

UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA
POPULACIONAL DE *Diatraea saccharalis*
(Fabricius) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) NAS
CULTURAS DO ARROZ (*Oryza sativa* L.) E CANA-
DE-AÇUCAR (*Saccharum officinarum* L.)**

JACQUELINE BARBOSA NASCIMENTO

Orientador:

Dr. José Alexandre Freitas Barrigossi

JACQUELINE BARBOSA NASCIMENTO

**DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DE
Diatraea saccharalis (Fabricius) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) NAS
CULTURAS DO ARROZ (*Oryza sativa* L.) E CANA-DE-AÇUCAR
(*Saccharum officinarum* L.)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Agronomia, da Universidade Federal de
Goiás, como requisito parcial à obtenção do
título de Doutor em Agronomia, área de
concentração: Fitossanidade.

Orientador:

Dr. José Alexandre Freitas Barrigossi

Co-orientador:

Dra. Aluana Gonçalves de Abreu

Goiânia, GO – Brasil.
Março – 2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

Barbosa Nascimento, Jacqueline

Diversidade genética estrutura populacional de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) nas culturas do arroz (*Oryza sativa* L.) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). [manuscrito] / Jacqueline Barbosa Nascimento. - 2015.

77 f.

Orientador: Dr. José Alexandre Freitas Barrigossi; co orientadora Dra. Aluana Gonçalves de Abreu . Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia (EA) , Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Goiânia, 2015.
Anexos.

1. broca-da-cana-de-açúcar. 2. variabilidade genética. 3. marcador microssatélite. 4. planta hospedeira. I. Freitas Barrigossi, José Alexandre, orient. II. Gonçalves de Abreu , Aluana, co-orient. III. Título.



Termo de Ciência e de Autorização para Disponibilizar as Teses e Dissertações Eletrônicas (TEDE) na Biblioteca Digital da UFV

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Minas Gerais–UFV a disponibilizar gratuitamente através da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações – BDTD/UFV, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☐ Dissertação ☒ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Autor (a):	Jacqueline Barbosa Nascimento		
CPF:	014670731-13	E-mail:	nascimentojb@hotmail.com
Seu e-mail pode ser disponibilizado na página?		☒ Sim	☐ Não
Vínculo Empregatício do (a) autor (a):	-		
Agência de fomento:	-	Sigla:	-
País:	-	UF:	-
CNPJ:	-		
Título:	Diversidade genética e estrutura populacional de <i>Diatraea saccharalis</i> (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) nas culturas do arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) e cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.)		
Palavras-chave:	Broca-da-cana, arroz, cana-de-açúcar, marcador molecular, diversidade genética.		
Título em outra língua:	Genetic diversity and population structure of <i>Diatraea saccharalis</i> (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) in culture of rice (<i>Oryza sativa</i> L.) and sugarcane (<i>Saccharum officinarum</i> L.)		
Palavras-chave em outra língua:	Sugarcane borer, rice, sugarcane, molecular marker, genetic variability.		
Área de concentração:	Fitossanidade		
Data defesa:	25/03/2015		
Programa de Pós-Graduação:	Agronomia		
Orientador (a):	José Alexandre Freitas Barrigossi		
CPF:	283.020.526-04	E-mail:	jose.barrigossi@embrapa.br
Co-orientador (a):	Aluana Gonçalves de Abreu		
CPF:	598.162.951-72	E-mail:	agabreu@gmail.com
Co-orientador(a):	-		
CPF:	-	E-mail:	-

3. Informações de acesso ao documento:

Liberação para disponibilização¹ ☒ total ☐ parcial

Em caso de disponibilização parcial, assinale as permissões:

☐ Capítulos. Especifique: _____

☐ Outras restrições: _____

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF não-criptográfico da tese ou dissertação.

O Sistema da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações garante aos autores, que os arquivos contendo eletronicamente as teses e ou dissertações, antes de sua disponibilização, receberão procedimentos de segurança, criptografia (para não permitir cópia e extração de conteúdo, permitindo apenas impressão fraca) usando o padrão do Acrobat.

Assinatura do (a) autor(a)

Data: 25 / 03 / 2015

¹ Em caso de restrição, esta poderá ser mantida por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Todo resumo e metadados ficarão sempre disponibilizados.

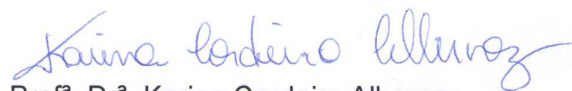
JACQUELINE BARBOSA NASCIMENTO

TÍTULO: DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURA POPULACIONAL
DE *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (LEPIDOPTERA:
CRAMBIDAE) NA CULTURA DO ARROZ (*Oryza sativa* L.) E
CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)

Tese DEFENDIDA em 25 de março de 2015 e APROVADA pela Banca Examinadora
Constituída pelos Membros:


Dr. José Alexandre Freitas Barrigossi
Presidente da Banca – Embrapa Arroz e Feijão


Prof. Dr. Paulo Marçal Fernandes
Membro – EA/UFG


Profª. Drª. Karina Cordeiro Albernaz
Membro – EA/UFG


Drª. Tereza Cristina de Oliveira Borga
Membro – Embrapa Arroz e Feijão


Dr. Edson Hirose
Membro – Embrapa Arroz e Feijão

Goiânia- Goiás
Brasil

À toda minha família,
dedico

À grande companheira e sabedora das
dificuldades, alegrias e conquistas do
dia a dia, minha mãe Maria Divina
Nascimento Barbosa.

Ofereço

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre colocou em minha vida pessoas companheiras que me ajudaram e caminharam juntas nas conquistas realizadas.

A minha mãe Maria Divina Nascimento Barbosa que esteve presente em todas as etapas da realização deste sonho acadêmico.

Ao meu pai Divino Gregório Barbosa e as minhas irmãs Juliana, Liliane, Marília e Luciana que sempre torceram por mim e me ajudaram a conquistar os objetivos da minha vida.

Ao Dr. José Alexandre Freitas Barrigossi pela orientação não só acadêmica, mas também pessoal, pela confiança depositada, companheirismo e determinação para a realização deste trabalho e na busca continuada e incansável de novos conhecimentos.

Ao professor Dr. Paulo Marçal Fernandes ao apoio e entusiasmo para a realização desta pesquisa.

As pesquisadoras e doutoras Tereza Cristina de Oliveira Borba, Aluana Gonçalves de Abreu e Raquel Neves de Mello pelo apoio dados para a realização dos trabalhos na área da Biotecnologia.

Aos companheiros da Embrapa Arroz e Feijão Edmar Cardoso, Edson Djalma Dias Jacinto, José Francisco Arruda e Silva, Genoquinha Vaz, Gerusa Vaz de Souza, Newton Cavalcanti de Noronha Junior, Gesimária Ribeiro, José Simão de Rezende, Paula Arielle Mendes, Luana Alves Rodrigues e Fernanda Oliveira Cunha Magalhães, que fazem parte dos laboratórios de Entomologia e de Biotecnologia, que sempre me ajudaram nas coletas de campo e nas análises laboratoriais deste trabalho. As companheiras da Biblioteca desta instituição, Faustina Gonçalves dos Santos (*in memorian*) e Ana Lúcia Delalibera de Faria que auxiliaram na busca de materiais científicos que contribuíram a redação deste trabalho.

A Embrapa Arroz e Feijão por fornecer total apoio financeiro para a coleta de insetos em várias áreas agrícolas; à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) por me conceder bolsa de estudo.

Aos companheiros de universidade e estagiários da Embrapa Arroz e Feijão Míriam de Almeida Marques, Gisele Carneiro da Silva Teixeira, Fernanda Faria, Aniele Carolina oliveira Lemes, Jardel Barbosa, Klênia Rodrigues, Felipe Cândido, Glaucilene Duarte Carvalho, Adriana Rodolfo da Costa, Juliana Duarte de Souza Alonso, Rayan

Carlos de Jesus Vital e Luma Cascão que tanto me incentivaram e ajudaram na condução deste trabalho.

Ao meu grande e amado companheiro Reynard Odenheimer que a cada dia me encoraja para a obtenção de várias conquistas na vida.

As novas amizades conquistadas neste prazeroso período de estudo, Rachel Oltjenbruns, Angel Iverson, Rosane Bezerra da Silva, Michele Pittol e Leila Margarete Fernandes.

Ao secretário da Pós-graduação Welinton Barbosa Mota, pela presteza e aos professores deste curso, que contribuíram para o meu enriquecimento científico.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram neste trabalho.

A todos o meu reconhecimento.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ANEXOS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 <i>DIATRAEA SACCHARALIS</i>	17
2.1.1 Distribuição geográfica	17
2.1.2 Ciclo biológico	17
2.1.3 Danos e prejuízos provocados as culturas hospedeiras	18
2.2 CONCEITO DE BIÓTIPO	19
2.3 CONCEITO DE RAÇA HOSPEDEIRO ESPECIALISTA.....	20
2.3.1 Critérios para detecção de raças hospedeiro-especialista.....	21
2.4 OCORRÊNCIA E IMPORTÂNCIA DE BIÓTIPOS DE INSETOS NA AGRICULTURA.....	22
2.5 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES	23
2.6 ESTUDOS DE POPULAÇÕES DE INSETOS COM MARCADORES MOLECULARES	26
2.6.1 Aplicações de marcadores microssatélites para estudo de populações de insetos	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	30
3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA GENÔMICO	31
3.3 ANÁLISE MOLECULAR POR MARCADORES SSR	32
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	33
4 RESULTADOS.....	35
5 DISCUSSÃO	48

6	CONCLUSÕES.....	55
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
8	ANEXOS	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Áreas e cultivares/variedades amostradas para a coleta de indivíduos de <i>D. saccharalis</i> na cultura do arroz e cana-de-açúcar. Safra 2012/2013...	30
Tabela 2.	Características dos oito marcadores microssatélites utilizados no estudo genético de populações da broca-da-cana <i>D. saccharalis</i> (Fabr.).....	32
Tabela 3.	Estimativas do número total de alelos (A_T), heterozigosidade observada ($H_O \pm SE$), heterozigosidade esperada ($H_E \pm SE$) e conteúdo de informação polimórfica (PIC) para os locos microssatélites utilizados para o estudo populacional de <i>D. saccharalis</i>	35
Tabela 4.	Estimativas do número total de alelos (A_T), número médio de alelos por loco (A), da riqueza alélica (A_r), das heterozigosidades observada ($H_O \pm SE$) e esperada ($H_E \pm SE$), o conteúdo de informação polimórfica (PIC) e índice de fixação intrapopulacional (f) da espécie para as dezessete populações de <i>D. saccharalis</i>	36
Tabela 5.	Frequências alélicas dos oito locos microssatélite para as populações de <i>D. saccharalis</i>	37
Tabela 6.	Alelos privados obtidos em oito locos de marcadores microssatélites para 17 populações de <i>D. saccharalis</i>	42
Tabela 7.	Probabilidade para aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) de acordo com o Teste Exato de Fisher. Em negrito: locos que não se ajustam as proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, com grau de significância $\alpha = 0,05$	43
Tabela 8.	Frequência de alelos nulos estimada para cada loco dentro de cada população de <i>D. saccharalis</i>	43
Tabela 9.	Estimativa dos índices de estruturação baseados em Weir & Cockerham (1984) (f , F , θ) para as populações naturais de <i>D. saccharalis</i> . Os valores não significativos estão indicados com asterisco (*).....	44
Tabela 10.	Matriz de diferenciação genéticas (θ) par a par entre as dezessete populações de <i>D. saccharalis</i> usando ou não a correção <i>ENA</i> descrita em Chapuis & Estoup (2007).....	45

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição dos pontos amostrados onde foram coletadas as diferentes populações de *D. saccharalis*..... 31
- Figura 2.** Dendrograma das populações de *D. saccharalis* gerado pelo método de *Neighbor-joining* baseado na distância genética Cavalli-Sforza & Edwards (1967). Populações em vermelho correspondem aos indivíduos coletados na cultura da cana-de-açúcar. Os números nos nós correspondem aos valores de 1000 *bootstrap*. *Verificar os nomes das populações na tabela 01 46
- Figura 3.** Análise de atribuição usando inferência Bayesiana implementada no programa *STRUCTURE* das populações de *D. saccharalis*. $\Delta K = 2$, número que melhor representa o conjunto de dados 47

LISTA DE ANEXOS

Anexo A.	Mapas dos municípios amostrados em diferentes áreas agrícolas no Brasil.....	71
Anexo B.	Distâncias geográficas em quilometro par a par entre as dezessete populações de <i>D. saccharalis</i>	81
Anexo C.	Volumes (μL) dos <i>primers</i> utilizados em uma reação de PCR para a genotipagem dos indivíduos presentes nas dezessete populações de <i>D. saccharalis</i>	82

RESUMO

NASCIMENTO, J. B. **Diversidade genética e estrutura populacional de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) nas culturas do arroz (*Oryza sativa* L.) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.).** 2015. 77 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Fitossanidade)-Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.¹

A mudança na composição das plantas-hospedeiras na paisagem agrícola pode gerar seleção divergente suficiente para permitir a adaptação ecológica que leva a especialização e subsequentemente à especiação de espécie de insetos. O objetivo deste estudo foi determinar a diversidade e estruturação genética de populações de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), coletadas em duas culturas hospedeiras, utilizando marcadores microssatélites. As amostras de lagartas foram coletadas em plantas de arroz e cana-de-açúcar em diferentes áreas de cultivo durante a safra 2012/2013, nos Estados de Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul. No total, foram encontrados 127 alelos distribuídos entre oito locos em dezessete populações com um total de 426 indivíduos. Os locos foram polimórficos, com média de 15,87 alelos. Os valores de heterozigosidade média esperada (H_E) e observada (H_O) para os locos foram de 0,579 e 0,350, respectivamente. Um menor número de alelos (35) foi encontrado na população Morrinhos, em contraposição à população de Formoso do Araguaia que apresentou o maior (62). Da mesma forma, o maior e o menor número médio de alelos por locos (A_m) foram observados nestas populações (7,75 e 4,38). A população oriunda de Formoso do Araguaia apresentou o maior valor médio para a riqueza alélica (6,82). A média do conteúdo de informação polimórfica (PIC) nas populações de *D. saccharalis* foi de 0,530. Os índices de fixação intrapopulacional (f) apresentaram valores positivos e significativamente diferentes de zero com valor médio de 0,403. O coeficiente de endogamia da espécie foi de 0,399. Os valores de F_{IT} e F_{ST} (θ) estimados foram respectivamente 0,437 e 0,062. Estas estimativas globais indicaram que há estruturação genética entre estas populações. Apesar das estimativas globais terem indicado estruturação genética, a estruturação entre as populações (θ) em cana-de-açúcar não foi significativa, ao contrário das populações em arroz as quais os valores de θ foram significativos. Houve correlação significativa entre as distâncias genéticas e geográficas estimadas por meio do teste de Mantel ($r=0,76$; $p=0,0033$) indicando um padrão de aumento da distância genética com o aumento da distância geográfica. Na análise de agrupamento e estruturação populacional, formaram-se dois grupos. O primeiro formado por populações oriundas do Estado de Goiás e o segundo composto pelas populações de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul. A população de Formoso do Araguaia, amostrada na cultura do arroz apresentou-se em uma posição intermediária aos dois grupos formados. Estes resultados indicam que a diversidade genética de *D. saccharalis* está estruturada no espaço e que a planta-hospedeira, neste estudo, não teve um papel fundamental no processo de divergência genética de populações.

Palavras-chave: broca-da-cana-de-açúcar, variabilidade genética, marcador microssatélite, planta hospedeira.

¹ Orientador: Dr. José Alexandre Freitas Barrigossi. Embrapa Arroz e Feijão.
Co-orientador: Dra Aluana Gonçalves de Abreu. Embrapa Arroz e Feijão.

ABSTRACT

NASCIMENTO, J. B. **Genetic diversity and population structure of *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) in culture of rice (*Oryza sativa* L.) and sugarcane (*Saccharum officinarum* L.)** 2015. 77 f. Thesis (Doctorate in Agronomy: Plant Health)-Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015¹.

The change in composition of the host-plants in the agricultural landscape can generate enough divergent natural selection to allow ecological adaptation that leads to specialization and subsequently to speciation in species of insect. The objective of this study was to determine the diversity of genetic and population structures of *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), which was collected in two host-plants using microsatellite markers. Samples of larvae of this stem borer were collected on rice and sugarcane in different fields during the harvest of 2012/2013 in the states of Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, and Rio Grande do Sul. A total of 127 alleles were found distributed among the eight loci in seventeen populations, with a total of 426 individuals. The loci were highly polymorphic, with average of 15,87 alleles. The expected heterozygosity (H_E) and observed (H_O) were 0,579 and 0,350, respectively. A lower total number of alleles (35) was found in population of Morrinhos, as opposed to Formoso do Araguaia which has the largest (62). The same way, the smallest and the largest average number of alleles per locus (A_m) were observed in these populations (4,38 and 7,75). The population from the Formoso do Araguaia showed the highest value for the allelic richness (6,82). In all populations, the observed heterozygosity (H_O) was lower than expected (H_E). The average polymorphic information content (PIC) in populations of *D. saccharalis* was 0,530. The intrapopulation fixation indexes (f) estimated for each population showed positive values and significantly different from zero with a average value of 0,403. The coefficient of inbreeding species was 0,399. The estimates F_{IT} and F_{ST} (θ) values were 0,437 and 0,062 respectively. These global estimates indicated that there is genetic structure among these populations. Despite global estimates had indicated genetic structure, the structuring (θ) among of populations of the sugarcane was not significant; in contrast with the populations of the rice which showed θ values significant. There was a significant correlation between genetic and geographic distances estimated using the Mantel's test ($r=0,76$; $p= 0,0033$), in which there is an increase in pattern of genetic distance with the increase of geographic distance in cluster analysis and population structures observed with the formation of the two groups of populations. The first was formed by populations from the state of Goiás and the second was composed of populations of Mato Grosso, Mato Grosso do Sul and Rio Grande do Sul. The population of Formoso do Araguaia sampled in rice showed in an intermediate position to the two groups formed. These results indicate that the genetic diversity of *D. saccharalis* is structured in space and the plant-host, in this study, did not have a key role in the process of genetic divergence populations.

