliveira açúcar e álcool. **Grupo Virgolino de Oliveira**, 4:2-6, 2002.

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

NOKKALA, S. Cytological characteristics of chromosome behaviour during female meiosis in *Sphinx ligustri* L. (Sphingidae, Lepidoptera). **Hereditas**, 106:169-179, 1987.

ODIERNA, G.; BALDANZA, F.; APREA, G.; OLMO, E. Occurrence of G-banding in metaphase chromosomes of Encarsia berlesei (Hymenoptera: Aphelinidae). **Genome**, 36:662-667, 1993.

OHNUMA, A. Establishment of the practical malerearing technology by a balanced sex-linked lethal (in Japanese). **J. Seric. Sci. Jpn.**, 74:81-87, 2005.

OHNUMA, A. Synthesis of a balanced sex-linked lethal strain in the silkworm (in Japanese). **Rep. Silk. Sci. Res. Inst. Tokyo**, 36:17-25, 1988.

OHNUMA, A.; TAZIMA, Y. A new method of balanced sex-linked lethals in the silkworm with use of translocations between W and the fifth chromosomes (in Japanese). **J. Seric. Sci. Jpn.**, 52:133-140, 1983.

OLIVEIRA, C.M.; FUNGARO, M.H.P.; CAMARGO, L.E.A.; LOPES, J.R.S. Análise comparativa da estabilidade do DNA de *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) sob diferentes métodos de preservação para uso em RAPD-PCR. **Neotrop. Entomol.**, 31:225-231, 2002.

PÁDUA, L.E.M. **Biologia comparada de *Apanteles flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae) para determinação de sua exigências térmicas**.

Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz, 1983. 53p. Dissertação (Mestrado em Entomologia).

PAIM, A.C. **Polimorfismo Enzimático e Variação Morfológica em uma População Natural de *Dryas iulia* (FABR. 1775) (LEPIDOPTERA;NYMPHALIDAE)**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 138p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular).

POWELLI, M.; EBEL, E.; SCHLOSSER, W. Considering Uncertainty in Comparing the Burden of Illness due to Foodborne Microbial Pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, 69:209-215, 2001.

PRADEEP, A.R.; CHATTERJEE, S.N.; NAIR, C.V. Genetic differentiation induced by selection in an inbred population of the silkworm *Bombyx mori* revealed by RAPD and ISSR marker systems. **J. Appl. Genet.**, 46:291-298, 2005.

PRIMACK, R. **Essentials of conservation biology**. Miami: Sinauer Associates, 2006. 585p.

PROWELL, D.P. Sex linkage and speciation in Lepidoptera. In: HOWARD, D.J; BERLOCHER, S.H. **Endless forms: species and speciation**. New York:Oxford University Press, 1998. p. 309-319.

RANDOLPH, N.M.; TEETES, G. L.; JETER, B.E.Jr. Insecticide sprays and granules for control of the sugarcane borer on grain sorghum. **Journal of Economic Entomology**, 60:762-765, 1967.

RANG C.; BERGVINGSON D.; BOHOROVA N.; HOISINGTON D.; FRUTOS R. Competition of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins for midgut binding sites: a basis for the development and management of transgenic tropical maize resistant to several stemborers. **Curr Microbiol.**, 49:22-27, 2004.

REED, K.M.; PHILLIPS, R.B. Molecular characterization and cytogenetic analysis of highly repeated DNAs of lake trout, *Salvelinus namaycush*. **Chromosoma**, 104:242-251, 1995.

ROBINSON, R. **Lepidoptera genetics**. Oxford:Pergamon, 1971. 687p.

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

SCRIBER, J.M.; HAGEN, R.H.; LEDERHOUSE, R.C. Genetics of mimicry in the tiger swallowtail butterflies, *Papilio glaucus* and *P. canadensis* (Lepidoptera:Papilionidae). **Evolution**, 50:222-236, 1996.

SHYAMALA, B.V.; RANGANATH, H.A. Metaphase karyotype differentiation in eight species of the *montium* subgroup of *Drosophila*. **Genetica**, 79:191-196, 1989.

SÓSA-GÓMEZ, D.R.; DELPIN, K.E.; ALMEIDA, A.M.R.; HIROSE, E. Genetic differentiation among brazilian populations of *Euschistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) based on RAPD analysis. **Neotrop. Entomol.**, 33:179-187, 2004.

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

SPERLING, F.A.H. Sex-linked genes and species differences in Lepidoptera. **The Canadian Entomologist**, 126:807-818, 1994.

STRAPASSON, A.B.; FILHO, A.B.; CASTRO, C.; ABREU, F.R.; VIEIRA, J.N.S.; JOB, L.C.M.A.; GIULIANI, T.Q. **Balanço nacional da cana-de-açúcar e agroenergia**. Brasília:BINAGRI, 2007. 139p.

STRUNNIKOV, V.A. Sex control in the silkworms. **Nature**, 255:111-113, 1975.

STURTEVANT, A.H. Linkage in the silkworm moth. **Am Nat**, 48:315-317, 1915.

SUOMALAINEN, E.; BROWN, K.S.Jr. Chromosome number variation within *Philaethria* butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae, Heliconiini). **Chromosoma**, 90:170-176, 1984.

SUOMALAINEN, E. Chromosome evolution in the Lepidoptera. **Chromosomes Today**, 2:132-138, 1969.

SUOMALAINEN, E. On the chromosomes of the geometrid moth genus *Cidaria*. **Chromosoma**, 16:166-184, 1965.

TAZIMA, Y. **The genetics of the silkworm**. London: Academic Press, 1964. 253p.