Key words: sugarcane borer, genetic variability, microsatellite marker, host-plant

¹ Adviser: Dr. José Alexandre de Freitas Barrigossi. Embrapa Arroz e Feijão.
Co-adviser: Dra Aluana Gonçalves de Abreu. Embrapa Arroz e Feijão.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A diversidade genética e a estrutura de populações são importantes aspectos em estudos de genética de populações de insetos-pragas. Estudos comparativos sobre estes aspectos genéticos podem, portanto, ajudar a elucidar os fatores que afetam seus níveis populacionais (Duan et al., 2013). Estudos anteriores com espécies de insetos-pragas demonstraram que a diversidade e estrutura genética populacional de uma espécie podem ser afetadas por diversos fatores, tais como as alterações climáticas, fatores ambientais e ecológicos, barreiras naturais, atividades humanas, migração e fluxo gênico e que esses fatores, muitas vezes, agem em conjunto (Fairley et al., 2000; Prugh et al., 2008; Pauls et al., 2013; Nater et al., 2013).

O estudo genético populacional pode estimar o grau de isolamento e a troca de material genético entre populações ao longo do espaço e do tempo, fornecendo uma estimativa da taxa de invasão ou re-invasão de determinada área, e ainda identificar espécies que ocupam diferentes culturas (Martel et al., 2003). Estas estimativas são de grande importância para o conhecimento de seus efeitos sobre a evolução de resistência às principais medidas de fitoproteção (Domingues et al., 2012). Para a broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), estudos sobre a variabilidade e estrutura genética populacional são incipientes (Pavinato, 2014).

Esta espécie de broca do colmo, comumente conhecida como broca-da-cana ou broca-da-cana-de-açúcar, é uma das principais pragas desta cultura e ocorre em quase todo continente americano (Capinera, 2013). É uma espécie polífaga, que originalmente atacava pastos aquáticos e semi-aquáticos (Cruz, 2008) e atualmente tem surtos populacionais em gramíneas cultivadas, como arroz (*Oryza sativa* L.), milho (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.), e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.).

Entre os estresses bióticos, esta broca do colmo é considerada uma grande ameaça para o aumento da produção orizícola e canavieira. Para a cultura do arroz infestações naturais desta espécie causam perdas de produção de até 60% em áreas de cultivo (Way et al., 2006). Para a cana-de-açúcar, as perdas provocadas por esta broca

podem chegar a 35,0 kg de açúcar/ha e a 30,0 litros de álcool/ha com apenas 1% de colmos broqueados (Sandoval & Senô, 2010).

Diferenças morfológicas, fisiológicas e comportamentais em espécimes *D. saccharalis* provenientes do Brasil e dos EUA sugerem que esta broca do colmo pode representar duas espécies (Pashley et al., 1990). Também foram identificadas diferenças na composição dos feromônios sexuais entre populações coletadas distantes geograficamente (Cortés et al., 2010). Essas e outras características tornam essa espécie um modelo adequado para o estudo de genética em insetos-pragas.

Entender como as populações de insetos-pragas estão estruturadas em diferentes culturas agrícolas permite o delineamento de práticas de manejo mais eficientes, com o objetivo de se retardar a evolução da resistência a medidas de fitoproteção (Caprio & Tabashnik, 1992). Porém, eventos genéticos que estão relacionados à estruturação populacional podem ser difíceis de serem medidos diretamente e com isto, podem ser estimados por meio de marcadores moleculares (Roderick, 1996).

Entre as diferentes classes de marcadores moleculares disponíveis, os marcadores microssatélites têm sido usados com sucesso em estudos de genética de população em vários grupos de Lepidoptera (Ji et al., 2003; Zhang, 2004; Arunkumar et al., 2009; Wei et al., 2013). Estes marcadores são regiões genômicas de repetições simples *in tandem*, que, quando acessadas por iniciadores específicos, são utilizadas como marcadores genéticos e podem ser abundantes em certos grupos de organismos e são altamente polimórficos (Guichoux et al., 2011). Suas características como alta variabilidade intra-loco, fácil genotipagem e confiabilidade, herança codominante os tornaram amplamente utilizados em ecologia e genética de insetos (Behura, 2006).

Até o presente momento são poucos os estudos sobre genética de populações de *D. saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lopes et al., 2014; Pavinato, 2014). Estão sendo desenvolvidas pesquisas com outras espécies de Lepidoptera, como *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797), praga do algodão, milho e arroz, e *Sesamia nonagrioides* (Lefèbvre, 1827), praga do milho que estão contribuindo com o conhecimento sobre a diversidade e a estrutura genética das populações de insetos pragas (Busato et al., 2004; Martinelli et al., 2006; Poza et al., 2008).

Este trabalho representa uma das primeiras etapas para o estudo da diversidade genética de populações de *D. saccharalis* (Fabricius, 1794) nas principais regiões produtoras da cultura do arroz. Populações oriundas da cana-de-açúcar foram utilizadas

para se observar se estas estavam relacionadas geneticamente já que a associação entre populações de insetos à plantas-hospedeiras pode ser uma etapa anterior à formação de raça-hospedeira e especialização. A mudança na composição de plantas-hospedeiras na paisagem agrícola pode gerar seleção divergente suficiente para permitir a adaptação ecológica que leva à especialização e subsequentemente à especiação (Rundle & Nosil, 2005). Neste sentido, o objetivo deste estudo foi determinar a diversidade e estruturação genética de populações de *D. saccharalis* (Fabricius, 1794), coletadas em duas culturas hospedeiras, utilizando marcadores microssatélites.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *DIATRAEA SACCHARALIS*

2.1.1 Distribuição geográfica

Diatraea saccharalis (Fabricius, 1764) (Lepidoptera: Crambidae), conhecida como broca-da-cana-de-açúcar, broca-pequena-da-cana-de-açúcar, broca-do-colmo do arroz, broca-do-milho é uma espécie nativa do hemisfério ocidental com distribuição geográfica entre 30° de latitude Norte e 30° de latitude Sul (Capinera, 2013). Nos Estados Unidos foi introduzida em Louisiana em 1855 e desde então se espalhou pela costa do Golfo do México, habitando somente as partes mais quentes desses estados. Esta broca-do-colmo também ocorre em todo o Caribe, América Central e as porções mais quentes da América do Sul até ao norte da Argentina (Capinera, 2013). No Brasil, ocorre em todo o país, principalmente nos estados onde se cultiva cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), sendo considerada praga-chave desta cultura (Pinto et al., 2006). Na cultura do arroz (*Oryza sativa* L.), esta praga ocorre juntamente com outras duas brocas-do-colmo, *Rupela albinella* (Stoll, 1781) (Lepidoptera: Pyralidae) e *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller, 1848) (Lepidoptera: Pyralidae), as quais são consideradas pragas de importância econômica e podem ser encontradas tanto no cultivo em várzea como de sequeiro (Ferreira et al., 2001).

2.1.2 Ciclo biológico

A fêmea de *D. saccharalis* (Fabricius, 1764) oviposita uma massa de ovos no limbo foliar, geralmente na face abaxial das folhas da planta hospedeira, disposta de forma imbricada e se assemelha a escama de peixe ou couro de cobra, contendo de cinco a 50 ovos planos, elípticos de coloração variando de amarelada a marrom-escuro ao final da incubação. A eclosão se dá entre quatro e nove dias após a oviposição. As lagartas neonatas originadas de uma mesma massa de ovos se movimentam pelas folhas onde se alimentam do parênquima destas, principalmente do tecido interno da bainha. Após o

primeiro instar, as lagartas penetram nos colmos, perfurando e abrindo galerias. As lagartas apresentam corpo esbranquiçado, com pontos escuros, cabeça de coloração amarela a marrom, três pares de pernas torácicas e cinco pares de falsas pernas abdominais e podem atingir de 25 mm a 35 mm de comprimento. Em média o desenvolvimento larval apresentam seis instares com duração total de aproximadamente 35 dias, dependendo da temperatura (Botelho & Macedo, 2002; Cruz, 2008). Após esta fase, transformam-se em pupa dentro da galeria produzida pela lagarta no colmo da planta hospedeira. A pupa é alongada e fina, de coloração marrom-claro a escuro, podendo medir de 16 mm a 20 mm de comprimento. A fase de pupa dura em média 14 dias, porém pode ser influenciada pela temperatura (Ferreira, 2002; Capinera, 2013).

Os adultos são mariposas de coloração amarelo-palha, apresentando de 18 a 28 mm de envergadura alar em machos e de 27 mm a 39 mm em fêmeas. As asas anteriores são de coloração amarelada e apresentam duas linhas transversais escuras, lembrando dois “Vs” invertidos. Estas asas em fêmeas são mais claras do que as dos machos e as asas posteriores são esbranquiçadas em ambos os sexos. Existem outras diferenças entre os sexos, sendo a fêmea maior, normalmente apresentando abdomen mais volumoso do que o do macho. Estes por sua vez, apresentam a presença de uma concentração de cerdas no último par de pernas, que é ausente nas fêmeas. São insetos de hábito noturno e as fêmeas iniciam a oviposição ao entardecer. A longevidade dos adultos é de dois a nove dias. A duração do ciclo biológico completo da broca-do-colmo varia de 53 a 60 dias, dependendo das condições climáticas (Botelho & Macedo, 2002; Pinto et al., 2006).

2.1.3 Danos e prejuízos provocados às culturas hospedeiras

O ataque da *D. saccharalis* à cana-de-açúcar ocorre durante todo o desenvolvimento da cultura, sendo bastante variável, dependendo da variedade de cana, da época do ano, do ciclo da cultura, entre outros fatores. A incidência aumenta à medida que a planta cresce, sendo mais importante na fase em que os entrenós estão formados (Botelho & Macedo, 2002).

O estágio larval é o mais prejudicial, pois as lagartas alimentam-se no interior do colmo, onde começam a causar danos que se caracterizam por abertura de galerias, falhas na germinação, morte da gema apical, tombamento dos colmos, encurtamento do entrenó, perda de peso, enraizamento aéreo e germinação das gemas laterais. Esses danos

podem ocorrer isolados ou associados (Pinto et al., 2006). Os danos indiretos estão relacionados com a entrada de microrganismos oportunistas, principalmente fungos (*Fusarium moniliforme* e/ou *Colletotrichum falcatum*) responsáveis pela podridão vermelha, que invertem a sacarose armazenada na planta, prejudicando a cristalização no processo industrial, contaminam o caldo e concorrem com as leveduras na fermentação alcoólica provocando perdas industriais (Botelho & Macedo, 2002; Polanczyk et al., 2004).

Na cultura do arroz a broca-do-colmo ocorre em baixa população e o dano pode ocorrer tanto na fase vegetativa como na reprodutiva. Inicialmente, as lagartas movimentam-se sobre as folhas do arroz e alimentam-se do parênquima. Logo após, alojam-se entre a bainha foliar e o colmo, onde provocam manchas amareladas transparentes. Quando as lagartas penetram nos colmos, alimentam-se do tecido esponjoso e destroem os pontos de crescimento, provocando a morte da sua parte central. Este dano é característico da fase vegetativa das plantas e origina o sintoma conhecido como "coração-morto". Quando ocorre durante a época de formação e emissão das panículas, ou seja, na fase reprodutiva da planta, resulta na morte da folha bandeira e esterilidade das espiguetas, origina o sintoma conhecido por "panícula-branca" que, quando puxada, desprende-se facilmente da planta (Ferreira et al., 2001).

Na cultura do sorgo, a broca-do-colmo pode ocorrer nas fases de florescimento e maturação fisiológica (Pinto et al., 2004). No milho, os períodos de ocorrência da lagarta são no final da fase do cartucho, do pendoamento e embonecamento. Na fase do cartucho, a lagarta se alimenta do colmo e danifica a espiga. Já nas duas últimas fases, a lagarta perfura a espiga, geralmente pela base, e se alimenta dos grãos e do sabugo, causando apodrecimento (Cruz, 2008).

2.2 CONCEITO DE BIÓTIPO

Em pesquisas aplicadas da Entomologia a caracterização de biótipos em insetos é um ponto de estudo com grande destaque, pois a subjetividade de tal designação reflete, muitas vezes, problemas taxonômicos. Existe uma abundância de termos equivalentes a biótipo, tais como raça biológica, raça ecológica, subespécie, espécie críptica, raça hospedeiro-especialista (*host-race*). Recentemente, o uso de técnicas moleculares para a análise do DNA permitiu uma melhor compreensão da variação intra-

específica em insetos. Assim, muitas das caracterizações de biótipos passaram a ser entendidas como parte do processo de especiação (Bellows et al., 1994).

Diehl & Bush (1984) propõem que o termo biótipo deve ser considerado como denominação genérica englobando vários casos de diferenciação entre populações. Para estes autores existem cinco categorias de biótipo: 1. Polifenismos não genéticos, 2. Variação polimórfica ou poligênica intra-populacional, 3. Raças geográficas, 4. Raças hospedeiro-especialistas e, 5. Espécies. A última categoria é incluída como biótipo nas situações em que os taxonomistas ainda não reconhecem a categoria de nova espécie da forma variante. Os demais casos se referem apenas a variações intra-específicas. Os polifenismos ocorrem quando um mesmo genótipo produz diferentes fenótipos sob efeito de alguma condição ambiental. Padrões de coloração exibidos conforme época do ano e a presença ou a ausência de asas (como no caso dos afídeos) são exemplos de polifenismos. Os polimorfismos consistem de fenótipos distintos em uma população livre para inter cruzar, sendo que a frequência do fenótipo mais raro seja tal que não possa ser mantida por mutação recorrente, excedendo uma frequência de 1%. Já as raças geográficas, sinonímia de subespécie, são formas variantes delimitadas geograficamente e que apresentam certo nível de isolamento reprodutivo (Futuyma & Peterson, 1985).

A categoria de biótipo que necessita de uma cuidadosa definição e observação mais detalhada de sua ocorrência é a da raça hospedeiro-especialista pelo seu papel central na evolução e especiação de organismos parasíticos e pela importância que têm na atividade agrícola (Diehl & Bush 1984).

2.3 CONCEITO DE RAÇA HOSPEDEIRO-ESPECIALISTA

A primeira definição especialmente direcionada à raça hospedeiro-especialista foi proposta por Bush (1969), que a definiu como populações que demonstram preferência por um hospedeiro que é diferente dos hospedeiros preferenciais de outras populações da mesma espécie. Raças hospedeiro-especialistas representam uma variação contínua entre formas que cruzam livremente para aquelas que raramente trocam genes. O conceito mais amplamente citado para raça hospedeiro-especialista é o de Diehl & Bush (1984), que a define como uma população parcialmente isolada de outras populações de mesma espécie em consequência da adaptação ao hospedeiro.

O surgimento de raças hospedeiro-especialistas é explicado por Futuyma & Peterson (1985) pela diferenciação genética das populações em consequência da combinação da seleção natural, fluxo gênico e deriva genética. Em diferentes microambientes, recursos alimentares ou nichos, a seleção natural favorece um ou mais alelos, aumentando sua frequência, o que promove a melhor adaptação ao recurso. A principal causa da manutenção das diferenças genéticas é o balanço do fluxo gênico entre populações simpátricas (ocorrentes em uma mesma área). Há um menor fluxo genético entre as populações que usam recursos alimentares diferentes do que entre populações que usam o mesmo recurso alimentar. Portanto, raça hospedeiro-especialista é considerada como uma divisão infraespecífica na Biologia Evolutiva.

2.3.1 Critérios para detecção de raças hospedeiro-especialista

Para Drès & Mallet (2002) há quatro critérios simples de detecção de raças hospedeiro-especialistas: 1. Fidelidade ao hospedeiro; 2. Simpatia; 3. Diferenciação genética, 4. Existência de fluxo gênico entre as populações. O surgimento de raças hospedeiro-especialistas coaduna com a hipótese da especiação simpátrica (Berlocher & Feder, 2002), ou seja, a teoria que estabelece que novas espécies podem surgir sem a necessidade de uma barreira física entre indivíduos de uma população.

Um estudo de caso, no qual há uma razoável experimentação que leva em conta os critérios de estabelecimento de raças hospedeiro-especialistas (Bush, 1992), possibilitou a Drès & Mallet (2002) a definição de quatro situações de variação: 1. Polimorfismo, 2. Raça hospedeiro-especialista provável, 3. Raça hospedeiro-especialista típica, 4. Espécie críptica. Na primeira situação, estão os casos em que a divergência genética entre as populações que ocupam diferentes hospedeiros é insignificante ou inexistente.

Em muitos casos, os testes de preferência e de parâmetros biológicos para a avaliação da adaptação ao hospedeiro não indicam diferenças entre as populações. Na situação de prováveis raças hospedeiro-especialistas, os casos têm em comum a associação de algumas frequências de alelos com o hospedeiro. No entanto, faltam informações consistentes sobre hibridação inter-racial e sobre os valores de fluxo gênico na natureza (Bush, 1992).

2.4 OCORRÊNCIA E IMPORTÂNCIA DE BIÓTIPOS DE INSETOS NA AGRICULTURA

A categoria mais comum de biótipos na agricultura é a das variações polimórficas oriundas da seleção imposta por inseticidas ou por diferentes genótipos de plantas cultivadas. Como exemplo, *Mayetola destructor* (Say, 1817) (Diptera: Cecidomyiidae), a “mosca-hessiana”, apresenta dez biótipos definidos por diferenças na capacidade de danificar (virulência) e sobreviver em diferentes cultivares de trigo (Diehl & Bush, 1984).

Há casos em que a ocorrência de biótipos de pragas agrícolas não é consequência da seleção causada pelos métodos de controle. São típicos problemas de indefinição taxonômica. Como exemplo, a cigarrinha *Nilaparvata lugens* (Stål, 1854) (Hemiptera: Delphacidae), praga do arroz na Ásia, foi relatada na revisão de Diehl & Bush (1984) como um caso de variação polimórfica. Entretanto, para Drès & Mallet (2002), a variação polimórfica nesta espécie existe apenas entre os biótipos ocorrentes em arroz. Demonstrou-se que as populações de *N. lugens* (Stål, 1854) de gramíneas silvestres constituem outra espécie (críptica), pois não se cruzam com aquelas de arroz (Claridge, 1995). Isolamento reprodutivo também foi encontrado entre populações de *S. frugiperda* (J. E. Smith, 1797) de milho e arroz (Pashley et al., 1992). Na mosca-branca *Bemisia tabaci* (Gennadius, 1889) (Hemiptera: Aleyrodidae), o biótipo B foi elevado à categoria de espécie, denominada *B. argentifolii* (Bellows et al., 1994). Martinez et al. (2000) demonstraram que as populações de *B. tabaci* que colonizam mandioca são distintas geneticamente das populações dos biótipos A e B em simpatria, o que levou os autores a postularem a existência de um biótipo ainda não-descrito. Abdullahi et al. (2004) afirmam que, na África, as populações de *B. tabaci* (Gennadius, 1889) em mandioca também são geneticamente muito distintas das populações oriundas de outros hospedeiros.

A relação entre planta hospedeira e distribuição espacial de biótipos também tem sido alvo de estudos. Em *Ostrinia nubilalis* (Hübner, 1796) (Lepidoptera: Pyralidae) a broca européia-do-milho, foram descritas formas variantes associadas à distribuição geográfica. Estas formas apresentam diferenças morfométricas e ecológicas que, aparentemente, seriam classificadas como polifenismo (Diehl & Bush, 1984). Entretanto, Bourguet et al. (2000), empregando marcadores moleculares baseados em sequências microsatélites de DNA, encontraram um menor fluxo gênico entre populações de milho

com populações de outros hospedeiros selvagens, em um mesmo local. Esse fato é contrastante com o maior fluxo gênico encontrado entre populações de diferentes localidades que utilizam o milho como hospedeiro, sugerindo uma diferenciação causada pela planta. Em outros casos, a variação na utilização do hospedeiro pode ser consequência de uma grande distribuição geográfica, como a que ocorre com o besouro-da-batata-colorado, *Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae). Esse inseto utiliza mais frequentemente uma determinada espécie de planta em uma região em razão de sua maior abundância e não pela adaptação preferencial (Diehl & Bush, 1984).

2.5 DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES

Uma população, do ponto de vista genético, é definida como um conjunto de indivíduos de uma mesma espécie que compartilham o mesmo conjunto gênico através da reprodução. Se a reprodução for sexuada não é esperado que dois indivíduos possuam o mesmo genótipo para todos os locos. Assim, torna-se importante descrever como os alelos estão organizados para determinar se os mesmos estão distribuídos aleatoriamente. A diversidade genética, na forma de alelos múltiplos para vários locos, existe na maioria das populações naturais, porém, vários fenômenos podem mascarar a segregação dos genótipos (Hartl & Clark, 2010).

De acordo com o princípio de Hardy-Weinberg, as populações são infinitamente grandes e panmíticas, ao longo do tempo em que a frequência dos alelos não muda de uma geração para outra e considera que a única mudança na composição genética da população é a redistribuição dos genótipos em frequências que serão mantidas em todas as gerações subsequentes atingindo um equilíbrio. Tal fundamentação ainda propõe que as diferenças encontradas entre a população “ideal” (em equilíbrio) e a população real (em estudo) seriam os ingredientes da evolução e que o desvio do equilíbrio pode ser demonstrado pelo cálculo do número de heterozigotos esperados para uma população (Futuyama, 2002; Beiguelman, 2008).

A heterozigose pode ser interpretada como uma medida da diversidade genética. Quando há excesso de homozigotos na população, a heterozigose observada (H_O) na população é menor do que o valor esperado (H_E). Esse déficit de heterozigotos em populações diplóides pode ser causado por diversos fatores (Hartl & Clark, 2010). Uma das causas do déficit de heterozigotos é a endogamia onde um indivíduo é homozigoto para

um determinado loco por haver herdado duas cópias idênticas de um alelo por ancestralidade devido ao cruzamento entre aparentados. Outra causa é a deriva genética que ocorre quando populações são isoladas em pequenos grupos e pode levar à fixação ou eliminação de alelos por variação aleatória das suas frequências ao longo das gerações, independentemente do valor adaptativo dos alelos (Hartl & Clark, 2010).

Outros fatores causadores de baixa heterozigose são o efeito fundador e o efeito gargalo. Sob essas condições as frequências alélicas dos fundadores ou sobreviventes nem sempre correspondem às da população original. Assim, a população se expande a partir de um número limitado de indivíduos e pode mostrar composição genética diferente daquela exibida pela população original e, além disso, os indivíduos de uma população podem passar por pontos de estrangulamento apenas de curta duração que são seguidos por expansões rápido da população (Tsutsui et al., 2000; Allendorf & Lundquist, 2003). Destaca-se ainda o efeito Wahlund que mede o grau de subdivisão da população como um todo e tende a reduzir a frequência de homozigotos, em que o fluxo gênico é restrito resultante dos cruzamentos parcialmente aleatórios (Futuyama, 2002).

O comportamento da distribuição da variabilidade genética caracteriza a estrutura genética de uma população e é normalmente utilizada para descrever variações herdáveis encontradas dentro de entidades biológicas e pode ser mensurada em indivíduos, populações e espécies. Em um loco particular, a diversidade pode estar presente dentro de indivíduos, ou seja, encontram-se indivíduos com locos homozigotos e heterozigotos. Ela pode estar presente dentro da população, sendo observada quando os alelos presentes em um loco variável são encontrados em indivíduos diferentes, ou dentro das espécies, o que se verifica observando a variação nas frequências alélicas entre populações (Lowe et al., 2005).

O estudo da estrutura genética das populações é um componente importante de programas de manejo e controle de pragas, pois pode fornecer informações sobre níveis de variabilidade genética, graus de diferenciação entre as populações e padrões de fluxo gênico. Além disso, possibilita o monitoramento das mudanças na frequência de genes específicos, já que as espécies raramente são constituídas por populações únicas e panmíticas (com acasalamento totalmente ao acaso) (Machado & Fiuza, 2010).

Os estudos de estrutura genética podem esclarecer a distribuição dos genótipos em uma determinada região, o que permite inferir taxas migratórias ou de fluxo gênico e variações genéticas decorrentes de seleção, mutação ou deriva genética. Também

possibilita, nos estudos de ecologia, um melhor entendimento das inter-relações entre inimigos naturais e artrópodes-praga, sejam parasitoides, predadores, simbiontes ou organismos entomopatogênicos. Para estes últimos tipos de organismos existem indicações de que a partição da variabilidade genética de espécies do fungo *Nomuraea rileyi* está relacionada com as espécies do inseto hospedeiro (Suwannakut et al., 2005; Sosa-Gómez et al., 2012). Em populações de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) um importante inseto-praga na cultura do milho, alguns estudos mostraram que a diversidade genética está dentro das populações e não entre as populações de diferentes áreas e culturas, porém existe um baixo fluxo gênico entre estas populações, sendo necessária maior atenção nas práticas de manejo desta espécie associada a diferentes plantas hospedeiras, como arroz e algodão, ao longo da área de distribuição da praga (Martinelli et al., 2006; Clark et al., 2007; Salinas-Hernandez & Saldamando- Benjumea, 2011).

Em populações de insetos-praga a evolução da resistência é fortemente influenciada pela estrutura populacional das espécies devido a aplicação de medidas de fitoproteção, tais como inseticidas e culturas transgênicas, e mudanças na paisagem agrícola. A heterogeneidade da paisagem pode produzir barreiras para a dispersão e fluxo gênico de insetos especialistas, que por sua vez podem ocupar áreas de espécies não cultivadas favorecendo a formação de subpopulações estruturadas nestas áreas. Já com as práticas de fitoproteção pode ocorrer a seleção de genes que conferem resistência à inseticidas dificultando o manejo de espécies que se alojam em área de refúgio (Fuentes-Contreras et al., 2008; Agunbiade et al., 2014; Fuentes-Contreras et al., 2014).

A diversidade genética e estrutura populacional são aspectos importantes da genética populacional de insetos agrícolas. Estudos comparativos destes aspectos podem, portanto, ajudar a elucidar os fatores que afetam seus níveis populacionais, tais como as alterações climáticas, os fatores ambientais e ecológicos, barreiras naturais, as atividades humanas, migração e fluxo gênico, e que esses fatores, muitas vezes, agem em conjunto sobre uma população de inseto (Duan et al., 2013).

Portanto, a diversidade genética é considerada uma condição básica para a população manter sua aptidão reprodutiva, reagir a mudanças ambientais e garantir a sobrevivência em longo prazo, ou seja, as adaptações às mudanças do agroecossistema só são possíveis devido à diversidade genética encontrada dentro de uma população (Brook et al., 2002).

2.6 ESTUDOS DE POPULAÇÕES DE INSETOS COM MARCADORES MOLECULARES

Os marcadores moleculares são fragmentos de DNA que podem ser todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, correspondente a regiões expressas ou não do genoma, ou seja, são características de DNA que diferenciam dois ou mais indivíduos e são herdadas geneticamente (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Isto é devido à variação genética natural e a existência de várias sequências de DNA polimórficas entre os indivíduos. Os marcadores moleculares procuram explorar esta variação para identificação com base entre os indivíduos (Buso, 2006). Sendo assim, eles apresentam vantagens sobre os marcadores morfológicos por exibirem maior grau de polimorfismo e serem, geralmente, neutros (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

As técnicas moleculares descritas são diversas e podem ser utilizadas em estudos de populações de insetos com objetivos diferentes (Thyssen et al., 2005; Behura, 2006; Fakrudin et al., 2006; Jain et al. 2010; Sanchez et al., 2013; Huber et al., 2014; Murty et al., 2014). Porém, a escolha da técnica apropriada é vital para o sucesso da aplicação da biologia molecular em estudos de populações. É um erro surpreendentemente comum o uso apenas de técnicas que estão disponíveis em um laboratório, em vez de escolher o conjunto de marcadores genéticos que melhor responde a pergunta e, em seguida, a obtenção dos dados (Sunnucks, 2000). Também deve ser analisada a disponibilidade de recursos humanos e bens de consumo e a experiência da equipe para a condução do trabalho no laboratório (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os tipos de marcadores moleculares atualmente disponíveis diferem-se quanto à forma de revelar a variabilidade em nível de DNA. Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de fragmentos do DNA via PCR. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles revelados por amplificação incluem RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SSR (*Single Sequence Repeats*), dentre outros (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

O primeiro grupo de marcador molecular desenvolvido na década de 1980 foi o RFLP que quando clivado com enzimas de restrição, expressa, por eletroforese, as

diferenças de comprimento de fragmentos de DNA, observadas por meio da hibridização desses fragmentos com sequências homólogas do DNA marcado com radioatividade ou por luminescência. A variabilidade dos marcadores moleculares do tipo RFLP pode ser causada por mudanças de pares de bases, rearranjo de DNA, inserção e/ou deleção ou diversidade natural na sequência de nucleotídeos entre ou dentro de populações. Possibilitam a identificação de maior número de locos polimórficos e, por conseguinte, foram a primeira ferramenta eficaz para a seleção assistida por marcadores. A principal limitação da técnica é o uso intensivo da mão-de-obra e o tempo necessário para a análise genômica. Os RFLPs apresentam expressão codominante, e, por cobrirem todo o genoma, a probabilidade de associação de marcadores com genes de características agronômicas importantes é grandemente aumentada (Powell et al., 1996).

O marcador molecular do tipo RAPD foi desenvolvido em 1990 por Williams e colaboradores e Welsh & McClelland nos Estados Unidos. É uma técnica que oferece a oportunidade de gerar grande quantidade de polimorfismo de fragmentos de DNA, espalhados por todo o genoma, usando *primers* escolhidos ao acaso, nas reações de amplificação. A grande vantagem da técnica de marcadores RAPD está, sem dúvida, na sua capacidade de detectar polimorfismo de modo simples e rápido, permitindo assim o seu uso como *fingerprinting*, distinguindo divergências mínimas entre espécies ou clones ou dentro destes (Lopes et al., 2002). Já as desvantagens relacionam-se à reprodutibilidade dos resultados, ambiguidade na interpretação das bandas, comigração de fragmentos de igual ou tamanho muito próximo e ao caráter dominante da maioria dos marcadores obtidos (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os marcadores moleculares AFLP, desenvolvidos em 1995, combinam as vantagens das técnicas RFLP e RAPD. A técnica dos AFLP consiste primeiramente na clivagem do DNA genômico do indivíduo usando duas enzimas de restrição, seguida do emprego de adaptadores específicos, que são ligados aos terminais dos fragmentos de DNA que foram clivados. Após, são feitas as amplificações via PCR dos fragmentos do DNA. Por último, é realizada eletroforese em gel de alta resolução para visualização dos fragmentos gerados. A vantagem desses marcadores moleculares é o grande número de fragmentos que são gerados e detectados em único gel, fazendo com que, apesar de ser um marcador dominante, sejam capazes de analisar o maior número de locos em um único gel em relação aos outros marcadores (Bleas et al., 1998; Behura, 2006).

Os marcadores SSR ou microssatélites consistem de pequenas sequências com um a cinco pares de base que se repetem em série em número variável e são os mais polimórficos. Este polimorfismo tem consequências importantes, como a geração de alelos polimórficos que podem ser utilizados em estudos genéticos populacionais, em sistemática e no mapeamento genômico. Geralmente, os microssatélites identificam um único loco no genoma e, por sua alta taxa de mutação, são frequentemente multialélicos, além de segregarem de modo codominante (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Os microssatélites são os marcadores mais utilizados em estudos de populações de várias espécies de insetos (Palo et al., 1995).

2.6.1 Aplicações de marcadores microssatélites para estudo de populações de insetos

Marcadores microssatélites, também chamado de sequencias repetitivas simples (SSR), são marcadores genéticos altamente polimórficos e abundantes que existem ao longo de todos os genomas eucarióticos (Schlötterer, 2000). Além de suas primeiras aplicações em estudos de mapeamento do genoma e testes de paternidade, os chamados microssatélites ainda são os mais poderosos marcadores moleculares disponíveis em ecologia molecular e estudos evolutivos. Características como alta variabilidade, facilidade e confiabilidade de reprodução e herança codominante podem tornar a sua utilização generalizada entre os geneticistas de populações de insetos e ecologistas para diversas espécies (Fuentes-Contreras et al., 2008; Meng et al., 2008; Lagisz et al., 2010; Muturi et al. 2010; Yang et al., 2012; Domingues et al., 2012; Fuentes-Contreras et al., 2014; Lopes et al., 2014). Porém, a grande limitação do uso em larga escala de marcadores microssatélites é a obtenção dos iniciadores específicos, pois até recentemente essa técnica requeria trabalho intenso no desenvolvimento e o custo inicial era muito elevado (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Com o uso de marcadores microssatélites e DNA mitocondrial (Citocromo oxidase subunidade I), Karsten e colaboradores (2013) demonstraram que populações de *Ceratitis capitata* (Weidemann) (Diptera: Tephritidae) na África do Sul são geralmente caracterizadas pelo alto nível de diversidade genética e limitada diferenciação populacional em uma escala espacial. E que provavelmente, possa estar ocorrendo fluxo gênico no país devido à ação antropogênica, já que a espécie tem baixa capacidade de dispersão (10 km). Com o uso destas técnicas moleculares, os autores puderam entender como estas

populações de moscas-das-frutas estavam estruturadas e sugerir a utilização de algumas práticas de manejo para todo o país, como a técnica de macho estéril, já que todas as áreas produtoras de frutos correm o risco de serem invadidas por este inseto.

Devido a recente invasão nos Estados Unidos, o pulgão da soja *Aphis glycines* Matsumura (Hemiptera: Aphididae) se tornou o mais importante inseto-praga desta cultura. Com o objetivo de avaliar o nível de diversidade genética e diferenciação populacional entre pulgões coletados nos Estados Unidos, Coreia do Sul e Japão, Jun e colaboradores (2013) utilizaram 18 locos microssatélites e observaram que o nível de diferenciação dentro e entre cada população do mesmo país foi limitado. Tal resultado permitiu identificar que os pulgões vieram de uma fonte em comum, colonizando diferentes Estados da região Centro-Norte americana e que eles pertenciam a um mesmo ancestral comum dos países asiáticos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras de lagartas da broca-da-cana *D. saccharalis* foram coletadas em lavouras de arroz e cana-de-açúcar em diferentes áreas de cultivo durante a safra 2012/2013 (Tabela 1; Figura 1 e Anexo A). Após a coleta, os insetos foram mantidos dentro dos respectivos colmos das plantas hospedeiras, as quais foram acondicionadas em recipientes ou sacos plásticos, sendo posteriormente, encaminhadas ao Laboratório de Entomologia da Embrapa Arroz e Feijão onde foram imediatamente congeladas em freezer -80°C para posterior isolamento do DNA genômico.