TCACENCO, F.A.; FERREIRA, A.; MATTOS, L.A.T. OLIVEIRA, A.C. Análise da diversidade genética de genótipos e acessos de arroz irrigado do Banco de Germoplasma da Epagri por AFLP. **Rev. Agropec. Catarin.**, 18:81-85, 2005.

TOBLER, A.; KAPAN, D.; FLANAGAN, N.S.; GONZALEZ, C.; PETERSON, E.J.; JIGGINS, C.D.; JOHNTSON, J.S.; HECKEL, D.G.; McMILLAN, W.O. First-generation linkage map of the warningly colored butterfly *Heliconius erato* . **Heredity**, 94:408-417, 2005.

TRAUT, W. A study of recombination, formation of chiasmata and synaptonemal complexes in female and male meiosis of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). **Genetic**, 47:135-142, 1977.

TRAUT, W.; CLARKE, C.A. Cytogenetics of a moth species with a low chromosome number, *Orgyia thyellina*. **Hereditas**, 125:277-283, 1996.

TRAUT, W.; SAHARA, K.; MAREC, F. Sex Chromosomes and sex determination in Lepidoptera. **Sexual Development**, 1:332-346, 2008.

TRAUT, W.; EICKHOFF, U.; SCHORCH, J.C. Identification and analysis of sex chromosomes by comparative genomic hybridization (CGH). **Methods in Cell Science**, 23:155-161, 2001.

VICTORIANO E., GREGORIO E.A. Ultrastructure of the Lyonet's glands in larvae of *Diatraea saccharalis* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae). **Biocell**. 28:165-169, 2004.

VITTURI, R.; CATALANO, E.; SPARACIO, I.; COLOMBA, M.S.; MORELLO, A. Multiple-chromosome sex systems in the darkling beethes *Blaps gigas* and *blaps gibba* (Coleoptera, Tenebrionidae). **Genetic**, 97:225-233, 1996.

WANG, C.; TYPAS, M.A.; BUTT, T.M. Detection and characterisation of *pr*1 virulent gene defi ciencies in the insect pathogenic fungus *Metarhizioum anisopliae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 213:251-255, 2002.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid Res.**, 18:7213-7218, 1990.

WHITE, M.J.D. **Animal cytology and evolution**. Cambridge: Cambridge University Press, 1973.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplifi ed by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid Res.**, 18:6531-6535, 1990.

WOLF, K.W. The structure of condensed chromosomes in mitosis and meiosis of insects. **Int. J. Insect Morphol Embryol**, 25:37-62, 1996.

WREGE, M.S.; CARAMON, P.H.; GONÇALVES, A.C.A.; BERTONHA, A.; FERREIRA, R.C.; CAVIGLIONE, J.H.; FARIA, R.T.de; FREITAS, P.S.L. de; GONÇALVES, S.L. Regiões potenciais para cultivo da cana-de-açúcar no Paraná, com base na análise do risco de geadas. **Revista Brasileira de Agrometeorologia**, 13:113-122, 2005.

XIA, Q.; ZHOU, Z.; LU, C.; CHENG, D.; DAI, F.; LI, B.; SHAO, P.; ZHA, X.; CHENG, T.; CHAI, C.; PAN, G.; XU, J.; LIU, C.; LIN, Y.; QIAN, J.; HOU, Y.; WU, Z.; LI, G.; PAN, M.; LI, C.; SHEN, Y.; LAN, X.; YUAN, L.; LI, T.; XU, H.; YANG, G.; WAN, Y.; ZHU, Y.; YU, M.; SHEN, W.; WU, D.; XIANG, Z.; YU, J.; WANG, J.; LI, R.; SHI, J.; LI, H.; LI, G.; SU, J.; WANG, X.; LI, G.; ZHANG, Z.; WU, Q.; LI, J.; ZHANG, Q.; WEI, N.; XU, J.; SUN, H.; DONG, L.; LIU, D.; ZHAO, S.; ZHAO, X.; MENG, Q.; LAN, F.; HUANG, X.; LI, Y.; FANG, L.; LI, C.; LI, D.; SUN, Y.; ZHANG, Z.; YANG, Z.; HUANG, Y.; XI, Y.; QI, Q.; HE, D.; HUANG, H.; ZHANG, X.; WANG, Z.; LI, W.; CAO, Y.; YU, Y.; YU, H.; LI, J.; YE, J.; CHEN, H.; ZHOU, Y.; LIU, B.; WANG, J.; YE, J.; JI, H.; LI, S.; NI, P.; ZHANG, J.; ZHANG, Y.; ZHENG, H.; MAO, B.; WANG, W.; YE, C.; LI, S.; WANG, J.; WONG, G.K.; YANG, H. A draft sequence for the Genome of the domesticated silkworm *(Bombyx mori)*. **Science**, 306:1937-1940, 2004.

YANG, F.; OBRIEN, P.C.M.; WIENBBERG, J.; NEITZEL, H.; LIN, C.C.; FERGUSON-SMITH, M.A. Chromosomal evolution of the Chinese muntjac (*Muntiacus reevesi*). **Chromosoma**, 106:37-43, 1997.

YASUKOCHI, Y.; ASHAKUMARY, L.A.; BABA, K.; YOSHIDO, A.; SAHARA, K. A second-generation integrated map of the silkworm reveals synteny and conserved gene order between lepidopteran insects. **Genetics**, 173:1319-1328, 2006.

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

YOSHIDO, A.; MAREC, F.; SAHARA, K. Resolution of sex chromosome constitution by GISH and telomere-FISH in some species of Lepidoptera. **Chromosoma**, 114:193-202, 2005.

ZIMMERMAN, E.G. Karyology, systematics and chromosome evolution in the rodent genus, *Sigmodon*. **Michigan State Univ. Biol. Serv**., 4:385-454, 1970.

# 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