Tabela 1. Áreas e cultivares/variedades amostradas durante a coleta de indivíduos de *D. saccharalis* na cultura do arroz e cana-de-açúcar.

Estado	Município	Cultivar/Variedade	N*	Coordenadas geográficas
Arroz				
Mato Grosso	Canarana (Ca)	BRS Sertaneja	14	S 13°14'24,6" W 52°20'06,0"
	Santa Carmen (SC)	BRS Sertaneja	28	S 12°04'40,0" W 55°21'59,0"
Mato Grosso do Sul	Maracajú (Ma)	BRS Sinuelo	18	S 21°54'4,42" W 55°54'39,79"
Rio Grande do Sul	Pelotas (Pt)	BRS Firmeza	16	S 31°40'49,2" W 52°26'21,9"
	Itaqui (It)	BRS Irga 411	11	S 29°08'31,8" W 56°33'54,6"
Goiás	Santo Antônio (SA)	BRS Pepita	30	S 16°30'11,7" W 49°16'53,8"
	Santa Rosa (SR)	BRS Sertaneja	32	S 16°05'15,4" W 49°29'24,3"
	Flores (Fl)	BRS Tropical	30	S 14°35'09,9" W 47°00'23,4"
	Orizona (Oz)	BRS Sertaneja	30	S 17°02'19,7" W 48°29'39,1"
	Morrinhos (Mo)	BRS Sertaneja	30	S 17°35'03,4" W 49°00'12,6"
	Santa Isabel (SI)	BRS Sertaneja	19	S 15°20'51,5" W 49°23'14,2"
Tocantins	Formoso do Araguaia (FA)	Irga 424 Epagri 115	24	S 11°56'00,1" W 49°41'48,0"
Cana-de-açúcar				
Goiás	Aporé (Ap)	SP 801842	30	S 18°55'18,5" W 51°54'23,6"
	Goianésia (Gn)	SP 942101	24	S 15°13'25,3" W 48°57'37,3"
	Goiatuba (Gb)	SP 801816	28	S 18°02'48,4" W 49°40'05,8"
	Inhumas (In)	-	30	S 16°21'35,3"W 49°31'7,69"
	Anicuns (An)	CTC 16	32	S 16°25'58,4" W 49°54'46,3"

N* corresponde ao número de lagartas analisadas.

As áreas visitadas para a cultura do arroz foram representadas por lavouras comunitárias, propriedades particulares e campos experimentais de empresas públicas em

diferentes regiões orizícolas das regiões Centro-Oeste, Norte e Sul do Brasil. Para a cana-de-açúcar, priorizaram-se as áreas de cultivo próximas às regiões de cultivo de arroz no Estado de Goiás. As distâncias geográficas entre cada região amostrada podem ser visualizadas no Anexo B.

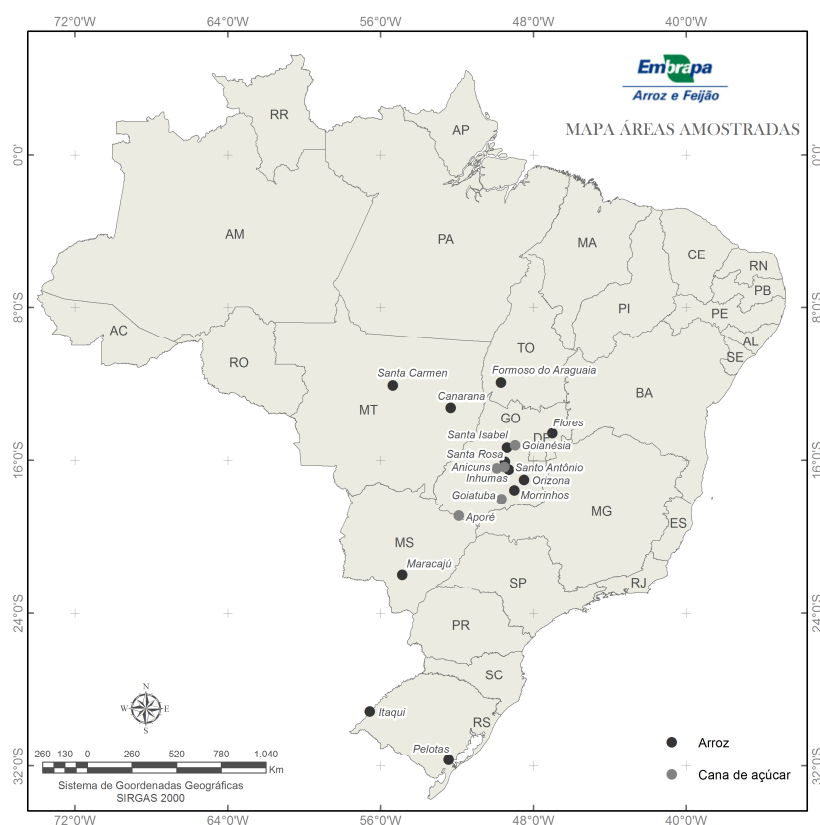


Figura 1. Distribuição dos pontos onde foram coletadas as diferentes populações de *D. saccharalis*.

3.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Para cada indivíduo amostrado retirou-se a cápsula cefálica e a parte remanescente foi acondicionada em microtubos Eppendorf de 1,5 mL e macerada com a utilização de nitrogênio líquido. O DNA genômico das amostras de lagartas de *D. saccharalis* foi obtido utilizando-se kit de extração de DNA da Norgen® (Biotek Corporation, Thorold, ON, CAN). Para a extração de DNA seguiu-se o protocolo descrito pelo fabricante.

Para determinar a concentração do DNA de cada amostra utilizou-se uma alíquota de 6 µL das amostras armazenadas em freezer à -20°C. As alíquotas de DNA foram aplicadas em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio e submetidas à eletroforese em cuba horizontal contendo solução salina TBE 1X (0.09M Tris Borato e 2mM EDTA) por 25 minutos a 80 Volts. A concentração de DNA de cada amostra foi registrada em sistema de fotodocumentação Eagle Eye e comparações visuais com o DNA-padrão do fago γ (lambda), nas concentrações 50 ng, 100 ng, 200 ng e 400 ng foram utilizadas para se determinar a concentração de DNA. Em seguida, ajustou-se a concentração das amostras quantificadas para 10 ng/µL com o uso de água estéril.

3.3 ANÁLISE MOLECULAR POR MARCADORES SSR

Para a análise molecular das populações de *D. saccharalis* foi utilizado um conjunto composto por oito marcadores microssatélites previamente desenvolvidos e publicados na literatura (Pavinato et al., 2013b). Para o presente estudo, as temperaturas de anelamento foram testadas para se determinar as melhores condições de amplificação (Tabela 2).

Tabela 2. Características dos oito marcadores microssatélites utilizados no estudo genético de populações da broca-da-cana *D. saccharalis* (Fabr.).

Locus	Sequencia 5'-3- dos primer	Ta (°C)	Faixa de tamanho esperado (bp)
Dsc1	F: CGAGGCTATATTTGCGTGTG R: GATGATGGAGTTGGAAGGTGA	56	160-200
Dsc3	F: CCATCAAGCTCCTTCTAAGAGAC R: CCTTGCTCAGTTACCATTCG	56	228-274
Dsc7	F: TGTCGAGCTACTCCATGCTT R: TGAGACTGAACACTGGCAAGA	56	200-250
Dsc9	F: AACCTTCGATGAGCTACTGC R: TGTGGTGATTTGTTTGCTTG	56	150-200
Dsc10	F: GGTCCGCGTTTGTTATTGTT R: TCAAGTGCTCCTTAAAACACGA	56	220-300
Dsc11	F: ATACGGCTTCATTTCGCTTC R: GGTTTCGCACTCATCACG	54	200-250
Dsc13	F: CGTGGACTAACCCATAGAAGAT R: GGTTTAGCAGAACTTGGCATA	54	200-310
Dsc20	F: TTGGCAGAGTTGTGGGTAAC R: ACAGCAGCATCATCAGAAAGG	56	210-280

F (Forward); R (Reverse); Ta: temperatura de anelamento.

As reações de PCR seguiram o seguinte padrão de amplificação para um volume final de 5 µL: 2,5 µL de Master Mix; 0,5 µL de Q solution; 0,75 µL a 0,85 µL de

água RNase free (Kit comercial Qiagen® Multiplex PCR); 0,05 a 0,1 µL dos *primers* SSR nas concentrações de 10 µM para cada conjunto de marcadores (Anexo C) e 1,0 µL de DNA (10 ng/ µL). As reações de PCR foram realizadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (*Applied Biosystems*) e as condições de amplificações seguiram a seguinte programação: uma etapa de 95°C/15 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C/30 segundos, 56°C/90 segundos e 72°C/90 segundos e uma etapa final de 72°C por dez minutos.

Os produtos amplificados foram diluídos para se melhorar o padrão de amplificação para a detecção semi-automatizada. Utilizou-se a razão de 5 µL de produto amplificado para 60 µL de água estéril e desta diluição 5 µL foi adicionado em 9,42 µL de Formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*) e 0,08 µL do padrão GeneScan™ 500 Rox™ Size Standard (*Life Biosystems*), um marcador de peso molecular de 500 pb marcado com fluoróforo vermelho.

Os padrões de alelos para cada marcador microssatélite foram identificados através do software *GeneMapper*® versão 4.1 (*Life Biosystems*). Por meio deste programa foi realizado a genotipagem de cada indivíduo em suas respectivas populações. Após este procedimento, uma planilha no programa Microsoft Excel® foi gerada com os alelos e genótipos encontrados para os indivíduos de *D. saccharalis* nas 17 populações estudadas.

3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As estatísticas descritivas dos marcadores em cada população foram estimadas utilizando-se o programa *MStools* (Park, 2001). Foram calculadas a heterozigosidade observada (H_O), que informa sobre o número total de heterozigotos contados nas populações, a heterozigosidade esperada (H_E), que informa a quantidade de heterozigotos esperados na população pelo EHW (Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*) considerando a frequência observada dos alelos, número de alelos por loco (A) e suas frequências e o conteúdo de informação polimórfica (PIC - *Polymorphism Information Content*). A riqueza alélica foi estimada através do programa *Fstat* versão 2.9.3.2 (Goudet, 2002).

As frequências alélicas dos locos foram submetidas a um teste de aderência (teste exato de Fisher) para se verificar desvios às proporções de EHW. Desequilíbrio de ligação entre os locos dentro das populações foram feitos utilizando o programa *Genepop* versão 4.0 (Rousset, 2008). O teste exato de Fisher foi usado para estimar o valor exato de p , considerando-se um valor de α a 95% de probabilidade ($\alpha = 0,05$), e o valor de

significância foi ajustado pela correção sequencial de Bonferroni (Rice, 1989). O cálculo das frequências de alelos nulos foi realizado através do software *FREENA* (Chapuis & Estoup, 2007).

Com o auxílio do programa *Genepop* 4.0 (Rousset, 2008), foi desenvolvida uma análise de isolamento por distância pelo teste de Mantel (Mantel, 1967) a partir de uma matriz composta pela distância geográfica e pela distância genética entre as populações, verificando assim a correlação entre elas. Os valores de F_{ST} foram transformados em $F_{ST}/(1 - F_{ST})$ e plotados contra as distâncias geográficas, nas quais estas matrizes foram permutadas 1.000 vezes.

O programa *Phylip* versão 3.6 (Felsenstein, 1989) foi utilizado para a construção do dendrograma a partir da matriz de dissimilaridade genética baseada na distância genética de Cavalli-Sforza & Edwards (1967) e o método de agrupamento utilizado foi *Neighbor-joining*, com confiabilidade dos ramos avaliada por *bootstrapping* (1000 amostragens). O dendrograma foi visualizado no programa *Treeview* (Page, 1996).

A estrutura populacional foi inferida no programa *Structure* versão 2.2 (Falush et al., 2007). Dez simulações independentes foram realizadas para cada número de agrupamento (K) que variou de um a dez. Em cada simulação, foram realizadas 500.000 interações com um descarte inicial (*burn-in*) de 50.000 interações. Para estimar o valor de K que melhor se ajusta aos dados, foi usado o ΔK de Evanno e colaboradores (2005).

4 RESULTADOS

Foram determinados os genótipos de 426 indivíduos pertencentes a 17 populações de *D. saccharalis* oriundas das regiões produtoras de arroz e cana-de-açúcar, em relação a oito locos microssatélites, o que perfaz um total de 3.393 “data points”.

No total, foram encontrados 127 alelos distribuídos entre os oito locos nas 17 populações. Os locos foram polimórficos, variando de 6 a 32 alelos, com média de 15,87 (Tabela 3). Os locos Dsc 07, Dsc 11 e Dsc 20 foram os que apresentaram menor variabilidade, enquanto os locos Dsc 03 e 13 apresentaram as maiores variabilidades (Tabela 3). A média de heterozigosidade observada (H_O) para os oito locos foi 0,350, variando de 0,130 (loco Dsc 20) a 0,570 (loco Dsc 13). A média da heterozigosidade esperada (H_E) foi de 0,579, variando de 0,287 (loco Dsc 20) a 0,797 (loco Dsc 13) e o PIC por loco apresentou média de 0,523 (Tabela 3).

Tabela 3. Estimativas do número total de alelos (A_T), heterozigosidade observada ($H_O \pm SE$), heterozigosidade esperada ($H_E \pm SE$) e conteúdo de informação polimórfica ($PIC \pm SE$) para os locos microssatélites utilizados para o estudo populacional de *D saccharalis*.

Loco	A_T	$H_O \pm SE$	$H_E \pm SE$	$PIC \pm SE$
Dsc 01	15	$0,395 \pm 0,035$	$0,621 \pm 0,025$	$0,536 \pm 0,028$
Dsc 09	22	$0,279 \pm 0,030$	$0,759 \pm 0,020$	$0,709 \pm 0,023$
Dsc 10	10	$0,146 \pm 0,029$	$0,316 \pm 0,044$	$0,284 \pm 0,038$
Dsc 20	08	$0,130 \pm 0,021$	$0,287 \pm 0,029$	$0,250 \pm 0,025$
Dsc 03	26	$0,317 \pm 0,037$	$0,733 \pm 0,025$	$0,683 \pm 0,026$
Dsc 07	06	$0,548 \pm 0,037$	$0,541 \pm 0,029$	$0,464 \pm 0,027$
Dsc 11	08	$0,424 \pm 0,048$	$0,622 \pm 0,023$	$0,564 \pm 0,021$
Dsc 13	32	$0,570 \pm 0,036$	$0,797 \pm 0,016$	$0,752 \pm 0,018$
Média	15,87	0,350	0,579	0,523

Um menor número de alelos (35) foi encontrado na população Morrinhos (Mo), em contraposição à população de Formoso do Araguaia (FA) que apresentou o maior número (62) (Tabela 4). Da mesma forma, o maior e o menor número médio de alelos por locos (A) foram observados nestas populações (7,75 e 4,38 respectivamente). A população oriunda de Formoso do Araguaia apresentou o maior valor médio para a riqueza alélica

(6,282). Em todas as populações a heterozigosidade observada (H_O) foi menor do que esperada (H_E). Os índices de fixação intrapopulacional (f) estimados para cada população através das heterozigosidades (H_O e H_E), apresentaram valores positivos e significativamente diferentes de zero com valor médio de 0,403, com variação de 0,253 a 0,570 (Tabela 4).

Tabela 4. Estimativas do número total de alelos (A_T), número médio de alelos por loco (A), da riqueza alélica (A_r), das heterozigosidades observada ($H_O \pm SE$) e esperada ($H_E \pm SE$), o conteúdo de informação polimórfica ($PIC \pm SE$) e índice de fixação intrapopulacional (f) da espécie para as dezessete populações de *D. saccharalis*.

População	A_T	A	A_r	$H_O \pm SE$	$H_E \pm SE$	F
An	55	6,88	4,795	$0,348 \pm 0,03$	$0,596 \pm 0,08$	0,419
Ap	53	6,63	5,246	$0,424 \pm 0,03$	$0,647 \pm 0,07$	0,349
Ca	42	5,25	4,958	$0,298 \pm 0,04$	$0,553 \pm 0,12$	0,471
Fl	45	5,63	4,510	$0,399 \pm 0,03$	$0,602 \pm 0,05$	0,340
FA	62	7,75	6,282	$0,271 \pm 0,03$	$0,622 \pm 0,09$	0,569
Gb	48	6,00	4,969	$0,370 \pm 0,03$	$0,629 \pm 0,07$	0,416
Gn	49	6,13	4,786	$0,367 \pm 0,03$	$0,601 \pm 0,05$	0,401
In	46	5,75	4,352	$0,337 \pm 0,03$	$0,553 \pm 0,07$	0,393
It	38	4,75	4,750	$0,425 \pm 0,05$	$0,630 \pm 0,07$	0,337
Ma	46	5,75	5,080	$0,359 \pm 0,04$	$0,648 \pm 0,05$	0,453
Mo	35	4,38	3,719	$0,378 \pm 0,03$	$0,503 \pm 0,07$	0,252
Oz	38	4,75	3,925	$0,363 \pm 0,03$	$0,568 \pm 0,05$	0,365
Pt	44	5,50	5,053	$0,292 \pm 0,04$	$0,586 \pm 0,09$	0,509
SA	43	5,38	4,160	$0,336 \pm 0,03$	$0,552 \pm 0,07$	0,395
SC	48	6,00	4,565	$0,304 \pm 0,03$	$0,551 \pm 0,08$	0,479
SI	38	4,75	4,065	$0,304 \pm 0,03$	$0,513 \pm 0,08$	0,414
SR	38	4,75	3,701	$0,392 \pm 0,03$	$0,546 \pm 0,07$	0,285
Média		5,65		0,3511	0,5846	0,403

Todas as populações possuem pelo menos um alelo em comum em todos os locos, sendo que 77,95% do total de alelos (127 alelos) são compartilhados entre as 17 populações. Somente a população de Canarana apresentou um loco monomórfico (Dsc 10) (Tabela 5).

Tabela 5. Frequências alélicas dos oito locos microssatélite para as populações de *D. saccharalis*.

	Alelo	An	Ap	Ca	Fl	FA	Gn	Gb	In	It	Ma	Mo	Oz	Pt	SA	SC	SI	SR
Dsc 01	146									9,1				25,0				
	150													18,8				
	154									4,5					6,7			
	156															3,6		
	160						6,3										5,3	
	162	42,2	55,0	50,0	45,0	22,7	33,3	50	43,3	50,0	44,4	53,3	51,7	28,1	31,7	76,8	50,0	29,7
	166	1,6	1,7			9,1	2,1	1,8	1,7						5,0		2,6	
	168	10,9	18,3	3,6	5,0	22,7	14,6	3,6	11,7		2,8		5,0		3,3		10,5	18,8
	170						8,3									7,1		
	172	45,3	21,7	46,4	50,0	31,8	35,4	42,9	43,3	27,3	44,4	46,7	43,3	3,1	53,3	12,5	28,9	51,6
	174		3,3			2,3		1,8									2,6	
	176					11,4												
	182													6,3				
	184										2,8			18,8				
	192									9,1	5,6							
	Alelo	An	Ap	Ca	Fl	FA	Gn	Gb	In	It	Ma	Mo	Oz	Pt	SA	SC	SI	SR
Dsc 09	152	10,9	6,7			2,2			3,3									
	154	1,6	20,0	21,4	10,0	4,3	30,4	9,3	8,3	31,8	5,6	5,0	6,7	6,3	15,0		13,9	6,3
	156				1,7		10,9											
	158					4,3												
	160					2,2												
	166	7,8	1,7		8,3				11,7			6,7	10,0		8,3		5,6	18,8
	168					13,0					2,8							
	170	1,6	13,3	10,7					1,7							1,8		
	172	28,1	20,0	10,7	55,0	23,9	23,9	40,7	25,0		16,7	48,3	23,3	9,4	33,3		30,6	28,1
	174				5,0		2,2		1,7	9,1							5,6	
	176	26,6	25,0	28,6	15,0	8,7	19,6	27,8	35,0	50,0	58,3	20,0	48,3	34,4	16,7	37,5	11,1	43,8

Continua...

Tabela 5. Continuação.

	178	3,1	10,0	10,7	3,3	13,0	4,3	3,7	10,0		8,3	3,3		18,8	15,0	48,2		1,6
	180	4,7	3,3	10,7		4,3		3,7						6,3	3,3	7,1		
	182	9,4		7,1	1,7	4,3	4,3		3,3		2,8			6,3	6,7		33,3	
	184							7,4										
	186	4,7				4,3		7,4			5,6	8,3			1,7			1,6
	188								9,1									
	190					8,7										1,8		
	192													12,5				
	196													6,3				
	198	1,6				4,3	4,3					8,3	11,7			3,6		
	200					2,2												
	Alelo	An	Ap	Ca	Fl	FA	Gn	Gb	In	It	Ma	Mo	Oz	Pt	SA	SC	SI	SR
	268	1.6			5.4	2.2							10.0					
	270		6.7		3.6		10.4	7.1	3.7			3.3	5.0		1.7			
	280															17.9	2.6	
	284										5.6	1.7			1.7		2.6	
Dsc 10	286		1.7				6.3		3.7	50.0	8.3			75.0		1.8		3.1
	288	91.9	83.3	100.0	67.9	76.1	72.9	80.4	85.2	22.7	63.9	95.0	76.7	25.0	90.0	76.8	89.5	96.9
	290	6.5	5.0		21.4	4.3	10.4	12.5	7.4	22.7	22.2		8.3		6.7		5.3	
	292					8.7				4.5								
	294					8.7										3.6		
	296		3.3		1.8													
	Alelo	An	Ap	Ca	Fl	FA	Gn	Gb	In	It	Ma	Mo	Oz	Pt	SA	SC	SI	SR
	215							5.4										4.7
	219							1.8										
Dsc 20	223																	3.1
	225	1.6		3.6							2.9					1.9		
	227	75.0	80.0	92.9	74.1	85.4	87.5	73.2	86.7	95.5	76.5	86.2	78.3	93.3	83.3	79.6	93.8	68.8

Continua...

Tabela 5. Continuação.

	229					2.1		1.8	1.7	4.5	5.9					13.0		1.6
	235	23.4	16.7	3.6	25.9	12.5	12.5	14.3	11.7		14.7	13.8	21.7		16.7	5.6	6.3	21.9
	243		3.3					3.6						6.7				
	Alelo	An	Ap	Ca	Fl	FA	Gn	Gb	In	It	Ma	Mo	Oz	Pt	SA	SC	SI	SR
	234	42.2	38.3	7.1	25.0	19.6	39.6	42.9	55.0	27.3	53.1	55.0	56.7	37.5	50.0	32.1	61.1	60.9
	236		6.7					1.8	3.3									4.7
	238	3.1		7.1				3.6		36.4	3.1			12.5				9.4
	240			3.6				3.6		4.5					6.7			
	242		5.0	7.1	1.7	10.9	6.3	1.8	5.0	4.5		5.0						
	244	7.8	1.7		15.0		8.3	10.7	5.0			6.7	3.3		13.3		5.6	
	246	1.6		7.1			2.1		1.7	13.6	6.3							
	248		8.3		18.3	13.0	6.3								5.0		2.8	
	250											3.3						
	252			3.6							6.3					8.9		
	256		1.7		5.0	13.0												
Dsc 03	258				5.0													
	262		1.7			2.2								9.4				
	264		5.0			4.3	4.2	1.8			6.3		3.3	25.0		3.6		1.6
	266						2.1	8.9	6.7		3.1		3.3	3.1		25.0	5.6	
	268		6.7	7.1	8.3			3.6		4.5			5.0					
	270	39.1	18.3	3.6	18.3	19.6	22.9	21.4	23.3	9.1	15.6	25.0	26.7	6.3	25.0		22.2	20.3
	272	4.7	3.3	14.3		4.3	8.3					5.0					2.8	
	274					2.2							1.7					
	276	1.6		28.6							6.3					17.9		
	278			10.7		6.5												
	280		3.3													7.1		
	284													6.3		1.8		3.1
	286					4.3												

Continua...

Tabela 5. Continuação.

	294	3.6																
	296	3.3																
	Alelo	An	Ap	Ca	Fl	FA	Gn	Gb	In	It	Ma	Mo	Oz	Pt	SA	SC	SI	SR
Dsc 07	202	51,6	43,3	10,7	33,3	12,5	41,7	44,6	46,7	18,2	8,3	65,0	70,0		56,7	1,8	71,1	57,8
	230	3,1	6,7	14,3	1,7	6,3	6,3	7,1	3,3	13,6	8,3	11,7		9,4		35,7	5,3	
	232	37,5	31,7	75,0	51,7	79,2	50,0	35,7	46,7	45,5	52,8	16,7	26,7	84,4	40,0	55,4	23,7	40,6
	234	1,6						1,8										
	236	3,1	11,7		13,3	2,1	2,1	7,1	3,3	22,7	30,6	6,7	3,3	6,3	3,3	7,1		1,6
	250	3,1	6,7					3,6										
	Alelo	An	Ap	Ca	Fl	FA	Gn	Gb	In	It	Ma	Mo	Oz	Pt	SA	SC	SI	SR
Dsc 11	220														1,7			
	222	18,8	21,7	17,9	11,7	10,4	12,5	16,1	13,3	13,6	14,7	18,3	30,0	12,5	10,0	1,8	10,5	18,8
	228	3,1	15,0	21,4	8,3	10,4	12,5		3,3	4,5	11,8	6,7	10,0	3,1	1,7	21,4	2,6	4,7
	230	51,6	43,3	50,0	70,0	72,9	54,2	64,3	66,7	54,5	35,3	56,7	38,3	46,9	66,7	55,4	63,2	53,1
	232	26,6	20,0	7,1	10,0	6,3	18,8	19,6	13,3	9,1	14,7	18,3	21,7	18,8	16,7	14,3	23,7	18,8
	234						2,1							15,6				4,7
	236								3,3						3,3	1,8		
	238			3,6						18,2	23,5			3,1		5,4		
	Alelo	An	Ap	Ca	Fl	FA	Gn	Gb	In	It	Ma	Mo	Oz	Pt	SA	SC	SI	SR
Dsc 13	249	1,6				19,6				5,0				10,0	3,4	24,1		
	255					4,3									1,7			
	259	1,6	1,7	3,8		2,2			5,6		10,0					3,7		
	261					6,5				5,0								
	263	1,6			3,6	4,3			1,9	10,0						3,7		
	265	10,9	3,4					5,4	1,9		13,3	6,9	3,6	10,0				1,7
	267	23,4	24,1	26,9	42,9	8,7	36,4	21,4	38,9	15,0	13,3	51,7	35,7	10,0	34,5	24,1	22,2	20,7

Continua...

Tabela 5. Continuação.

269	3,1		11,5											16,7			
271	3,1	1,7	15,4			4,5			16,7				1,7				3,4
273							1,8										
275	3,1		7,7	3,6	6,5	9,1	1,8		10,0	1,7	3,6						
277					4,3												
279	3,1																
281			7,7		4,3							3,3					
283					4,3			1,9	3,3	3,4		10,0					
285	23,4	22,4		12,5	13,0	29,5	35,7	29,6	50,0	26,7	22,4	26,8	50,0	24,1	1,9	41,7	39,7
287	1,6	1,7		3,6								1,8	3,3		3,7		
289																2,8	
291	3,1	5,2		5,4				1,9	10,0			1,8			1,9		1,7
293	3,1	12,1		1,8	13,0	9,1	7,1	5,6			1,7			1,7		11,1	1,7
295				3,6	6,5												
297	9,4	17,2	11,5	21,4		6,8	14,3	11,1		3,3	12,1	17,9		20,7	7,4	16,7	20,7
299		5,2			2,2	2,3	5,4					1,8		1,7			
301			3,8	1,8										1,7			
305												1,8					
309	4,7	5,2				2,3	7,1		5,0			5,4		8,6		2,8	10,3
315															1,9		
319	1,6							1,9								2,8	
321	1,6																
325			11,5							3,3					9,3		
327												3,3					
337															1,9		

Entre as 17 populações, doze possuem alelos exclusivos. Pode-se verificar que 22,05% destes alelos, ou seja, 28 alelos são restritos a algumas populações e este número variou de um a seis (Tabela 6).

Tabela 6. Alelos privados obtidos em oito locos de marcadores microssatélites para 17 populações de *D. saccharalis*.

População	Loco	Alelo	Frequência (%)
Anicuns	Dsc 13	279	3,13
	Dsc 13	321	1,56
Flores	Dsc 03	258	5,00
	Dsc 03	296	3,33
Formoso do Araguaia	Dsc 01	176	10,42
	Dsc 09	158	4,17
	Dsc 09	160	2,08
	Dsc 09	200	2,08
	Dsc 03	286	4,17
Goiatuba	Dsc 13	277	4,35
	Dsc 09	184	7,14
	Dsc 20	219	1,79
	Dsc 13	273	1,79
	Dsc 09	188	9,09
Morrinhos	Dsc 03	250	3,33
Orizona	Dsc 13	305	1,67
Pelotas	Dsc 01	150	18,75
	Dsc 01	182	6,25
	Dsc 09	192	12,50
	Dsc 09	196	6,25
	Dsc 13	327	3,13
Santo Antônio	Dsc 11	220	1,67
Santa Carmen	Dsc 01	156	3,57
	Dsc 03	294	3,57
	Dsc 13	315	1,79
	Dsc 13	337	1,79
	Dsc 13	289	2,63
Santa Rosa	Dsc 20	223	3,13

Todas as populações apresentaram locos que não estavam em EHW ($p < 0,05$). As populações de Itaqui (It) e Morrinhos (Mo) apresentaram apenas um loco com desvio do EHW (Dsc 09 e Dsc 11, respectivamente), enquanto as populações Anicuns (An) e Flores (Fl) apresentaram seis locos fora do equilíbrio (Tabela 7). A média das estimativas das frequências de alelos nulo foi 0,146, com destaque para o loco Dsc 09, que apresentou

a maior média (0,269) (Tabela 8). Não foi observado desequilíbrio de ligação entre os pares de locos.

Tabela 7. Probabilidade para aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) de acordo com o Teste Exato de Fisher. Em negrito: locos que não se ajustam as proporções do Equilíbrio de Hardy – Weinberg.

População	Dsc 01	Dsc 9	Dsc 10	Dsc 20	Dsc 3	Dsc 7	Dsc 11	Dsc 13
An	0,0001	0,0000	0,1598	0,0001	0,0000	0,2449	0,0000	0,0000
Ap	0,0009	0,0000	0,0571	0,0000	0,0000	0,4020	0,0000	0,1008
Ca	0,0562	0,0000	*	1,0000	0,0000	0,0000	0,0071	0,0000
Fl	0,0001	0,0000	0,0000	0,0002	0,0006	0,2899	0,0000	0,1200
FA	0,0002	0,0000	0,0000	0,0209	0,0000	0,0980	0,0000	0,0008
Gb	0,0002	0,0000	0,0001	1,0000	0,0011	0,5868	0,0000	0,0000
Gn	0,0296	0,0000	0,0025	0,0000	0,0000	0,0181	0,0000	0,2700
In	0,0737	0,0000	0,0001	0,0579	0,0000	0,0199	0,0000	0,1539
It	0,0036	0,0001	0,1372	*	0,0099	0,9525	0,1764	0,0201
Ma	0,0000	0,0000	0,0651	0,0011	0,0000	0,7648	0,0000	0,0000
Mo	0,0749	0,0145	0,0169	1,0000	0,0574	0,9749	0,0000	0,0010
Oz	0,5983	0,0001	0,0015	0,0005	0,0000	0,5343	0,0000	0,0008
Pt	0,4888	0,0000	0,0168	0,0345	0,0000	0,3059	0,0158	0,0036
SA	0,0367	0,0000	0,0010	0,0005	0,0021	0,7245	0,0000	0,0140
SC	0,0012	0,0000	0,0001	0,0036	0,0000	0,2116	0,0000	0,0018
SI	0,0007	0,0000	0,0548	0,0323	0,0079	0,7427	0,0000	0,1768
SR	0,2945	0,0000	0,0159	0,0129	0,0000	0,5634	0,0000	0,1603

* loco monomórfico.

Tabela 8. Frequência de alelos nulos estimada para cada loco dentro de cada população de *D. saccharalis*.

População	Dsc 01	Dsc 09	Dsc 10	Dsc 20	Dsc 03	Dsc 07	Dsc 11	Dsc 13	Média
An	0,193	0,310	0,128	0,203	0,179	0,000	0,098	0,168	0,160
Ap	0,121	0,215	0,112	0,229	0,261	0,000	0,165	0,059	0,145
Ca	0,155	0,255	0,001	0,000	0,348	0,000	0,049	0,230	0,130
Fl	0,226	0,124	0,200	0,217	0,152	0,000	0,000	0,050	0,121
FA	0,227	0,295	0,284	0,137	0,357	0,109	0,231	0,144	0,223
Gb	0,134	0,254	0,175	0,000	0,206	0,025	0,122	0,208	0,141
Gn	0,105	0,271	0,148	0,243	0,244	0,075	0,070	0,035	0,149
In	0,103	0,287	0,194	0,116	0,275	0,042	0,000	0,056	0,134
It	0,247	0,338	0,130	0,000	0,124	0,000	0,000	0,146	0,123
Ma	0,269	0,282	0,139	0,248	0,301	0,000	0,000	0,232	0,184
Mo	0,110	0,151	0,114	0,000	0,031	0,000	0,136	0,163	0,088
Oz	0,037	0,194	0,172	0,201	0,319	0,000	0,021	0,103	0,131
Pt	0,074	0,413	0,198	0,233	0,365	0,000	0,000	0,200	0,185
SA	0,091	0,320	0,150	0,197	0,171	0,000	0,098	0,081	0,139

Continua...

Tabela 8. Continuação

SC	0,184	0,339	0,184	0,148	0,360	0,052	0,067	0,012	0,168
SI	0,142	0,289	0,123	0,165	0,177	0,000	0,191	0,065	0,144
SR	0,044	0,238	0,119	0,132	0,166	0,000	0,233	0,000	0,117
Média	0,145	0,269	0,151	0,145	0,237	0,018	0,087	0,115	

As estimativas das estatísticas F estão sumarizadas na Tabela 9. O coeficiente de endogamia da espécie foi de 0,399. Os valores de F e θ estimados foram respectivamente 0,437 e 0,062. Estas estimativas globais indicaram a presença de estruturação nas populações analisadas (Tabela 9). Apesar das estimativas globais terem indicado estruturação genética, a estruturação entre as populações (θ) de cana-de-açúcar não foi significativa. Ao contrário das populações de arroz nos quais os valores de θ (F_{ST}) foram significativos (Tabela 9).

Tabela 9. Estimativa dos índices de estruturação baseados em Weir & Cockerham (1984) (f , F, θ) para as populações naturais de *D. saccharalis*. Os valores não significativos estão indicados com asterisco (*).

Populações	f	F	θ
Todas as populações	0,399 (0,254-0,534)	0,437 (0,309-0,554)	0,062 (0,037-0,094)
Cana-de-açúcar	0,396 (0,258-0,528)	0,398 (0,258-0,530)	0,004* (-0,001-0,01)
Arroz (todos os Estados).	0,402 (0,242-0,536)	0,457 (0,336-0,581)	0,093 (0,057-0,138)
Arroz (GO)	0,339 (0,179-0,469)	0,362 (0,211-0,491)	0,034 (0,021-0,051)

Valores entre parênteses correspondem ao limite inferior e superior do intervalo de confiança de 95%.

A partir das estimativas θ foi gerado uma matriz par-a-par composta por todas as populações com o objetivo de observar o grau de diferenciação entre pares de populações. Estes valores da estimativa θ variaram de -0,003 a 0,2376. Populações separadas por mais de 2000 km de distância, como Pelotas (Pt) e Santa Isabel (SI) apresentam uma distância genética de 0,238 enquanto que populações separadas por apenas 74 km de distância como Anicuns (An) e Inhumas (In) apresentaram um menor índice de divergência genético (0,007) (Tabela 10). Verificou-se a presença de correlação significativa entre as distâncias genéticas e geográficas estimada por meio do teste de Mantel ($r=0,76$; $p= 0,0033$) em que é possível distinguir um padrão de aumento da diferenciação genética com o aumento da geográfica.

Tabela 10. Matriz de diferenciação genética (θ) par a par entre as dezessete populações de *D. saccharalis* usando ou não a correção ENA descrita em Chapuis & Estoup (2007).

	An	Ap	Ca	Fl	FA	Gb	Gn	In	It	Ma	Mo	Oz	Pt	AS	SC	SI	SR
An		0,008*	0,076	0,039	0,060	0,011	0,001	0,007	0,115	0,044	0,024	0,010	0,152	0,003	0,102	0,013	0,011
Ap	0,011		0,060	0,044	0,058	0,009	0,007	0,019	0,091	0,037	0,037	0,015	0,134	0,024	0,071	0,021	0,028
Ca	0,078	0,058		0,083	0,047	0,050	0,080	0,069	0,140	0,073	0,124	0,115	0,163	0,083	0,058	0,126	0,107
Fl	0,030	0,041	0,078		0,049	0,025	0,019	0,024	0,102	0,053	0,063	0,056	0,136	0,025	0,103	0,068	0,064
FA	0,068	0,068	0,055	0,056		0,032	0,060	0,052	0,092	0,052	0,130	0,111	0,090	0,069	0,066	0,107	0,097
Gb	0,008	0,000	0,052	0,023	0,041		0,012	0,003	0,066	0,037	0,039	0,029	0,109	0,012	0,083	0,022	0,033
Gn	-0,003	0,009	0,071	0,016	0,062	0,002		0,000	0,090	0,040	0,027	0,015	0,138	0,003	0,090	0,013	0,018
In	0,001	0,014	0,083	0,028	0,073	-0,002	0,003		0,091	0,048	0,025	0,022	0,137	-0,002	0,090	0,013	0,016
It	0,132	0,092	0,134	0,139	0,121	0,078	0,106	0,113		0,057	0,165	0,122	0,050	0,128	0,113	0,132	0,141
Ma	0,043	0,043	0,061	0,068	0,071	0,040	0,040	0,038	0,051		0,101	0,063	0,091	0,067	0,063	0,095	0,066
Mo	0,019	0,037	0,142	0,046	0,142	0,035	0,022	0,018	0,194	0,104		0,020	0,226	0,018	0,146	0,014	0,036
Oz	0,018	0,025	0,134	0,067	0,142	0,036	0,033	0,015	0,132	0,064	0,025		0,181	0,022	0,127	0,021	0,016
Pt	0,193	0,163	0,194	0,200	0,142	0,143	0,176	0,175	0,050	0,113	0,265	0,217		0,171	0,125	0,193	0,181
SA	0,002	0,027	0,096	0,019	0,077	0,006	0,004	-0,005	0,136	0,069	0,017	0,030	0,201		0,118	0,010	0,010
SC	0,131	0,091	0,067	0,142	0,112	0,111	0,114	0,115	0,163	0,088	0,170	0,160	0,189	0,146		0,140	0,144
SI	0,027	0,035	0,159	0,079	0,133	0,032	0,031	0,025	0,171	0,117	0,027	0,040	0,238	0,019	0,182		0,021
SR	0,007	0,037	0,126	0,056	0,107	0,031	0,018	0,003	0,143	0,054	0,043	0,014	0,204	0,014	0,168	0,041	

*Valores na diagonal superior correspondem a estimativa θ de Weir (1996) usando a correção ENA (*excluding the null allele*) descrita em Chapuis & Estoup (2007). Valores na diagonal inferior correspondem a estimativa θ de Weir (1996) sem a correção ENA.

É possível notar, através da árvore de *Neighbor-joining* (Figura 2), que houve um agrupamento das populações por estado. Percebe-se que a população de Formoso do Araguaia (FA) amostrada na cultura do arroz, apresentou-se em uma posição intermediária aos dois grupos formados. Além disso, as populações oriundas do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul, que correspondem às populações de Santa Carmen (SC), Canarana (Ca), Maracajú (Ma), Pelotas (Pt) e Itaqui (It) agruparam-se em ramificações próximas a parte superior da árvore, diferenciando-se das populações coletadas no Estado de Goiás. Não se observou a separação em grupos conforme as plantas hospedeiras dentro deste Estado.

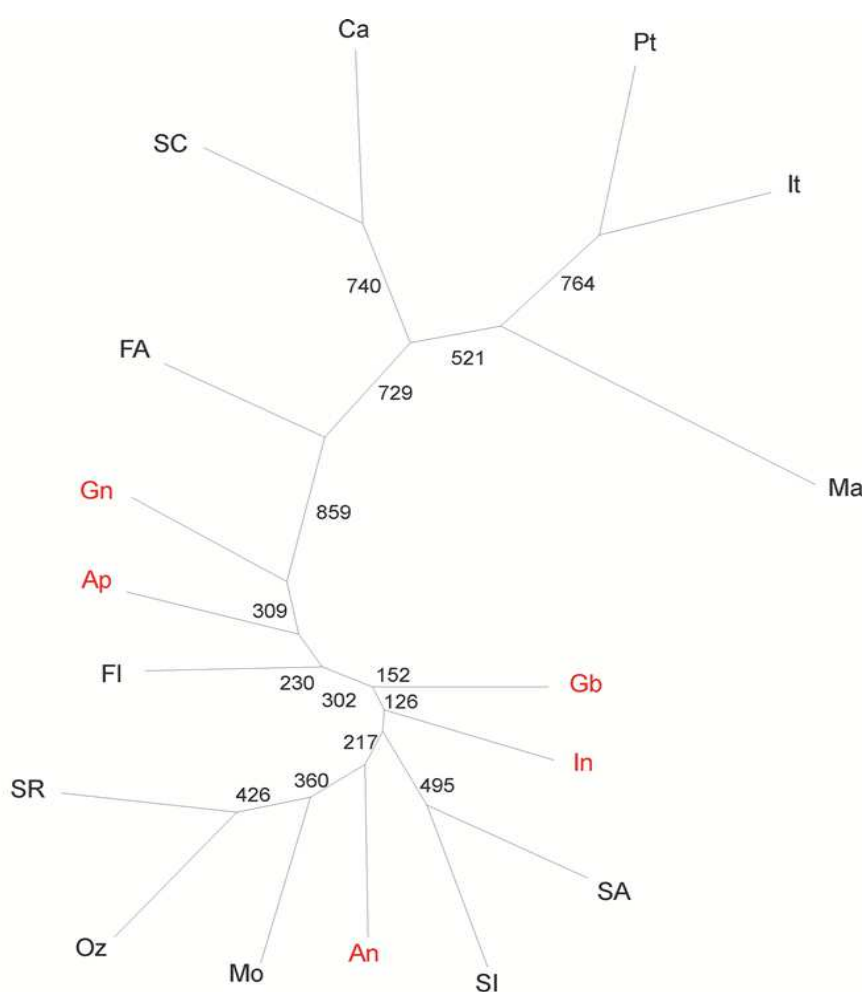


Figura 2. Distribuição das populações de *D. saccharalis* gerada pelo método de *Neighbor-joining* baseado na distância genética Cavalli-Sforza & Edwards (1967). Populações em vermelho correspondem aos indivíduos coletados na cultura da cana-de-açúcar. Os números nos nós correspondem à estabilidade destes após 1000 *bootstrap*.

A análise de atribuição usando inferência Bayesiana identificou um valor de $\Delta K = 2$, ou seja, a formação de dois grupos significativos (populações com predominância na coloração preta versus populações com predominância na cor branca). Os grupos formados são muito semelhantes aos que foram observados na árvore, demonstrando que apesar da formação de dois grupos, estes não apresentam estruturação por hospedeiro, mas sim por região geográfica (Figura 3).

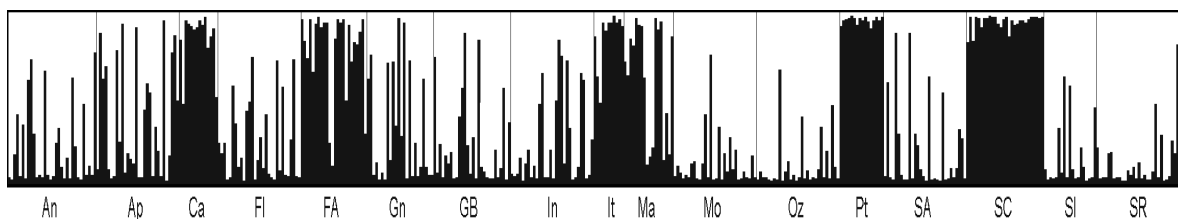


Figura 3. Análise de atribuição usando inferência Bayesiana implementada no programa *STRUCTURE* das populações de *D. saccharalis*. $\Delta K = 2$, número que melhor representa o conjunto de dados.

5 DISCUSSÃO

A diversidade genética das populações de *D. saccharalis* nas regiões produtoras de arroz e cana-de-açúcar analisadas foi avaliada por meio do número de alelos por loco, riqueza alélica, medidas de heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) e do conteúdo de informação polimórfica (PIC).

Foram encontrados 127 alelos distribuídos nos oito locos, com média de 5,65 alelos por loco por população (Tabela 4). Adicionalmente, foi verificada a riqueza alélica para cada população, a qual revela o número de alelos diferentes segregando em um loco em determinada população, relacionando-se com o número de alelos privados por loco e por população (Petit et al., 1998). A população de Formoso do Araguaia apresentou a maior média para riqueza alélica (6,282) e o maior número de alelos privados (6). Analisando-se a diversidade genética de sete populações da broca do colmo *Chilo suppressalis* (Walker, 1863) (Lepidoptera: Crambidae) na cultura do arroz no sul da China, Liu e colaboradores (2013) encontraram valores entre 5,67 e 14,0 para riqueza alélica trabalhando com seis locos microssatélites. Valores semelhantes a este trabalho para a riqueza alélica foram encontrados por Espinoza e colaboradores (2007) em seis populações de *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Tortricidae) uma espécie oligófaga em pomares de maçã no Chile. A riqueza alélica de cada população foi de 3,36 a 4,37, encontrando-se 210 alelos em 185 indivíduos amostrados com oito locos microssatélites. Estes dois insetos representantes da ordem Lepidoptera, apresentam comportamento similar à broca-do-colmo *D. saccharalis* (Fabricius, 1794). No período larval, estes insetos se desenvolvem dentro de estruturas vegetativas, como colmos e frutos das plantas hospedeiras o que dificulta o controle químico. Deste modo, utilizar a riqueza alélica como um componente da diversidade genética de uma população pode fornecer subsídios para a escolha de quais populações devem ser priorizadas nos programas de manejo e conservação de uma espécie (Caballero et al., 2010).

A região do Formoso do Araguaia está localizada no vale do rio Javaés, no Estado do Tocantins, em uma extensa área de várzea com mais de 500 mil hectares e esta região encontra-se entre os rios Araguaia e seus afluentes, Urubu, Javaés e Formoso

(Santos & Rabelo, 2004). As áreas amostradas correspondem às Fazendas Cooperjava e Cooperfomoso, com 76 ha e 175 ha, respectivamente e todos os indivíduos amostrados nesta região foram coletados nos materiais Irga 424 e Epagri 115. A mistura de indivíduos provenientes destas duas áreas possivelmente causou um déficit de heterozigotos (valores de $H_O < H_E$) e refletindo em maior diversidade genética observada para esta população.

Todas as populações foram constituídas de indivíduos provenientes de uma única área amostrada e apenas um material vegetal cultivado. Morrinhos (Mo) e Santa Rosa (SR) foram às populações que apresentaram os menores valores médios para riqueza alélica (3,719 e 3,701) e índice de fixação intrapopulacional (0,252 e 0,285) (Tabela 4). A área amostrada no município de Morrinhos correspondeu a Fazenda Barreiro com 23 ha, a qual está cercada por pastagens (espécies do gênero *Brachiaria*). Já a segunda área correspondente à Fazenda Santa Rosa, com 7,3 ha não apresentava outras culturas cultivadas no entorno, sendo caracterizada por uma área urbanizada. Em ambas as áreas, a lavoura foi composta pela cultivar de terras altas BRS Sertaneja. A ausência de um hospedeiro alternativo em Morrinhos e a urbanização no entorno da área de Santa Rosa podem ter contribuído para a baixa variabilidade destas áreas, limitando o fluxo gênico entre populações.

Na cultura da cana-de-açúcar, os indivíduos também foram coletados em diferentes áreas de usinas sucroalcooleiras e em todas as áreas amostradas existiam apenas outras variedades de cana-de-açúcar no entorno. O maior número médio para riqueza alélica foi encontrado na população de Aporé (5,246), ou seja, uma maior diversidade genética que também foi confirmada pelas maiores estimativas de A (6,63) e H_E (0,647) e o menor índice de fixação intrapopulacional (0,349) em relação às demais populações coletadas para esta cultura (Tabela 4). Dentre as populações de cana-de-açúcar, Aporé apresenta a maior distância dos outros pontos de coleta, sendo localizada na região do Vale do Rio Aporé, na divisa dos Estados de Goiás e Mato Grosso do Sul, com 564 metros de altitude. O material vegetal em que as lagartas foram amostradas correspondeu ao SP 80-1842 do grupo Coopersucar/ CTC.

Em plantas de arroz é muito comum encontrar diversos indivíduos da broca do colmo em uma mesma touceira. Para as plantas de cana-de-açúcar este comportamento é similar, mas a distribuição no campo é mais uniforme. Ou seja, em todas as touceiras com sinais de ataque (coração morto e brotamento lateral) é possível encontrar lagartas dentro do colmo. Para a cultura do arroz, estes sinais de ataque (coração morto e panícula branca)

também são comuns para outros insetos, como gafanhotos e apresenta uma distribuição mais espaçada no campo agrícola. Este tipo de comportamento nas duas culturas pode explicar este certo grau de endogamia presente em todas as populações, independente da planta hospedeira.

Considerando-se o fato de se tratar de uma espécie com reprodução sexuada previa-se uma maior ocorrência de indivíduos heterozigotos na população. Porém, observou-se que a maior parte dos indivíduos das populações eram homozigotos e que os heterozigotos, bem como os alelos privados, estivessem numa condição mais rara. Para todas as populações de arroz o tamanho amostral correspondeu a todos os indivíduos analisados, variando entre 11 (Itaqui – It) e 32 (Santa Rosa – SR) lagartas coletadas. Já os indivíduos selecionados nas populações de cana-de-açúcar representaram uma amostra do total de todas as lagartas coletadas nas lavouras canavieiras.

Comparando-se a heterozigosidade esperada (H_E média = 0,58) com outros encontrados na literatura pode-se concluir que existe uma alta diversidade genética intrapopulacional desta espécie de broca-do-colmo. Chen & Dorn (2010) encontraram uma heterozigosidade esperada (H_E) média de 0,700 em nove locos microssatélites para 15 populações de *C. pomonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Tortricidae) coletadas em pomares de maçã, damasco e nozes em diferentes regiões e locais na Suíça. Em outro estudo com outra espécie de traça da maçã *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae), Zheng e colaboradores (2013) trabalharam com cinco locos microssatélites e encontraram uma heterozigosidade esperada média de 0,76 a partir de dezessete populações desta praga em pomares de maçã, pêssego e pêra em várias regiões da China. Assim como a *D. saccharalis* (Fabricius, 1794) estas traças apresentam um comportamento oligófago, porém quando as fêmeas encontram condições favoráveis para a oviposição, podem permanecer dentro da mesma área de onde emergem e com é possível a ocorrência de acasalamento entre irmãos, já que as fêmeas destas espécies e de outros lepidópteros já emergem amadurecidas sexualmente (Michereff, 2000; Zheng et al., 2013). Este fato pode acarretar aos desvios observados em relação aos valores da heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E), favorecendo um aumento de homozigotos nas populações estudadas.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) é um indicador da qualidade de um marcador em estudos genéticos. Marcadores moleculares com PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, com valores entre 0,25 e 0,5 medianamente informativos

e com valores inferiores a 0,25, pouco informativos. Os valores de PIC nos locos utilizados variaram de 0,25 (Dsc 20) a 0,70 (Dsc 09), com média de 0,52 (Tabela 03). Após desenvolver seis locos microssatélites, Pavinato e colaboradores (2013a), a partir de três populações de *S. frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) coletadas na cultura de milho encontraram valores de PIC entre 0,17 e 0,89. Porém, os seis locos selecionados para o estudo foram os mais informativos para esta espécie de mariposa. Os locos selecionados neste estudo foram obtidos a partir do trabalho realizado por Pavinato e colaboradores (2013b), que desenvolveram dezesseis locos a partir de indivíduos da broca-da-cana-de-açúcar coletados em uma área canavieira no Estado de São Paulo.

O valor de f estimado para esta espécie foi de 0,399 e a presença de alelos nulos em locos microssatélites também pode influenciar os valores de f , além da relação de H_E e H_O . Alelos nulos são em geral resultado de mutações que podem ocorrer no local de hibridação do iniciador (Chapuis & Estoup, 2007). Assim, a presença de alelos nulos ocasiona uma redução da frequência estimada de heterozigotos na população e como resultado tem-se uma superestimação dos valores de endogamia (Kalinowski & Taper, 2006).

A presença de alelos nulos parece ser maior em lepidópteros do que em outros insetos e a presença desses parece ser comum em locos microssatélites, provavelmente pela alta taxa de mutação que ocorre nesse marcador (Ji et al., 2003). Outra explicação para a ocorrência de alelos nulos está baseada nos aspectos biológicos do inseto que se reproduzem em culturas com ciclo anual, cujo plantio é realizado principalmente por alguns genótipos o que aumenta as chances de consanguinidade, promovendo, assim, a deficiência de heterozigotos observada (De Barro, 2005). Embora alguns dos locos estudados terem apresentado uma estimativa para a ocorrência de alelos nulos para algumas populações, eles ainda contêm grande informação polimórfica e por esse motivo foram mantidos nas análises de divergência genética (Tabela 8).

A maioria dos alelos foi compartilhada entre todas as populações estudadas indicando assim, de forma indireta, que existe fluxo gênico entre essas populações. O loco que apresentou o menor número de alelos foi o Dsc 07 (6) e o maior foi o Dsc 13 (32). Para todos os locos foram encontrados alelos com frequência menor que 5% e assim estes alelos foram considerados raros (Tabela 5). Efeito de endogamia, presença de alelos nulos, deriva genética, gargalo genético e seleção natural são alguns fatores evolutivos que podem ocasionar variações nas frequências alélicas de uma população (Hartl & Clark,

2010). Estes fatores também podem alterar o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Todos os locos utilizados no presente trabalho apresentaram desvio do EHW em pelo menos uma das populações (Tabela 7).

As estimativas de estruturação genética encontradas entre as populações de *D. saccharalis* (Tabela 9), indicaram estruturação moderada quando o valor de θ ou F_{ST} (0,062) é avaliado. O valor de F_{ST} varia de zero a um. $F_{ST} = 1$ indica populações completamente homozigotas com a fixação de alelos distintos entre elas. $F_{ST} = 0$ indica populações com frequências alélicas idênticas, ou seja, não existe diferença genética entre as populações. Valores das estimativas de variabilidade interpopulacionais entre 0 e 0,05 indicam baixa estruturação genética; valores entre 0,05 e 0,15 estruturação genética moderada, valores entre 0,15 e 0,25 estruturação alta e valores acima de 0,25 indicariam uma forte estruturação genética (Hartl & Clark, 2010).

Estruturação moderada ($\theta = 0,132$) também foi encontrada por Domingues e colaboradores (2012) em populações de *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781) (Lepidoptera: Noctuidae), oriundas de cultivo de algodão e soja em diferentes regiões produtoras no Brasil. Este foi um dos primeiros trabalhos para esta espécie que apresentou estruturação genética para as populações, pois é comum para insetos de hábito generalista e/ou oligófagos como *O. nubilalis* (Hübner, 1796), *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1809), *G. molesta* (Busck, 1916) apresentarem baixa estruturação genética e alta taxa de dispersão entre as populações já que estes podem ter uma maior gama de hospedeiros em determinada área geográfica (Bourguet et al., 2000; Torriani et al., 2010; Groot et al., 2011).

Não houve estruturação genética entre populações de *D. Saccharalis* em cana-de-açúcar (Tabela 9). Apesar das estimativas globais terem indicado estruturação genética, não é possível distinguir a contribuição da planta-hospedeira (arroz e cana-de-açúcar). Foi possível observar uma grande contribuição da distribuição espacial na divergência genética, uma vez que as estimativas par a par entre as populações foram maiores nas populações mais distantes (Tabela 10).

Na árvore de *Neighbor-joining* apresentada na Figura 2 é possível observar que não houve diferenciação entre populações oriundas de arroz e cana-de-açúcar. Foram formados grupos segundo a distribuição geográfica destas populações. As populações oriundas do Estado de Goiás ficaram em um mesmo grupo, independentemente da planta-hospedeira e as populações de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul

ficaram no outro ramo da árvore e a população de Formoso do Araguaia ficou em uma posição intermediária as demais. Pavinato (2014) também observou que as populações do Estado de Goiás não apresentam divergência quanto ao hospedeiro (milho e cana-de-açúcar) para esta mesma espécie de broca do colmo.

A análise de atribuição de indivíduos em populações utilizando análise Bayesiana mostrou haver dois grupos ($K = 2$) significativos. O primeiro grupo foi composto pelas populações oriundas de Canarana, Formoso do Araguaia, Itaquí, Maracajú, Pelotas e Santa Carmen. O segundo grupo foi formado pelas populações oriundas do Estado de Goiás, coletas em arroz e cana-de-açúcar (Figura 3). Este agrupamento foi semelhante ao apresentado na Figura 2. Essas análises (Método de agrupamento de *Neighbor-joining* e atribuição por inferência Bayesiana) apoiaram os resultados de estrutura genética. Essas análises, embora utilizem algoritmos diferentes para estimar a similaridade genética, agruparam as populações em uma estrutura muito semelhante, o que demonstra a robustez do resultado.

É importante destacar que além dos fatores intrínsecos aos marcadores microsatélites, os fatores bioecológicos da espécie em estudo podem ser responsáveis pelas mudanças na diversidade genética dentro e entre as populações de *D. saccharalis*. Os cultivos de arroz não são realizados o ano todo no Brasil. Durante o período em que essa cultura não está no campo, pode ocorrer uma queda acentuada no número de indivíduos de suas populações devido à escassez de hospedeiros ou suas populações migrarem para outros hospedeiros (cana-de-açúcar, milho, sorgo ou outras gramíneas) em regiões próximas. Sendo assim, a diversidade genética pode ser alterada e estas populações não se diferenciarem segundo a planta-hospedeira. O Estado de Goiás é uma região de expansão agrícola e o cultivo destas duas culturas ocorre concomitantemente nesta área e provavelmente o tempo de ocupação das culturas de arroz e cana-de-açúcar ainda não favoreceu o processo de divergência genética entre populações de *D. saccharalis*. Este fato foi comprovado em trabalho realizado com esta mesma broca-do-colmo na cultura do milho e cana-de-açúcar, na qual não houve diferença entre as plantas-hospedeiras neste mesmo estado (Pavinato, 2014).

Os resultados obtidos nesse estudo corroboram aqueles encontrados por Lopes e colaboradores (2014). Os autores identificaram similaridade genética em populações de *D. saccharalis* em regiões produtoras de cana-de-açúcar nos Estados de São Paulo e Paraná. Em outro trabalho com o objetivo de investigar se existia mais de uma introdução

de *D. saccharalis* havia ocorrido no sul dos Estados Unidos e se quaisquer espécies crípticas estavam presentes, Joyce e colaboradores (2014) analisaram populações oriundas do Texas, Louisiana e Flórida e compararam com outras populações de diferentes países da America Latina. Os autores também encontraram uma estruturação geográfica no sul dos Estados Unidos que sugerem duas introduções desta espécie a partir de outros países. Contudo, foram identificadas diferenças na composição dos feromônios sexuais entre populações coletadas distantes geograficamente para esta mesma broca-do-colmo em trabalho conduzido por Cortés et al. (2010).

Em resumo, os resultados indicaram que a diversidade genética de *D. saccharalis* está estruturada no espaço e que as plantas-hospedeira, neste estudo, não tiveram um papel fundamental no processo de divergência genética de populações desta espécie. Vê-se a necessidade de mais estudos, como capacidade de dispersão, para ajudar a confirmar os resultados obtidos e desvendar aspectos do processo de divergência genética mediada pela mudança da paisagem agrícola, principalmente com a utilização de variedades transgênicas para poder traçar medidas de manejo de pragas mais eficientes.

6 CONCLUSÕES

- ✓ Os locos microssatélites foram eficientes para caracterizar a estrutura genética dentro e entre as populações de *D. saccharalis* em áreas produtoras de arroz e cana-de-açúcar em algumas regiões do Brasil.
- ✓ Existe estruturação genética moderada entre as populações de *D. saccharalis*, porém não relacionada com a planta hospedeira e sim com o isolamento geográfico.
- ✓ Quando analisado em separado, as populações oriundas de cana-de-açúcar não apresentam uma estruturação genética, o que pode estar relacionado com o ciclo desta cultura que permanece por um período maior do que a cultura de arroz o que pode favorecer o fluxo de indivíduos mesmo separados por longas distâncias.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAHI, I.; ATIRI, G. I.; THOTTAPPILLY, G.; WINTER, S. Discrimination of cassava-associated *Bemisia tabaci* in Africa from polyphagous populations, by PCR–RFLP of the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA. **Journal of Applied Entomology**, Germany, v. 128, p. 81-87, 2004.

AGUNBIADE, T. A.; COATES, B. S.; DATINON, B.; DJOUAKA, R.; SUN, W.; TAMÒ, M.; PITTENDRIGH, B. R. Genetic differentiation among *Maruca vitrata* F. (Lepidoptera: Crambidae) populations on cultivated cowpea and wild host plants: Implications for Insect resistance management and biological control strategies. **Plos One**, California, v. 9, p. 1-9 (e92072), 2014.

ALLENDORF, F. W.; LUNDQUIST, L. L. Introduction: population biology, evolution, and control of invasive species. **Conservation Biology**, Washington, v. 17, p. 24-30, 2003.

ARUNKUMAR, K. P.; KIFAYATHULLAH, L.; NAGARAJU, J. Microsatellite markers for the Indian golden silkmoth, *Antheraea assama* (Saturniidae: Lepidoptera). **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 9, p. 268-270, 2009.

BEHURA, S. K. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 3087-3113, 2006.

BEIGUELMAN, B. **Genética de populações humanas**. Sociedade Brasileira de Genética: Ribeirão Preto. 2008. 235 p.

BELLOWS, T. S.; PERRING, T. M.; GILL, R. J.; HEADRICK, D.H. Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 87, p. 195-206, 1994.

BERLOCHER, S. H.; FEDER, J. L. Sympatric speciation in phytophagous insects: moving beyond controversy? **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 47, p. 773-815, 2002.

BLEARS, M. J.; DE GRANDIS, S. A.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Waukegan, v. 21, p. 99-114, 1998.

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**. Barueri, SP: Manole, 2002. cap. 25, p. 409-425.

BOURGET, D.; BETHENOD, M. T.; PASTEUR, N.; VIARD, F. Gene flow in the European corn borer *Ostrinia nubilalis*: implications for the sustainability of transgenic

insecticidal maize. **Proceeding of the Royal Society of London B**, Edinburgh, v. 267, p. 117-122, 2000.

BROOK, B. W.; TONKYN, D. W.; O'GRADY, J. J.; FRANKHAM, R. Contribution of inbreeding to extinction risk in threatened species. **Ecology and Society**, Santa Ana, v. 6, p. 1-16, 2002.

BUSATO, G. R.; GRÜTZMACHER, A. D.; OLIVEIRA, A. C. DE; VIEIRA, E. A.; ZIMMER, P. D.; KOPP, M. M.; BANDEIRA, J. de 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. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 3, p.709-716, 2004.

BUSH, G. L. Sympatric host race formation and speciation in frugivorous flies of the genus *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae). **Evolution**, London, v. 23, p. 237-251, 1969.

BUSH, G. L. Host race formation and sympatric speciation in *Rhagoletis* fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Psyche**, Cambridge, v. 99, p. 335-358, 1992.

BUSO, G. S. C. Marcadores moleculares: segurança e precisão para o melhoramento genético de plantas. **GeneBio** – Informativo da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, v. 8, p. 3, 2006.

CABALLERO, A.; RODRÍGUEZ-RAMILO, S. T.; ÁVILA, V.; FERNÁNDEZ, J. Management of genetic diversity on subdivided populations in conservation programmes. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 11, p. 409-419, 2010.

CAPINERA, J. L. **Sugarcane Borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae)**. Florida: University of Florida, 2013. 5 p. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu>>. Acesso em: 24 out. 2014.

CAPRIO, M. A.; TABASHNIK, B. E. Gene flow accelerates local adaptation among finite populations – simulating the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Annapolis, v. 85, p. 611-620, 1992.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; EDWARDS, A. W. F. Phylogenetic analysis models and estimation procedures. **American Journal of Human Genetics**, Houston, v. 19, p. 233-257, 1967.

CHAPUIS, M. P.; ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 621-631, 2007.

CHEN, M. H.; DORN, S. Microsatellites reveal genetic differentiation among populations in an insect species with high genetic variability in dispersal, the codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 100, p. 75-85, 2010.

CLARIDGE, M. F.; HOLLANDER, J. D.; MORGAN, J. C. Species concepts and speciation in insect herbivores: planthopper case studies. **Bolletino di zoologia**, England, v. 62, p. 53-58, 1995.

CLARK, P. L.; MOLINA-OCCHOA, 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**, Madison, v. 7, p. 1-10, 2007.

CORTÉS, A. M. P.; ZARBIN, P. H. G.; TAKIYA, D. M.; BENTO, J. M. S.; GUIDOLIN, A. S.; CONSOLI, F. L. Geographic variation of sex pheromone and mitochondrial DNA in *Diatraea saccharalis*(Fab., 1794) (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Insect Physiology**, Portici, v. 56, p.1624-1630, 2010.

CRUZ, I. **Manual de identificação de pragas do milho e de seus principais agentes de controle biológico**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008, 192 p.

CHAPUIS, M. P.; ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 621-631, 2007.

DE BARRO, P. J. Genetic structure of the whitefly *Bemisia tabaci* in the Ásia-Pacific region revealed using microsatellite markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 14, p. 3695-3718, 2005.

DIEHL, S. R.; BUSH, G. L. An evolutionary and applied perspective of insect biotypes. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 29, n. 3, p. 471-504, 1984.

DOMINGUES, F. A.; SILVA-BRANDÃO, K. L.; ABREU, A. G.; PERERA, O. P.; BLANCO, C. A.; CÔNSOLI, F. L.; OMOTO, C. Genetic structure and gene flow among brazilian populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Annapolis, v. 105, p. 2136-2146, 2012.

DRÈS, M.; MALLET, J. Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. **Philosophical Transactions – The Royal Society: Biological Sciences**, London, v. 357, p. 471-492, 2002.

DUAN, Y.; WU, Y.; LUO, L.; MIAO, J.; GONG, Z.; JIANG, Y.; LI, T. Genetic diversity and population structure of *Sitodiplosis mosellana* in Northern China. **Plos One**, California, v. 8, p. 1-12 (e78415), 2013.

ESPINOZA, J. L.; FUENTES-CONTRERAS, E.; BARROS, W.; RAMÍREZ, C. Utilización de microsatélites para la determinación de la variabilidad genética de la polilla de la manzana *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) en Chile Central. **Agricultura Técnica**, Chillán, v. 67, p. 244-252, 2007.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 14, p. 2611-2620, 2005.

FAIRLEY, T. L.; RENAUD, T. M.; CONN, J. E. Effects of local geographic barriers and latitude on population structure in *Anopheles punctipennis* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Annapolis, v. 37, p. 754- 760, 2000.

FAKRUDIN, B., VIJAYKUMAR, KAMBALPALLY, K. B., PATIL, B. V.; KURUVINASHETTI, M. S. DNA-based marker systems and their utility in entomology. **Entomologica Fennica**, Turku, v. 17, p. 21-33, 2006.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. **Molecular Ecology Notes**, London, v. 7, p. 574-578, 2007.

FELSENSTEIN, J. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). **Cladistics**, Malden, v. 5, p. 164-166, 1989.

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

FERREIRA, E. Fauna prejudicial. In: SANTOS, A. B. DOS; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. DE A. (Ed.). **A cultura do arroz no Brasil**. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. cap. 14, p. 485-560.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220 p.

FUENTES-CONTRERAS, E.; ESPINOZA, J. L.; LAVANDERO, B.; RAMIREZ, C. C. Population genetic structure of codling moth (Lepidoptera : Tortricidae) from apple orchards in central Chile. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, p. 190-198, 2008.

FUENTES-CONTRERAS, E.; BASOALTO, E.; FRANCK, P.; LAVANDERO, B.; KNIGHT, A. L.; RAMIREZ, C. C. Measuring local genetic variability in populations of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) across an unmanaged and commercial orchard interface. **Environmental Entomology**, College Park, v. 43, p. 520-527, 2014.

FUTUYMA, D. J.; PETERSON, S. C. Genetic variation in the use of resources by insects. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 30, p. 217-238, 1985.

FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética / FUNPEC, 2002. 631 p.

GOUDET, J. F_{STAT}:a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Version 2.9.3.2, 2001. Disponível em: < <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> >. Acesso em: 15 nov. 2014.

GROOT, A. T.; CLASSEN, A.; INGLIS, O.; BLANCO, C. A.; LÓPEZ, J. JR.; VARGAS, A.T.; SCHAL, C.; HECKEL, G.; SCHÖFL, G. Genetic differentiation across North

America in the generalist moth *Heliothis virescens* and the specialist *H. subflexa*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 20, p. 2676-2692, 2011.

GUICHOUX, E.; LAGACHE, L.; WAGNER, S.; CHAUMEIL, P.; LÉGER, P.; LEPAIS, O.; LEPOITTEVIN, C.; MALAUSA, T.; REVARDEL, E.; SALIN, F.; PETIT, R. J. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 11, p. 591-611, 2011.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações**. 4. ed. Editora Artmed: Porto Alegre, 2010.

HUBER, K.; SCHULDT, K.; RUDOLF, M.; MARKLEWITZ, M.; FONSECA, D. M.; KAUFMANN, C.; TSUDA, Y.; JUNGLEN, S.; KRÜGER, A.; BECKER, N.; TANNICH, E.; BECKER, S. C. Distribution and genetic structure of *Aedes japonicus japonicus* populations (Diptera: Culicidae) in Germany. **Parasitology Research**, Switzerland, v. 113, p. 3201-3210, 2014.

JAIN, S. K.; NEEKHRA, B.; PANDEY, D.; JAIN, K. RAPD marker system in insect study: A review. **Indian Journal of Biotechnology**, New Delhi, v. 9, p. 7-12, 2010.

Jl, Y.; ZHANG, D.; HEWITT, G. M.; KANG, L.; LI, D. M. Polymorphic microsatellite loci for the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and some remarks on their isolation. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, v. 3, p. 102-104, 2003.

JOYCE, A. L.; WHITE, W. H.; NUESSELY, G. S.; SOLIS, M. A.; SCHEFFER, S. J.; LEWIS, L. M.; MEDINA, R. F. Geographic population structure of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Crambidae), in the Southern United States. **Plos One**, California, v. 9, p. 1-10 (e110036), 2014.

JUN, T. H.; MICHEL, A. P.; WENGER, J. A.; KANG, S. T.; MIAN, M. A. R. Population genetic structure and genetic diversity of soybean aphid collections from the USA, South Korea, and Japan. **Genome**, Ottawa, v. 56, p. 345-350, 2013.

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L. Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. **Conservation Genetics**, Netherlands, v. 7, p. 991-995, 2006.

KARSTEN, M.; VAN VUUREN, B. J.; BARNAUD, A.; TERBLANCHE, J. S. Population genetics of *Ceratitis capitata* in South Africa: Implications for dispersal and pest management. **Plos One**, Califórnia, v. 8, p. 1-13 (e54281), 2013.

LAGISZ, M.; WOLFF, K.; SANDERSON, R. A.; LASKOWSKI, R. Genetic population structure of the ground beetle, *Pterostichus oblongopunctatus*, inhabiting a fragmented and polluted landscape: evidence for sex-biased dispersal. **Journal of Insect Science**, Madison, v. 10, p. 1-20, 2010.

LOPES, R.; LOPES, M. T. G.; FIGUEIRA, A. V. O.; CAMARGO, E. A.; FUNGARO, M. H. P.; CARNEIRO, M. S.; VIEIRA, M. L. C. Marcadores moleculares dominantes (RAPD E AFLP) - Aspectos técnicos e interpretação genética. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 29, p. 56-60, 2002.

- LOPES, D. A.; CANTAGALLI, L. B.; STUCHI, A. L. P. B.; MANGOLIN, C. A.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C. Population genetics of the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae). **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 36, p. 189-194, 2014.
- LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. **Ecological genetics: design, analysis, and application**. Oxford: Blackwell, 2005. 326 p.
- LIU, Y.; HOU, M.; WU, Y.; LIU, G. Population genetic analysis of the rice stem borer, *Chilo suppressalis*, in the South China. **Journal of Integrative Agriculture**, Beijing, v. 12, p. 1033-1041, 2013.
- MACHADO, V.; FIUZA, L. M. Evolução e manejo da resistência de insetos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 38, p. 68-74, 2010.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, Baltimore, v. 27, p. 209-220, 1967.
- MARTEL, C.; RÉJASSE, A.; ROUSSET, F.; BETHENOD, M. T.; BOURGUET, D. Host-plant associated genetic differentiation in Northern French populations of the European corn borer. **Heredity**, London, v. 90, p. 141-149, 2003.
- MARTINELLI, S.; BARATA, R. M.; ZUCCHI, M. I.; SILVA-FILHO, M. C.; OMOTO, C. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Annapolis, v. 99, p. 519-526, 2006.
- MARTINEZ, S. S.; CARVALHO, A. O. R.; VIEIRA, L. G. E.; NUNES, L. M.; BIANCHINI, A. Identification, geographical distribution and host plants of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotypes (Homoptera: Aleyrodidae) in the State of Parana, Brazil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 3, p. 597-603, 2000.
- MENG, X. F.; SHI, M.; CHEN, X. X. Population genetic structure of *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Crambidae): strong subdivision in China inferred from microsatellite markers and mtDNA gene sequences. **Molecular Ecology**, Oxford, v.17, p. 2880-2897, 2008.
- MICHEREFF, M. F. F. **Comportamento reprodutivo do bicho-mineiro-do-cafeeiro, *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae)**. 2000. 60 p. Tese (Doutorado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.
- MURTHY, M. S.; SANNAVEERAPPANAVAR, V. T.; SHANKARAPPA, K. S. Genetic diversity of diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Yponomeutidae: Lepidoptera) populations in India using RAPD markers. **Journal of Entomology**, New York, v. 11, p. 95-101, 2014.
- MUTURI, E. J.; KIM, C. H.; BALIRAIN, F. N.; MUSANI, S.; JACOB, B.; GITHURE, J. NOVAK, R. J. Population genetic structure of *Anopheles Arabiensis* (Diptera: Culicidae) in

a rice growing area of Central Kenya. **Journal Medical of Entomology**, Champaign, v. 47, p. 144-151, 2010.

NATER, A.; ARORA, N.; GREMINGER, M. P.; VAN SCHAIK, C. P.; SINGLETON, I.; WICH, S. A.; FREDRIKSSON, G.; PERWITASARI-FARAJALLAH, D.; PAMUNGKAS, J.; KRÜTZEN, M. Marked population structure and recent migration in the critically endangered sumatran orangutan (*Pongo abelii*). **Journal of Heredity**, Oxford, v. 1, p. 2-13, 2013.

NORGATE, M.; CHAMINGS, J.; PAVLOVA, A.; BULL, J. K.; MURRAY, N. D.; SUNNUCKS, P. Mitochondrial DNA indicates late Pleistocene divergence of populations of *Heteronympha merope*, an emerging model in environmental change biology. **Plos One**, California, v. 4, p. 1-13, 2009.

PAGE, R. D. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in Biosciences**, Oxford, v. 12, p. 357-358, 1996.

PALO, J.; VARVIO, S. L.; HANSKI, I.; VAINOLA, R. Developing microsatellite markers for insect population structure: complex variation in a checkerspot butterfly. **Hereditas**, Sweden, v. 123, p. 295-300, 1995.

PARK, S. D. E. **MStools**: Excel spreadsheet toolkit for data conversion. Version 3. 2001. Disponível em: <<http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit/>>. Acesso em: 6 nov. 2014.

PASHLEY, D. P.; HARDY, T. N.; HAMMOND, A. M.; MIHM, J. A. Genetic evidence for sibling species within the sugarcane borer (Lepidoptera: Pyralidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 83, p. 1048-1053, 1990.

PASHLEY, D. P.; HAMMOND, A. M.; HARDY, T. N. Reproductive isolating mechanisms in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of Entomological Society of America**, Lanham, v. 85, p. 400-405, 1992.

PAULS, S. U.; NOWAK, C.; BÁLINT, M.; PFENNINGER, M. The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 22, p. 925-946, 2013.

PAVINATO, V. A. C.; MARTINELLI, S.; LIMA, P. F. de; ZUCCHI, M. I.; OMOTO, C. Microsatellite markers for genetic studies of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Genetics Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, p. 370-380, 2013 a.

PAVINATO, V. A. C.; SILVA-BRANDÃO, K. L.; MONTEIRO, M.; ZUCCHI, M. I.; PINHEIRO, J. B.; DIAS, F. L. F.; OMOTO, C. Development and characterization of microsatellite loci for genetic studies of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Genetics Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, p. 1631-1635, 2013 b.

PAVINATO, V. A. C. **Variabilidade genética, estruturação populacional e busca de variação alélica em locos associados à adaptação inseto-planta em *Diatraea***

saccharalis (Fabr. 1794) (Lepidoptera: Crambidae). 2014. 149 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

PEÑA, C., WAHLBERG, N., WEINGARTNER, E., KODANDARAMAIAH, U., NYLIN, S., FREITAS, A.V.L.; BROWER, A.V. Z. Higher level phylogeny of *Satyrinae* butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) based on DNA sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Champaign, v. 40, p. 29-49, 2006.

PETIT, R. J.; EL MOUSADIK, A.; PONS, A. O. Identifying Populations for Conservation on the basis of genetic markers. **Conservation Biology**, Gainesville, v. 12, p. 844-855, 1998.

PINTO, A. S.; PARRA, J. R. P.; OLIVEIRA, H. N. **Guia ilustrado de pragas e insetos benéficos do milho e sorgo**. 1. ed. Ribeirão Preto, SP: A. S. Pinto, 2004. 108 p.

PINTO, A. S.; GARCIA, J. F.; OLIVEIRA, H. N.; ALMEIDA, J. E. M; ALVES, S. B. Manejo das principais pragas da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. (Ed.). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba, SP: ESALQ/USP, 2006. cap. 15, p. 257-280.

POLANCZYK, R. A.; ALMEIDA, L. C.; PADULLA, L.; ALVES, S. B. Pragas de cana-de-açúcar x Métodos alternativos de controle. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 14-17, 2004.

POWELL, W.; MORGANTE, M.; ANDRE, C.; HANAFEY, M.; VOGEL, J.; TINGEY, S.; RAFALSKI, A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular Breeding**, Belgium, v. 2, n. 3, p. 225-238, 1996.

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

PRUGH, L. R; HODGES, K. E.; SINCLAIR, A. R. E.; BRASHARES, J. S. Effect of habitat area and isolation on fragmented animal populations. **Proceedings of the National Academy Science of United State of America**, Washington, v. 105, p. 20770-20775, 2008.

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, Chicago, v. 43, p. 223-225, 1989.

RODERICK, G. K. Geographic structure insect populations: Gene flow, phylogeography, and their uses. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 41, p. 325-352, 1996.

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 8, p. 103-106, 2008.

RUNDLE, H. D.; NOSIL, P. Ecological speciation. **Ecology Letters**, Malden, v. 8, p. 336-352, 2005

SALINAS-HERNANDEZ, H.; SALDAMANDO- BENJUMEA, C. I. Haplotype identification within *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) corn and rice strains from Colombia, **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 40, p. 421-430, 2011.

SANCHEZ, J. A.; LA-SPINA, M.; GUIRAO, P.; CÁNOVAS, F. Inferring the population structure of *Myzus persicae* in diverse agroecosystems using microsatellite markers. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal , v. 103, p. 473-484, 2013.

SANDOVAL, S. S.; SENÔ, K. C. A. Comportamento e controle da *Diatraea saccharalis* na cultura da cana-de-açúcar. **Nucleus**, Ituverava, v.7, p. 243-258, 2010.

SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. **Chromosoma**, Basel, v. 109, p. 365-371, 2000.

SANTOS, A. B. dos; RABELO, R. R. **Cultivo de arroz irrigado no Estado do Tocantins**. Sistemas de Produção, n. 3, 2004. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrigadoTocantins/>>. Acesso em: 15 jan. 2015.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; CARVALHO, M. C. da C. G. de; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. A biotecnologia, o melhoramento e o manejo de pragas da soja. In: **Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2012. cap 11, p. 725-788.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology and Evolution**, Maryland Heights, v. 15, p. 199-203, 2000.

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

THYSSEN, P. J.; LESSINGER, A. C.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L.; LINHARES, A. X. The value of PCR-RFLP molecular markers for the differentiation of immature stages of two necrophagous flies (Diptera: Calliphoridae) of potential forensic importance. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 34, p. 777-784, 2005.

TORRIANI, M. V. G.; MAZZI, D.; HEIN, S.; DORN, S. Structured populations of the oriental fruit moth in an agricultural ecosystem. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, p. 2651-2660, 2010.

TSUTSUI, N. D.; SUAREZ, A. V.; HOLWAY, D. A.; CASE, T. J. Reduced genetic variation and the success of an invasive species. **Proceedings of the National Academy Science of United State of America**, Washington, v. 97, p. 5948-5953, 2000.

WAY, M. O., REAY-JONES, F. P. F.; REAGAN, T. E. Resistance to stem borers (Lepidoptera: Crambidae) among Texas rice cultivars. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, p. 1867-1876, 2006.

WEI, S.; SHI, B.; GONG, Y.; JIN, G.; CHEN, X.; MENG, X. Genetic structure and demographic history reveal migration of the diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from the Southern to Northern regions of China. **Plos One**, California, v. 8, p. 1-14, 2013.

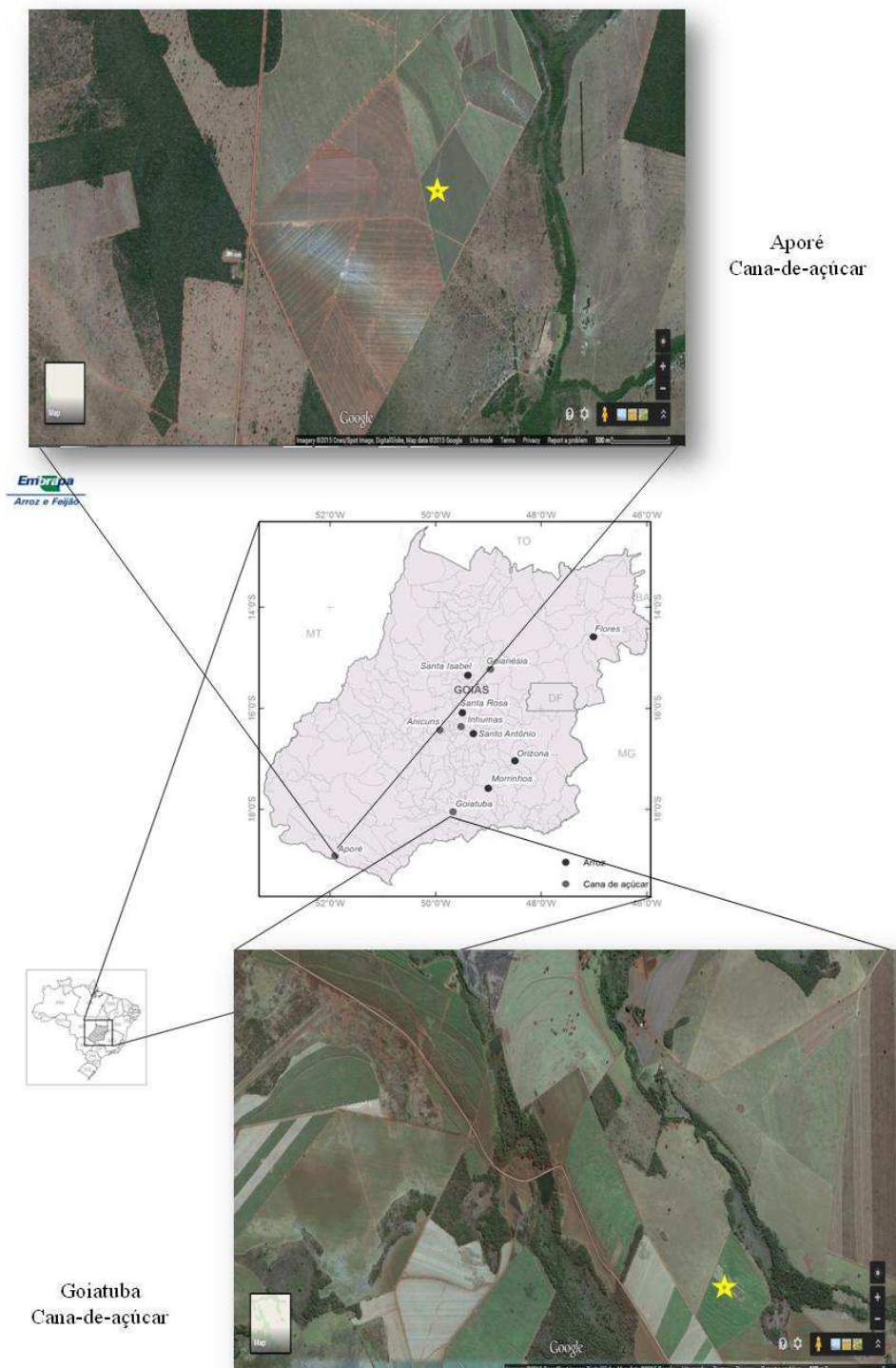
YANG, X. M.; SUN, J. T.; XUE, X. F.; LI, J. B.; HONG, X. Y. Invasion genetics of the western flower thrips in China: evidence for genetic bottleneck, hybridization and bridgehead effect. **Plos One**, California, v. 7, p. 1-11 (e34567), 2012.

ZHANG, De X. Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 19, p. 507-509, 2004.

ZHENG, Y.; PENG, X.; LIU, G.; PAN, H.; DORN, S.; CHEN, M. High Genetic diversity and structured populations of the oriental fruit moth in its range of origin. **Plos One**, California, v. 8, p. 1-12 (e78476), 2013.

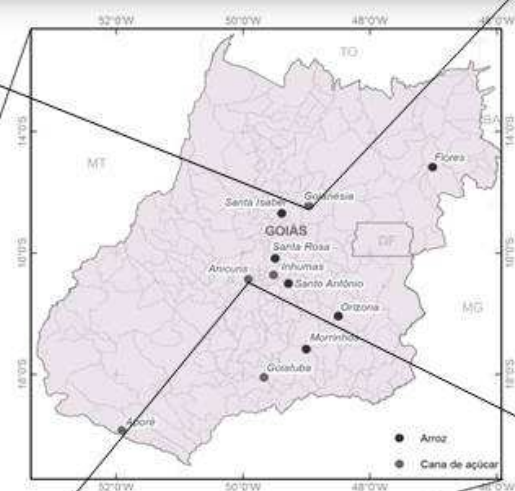
8. ANEXOS

Anexo A. Mapas dos municípios amostrados em diferentes áreas agrícolas no Brasil.

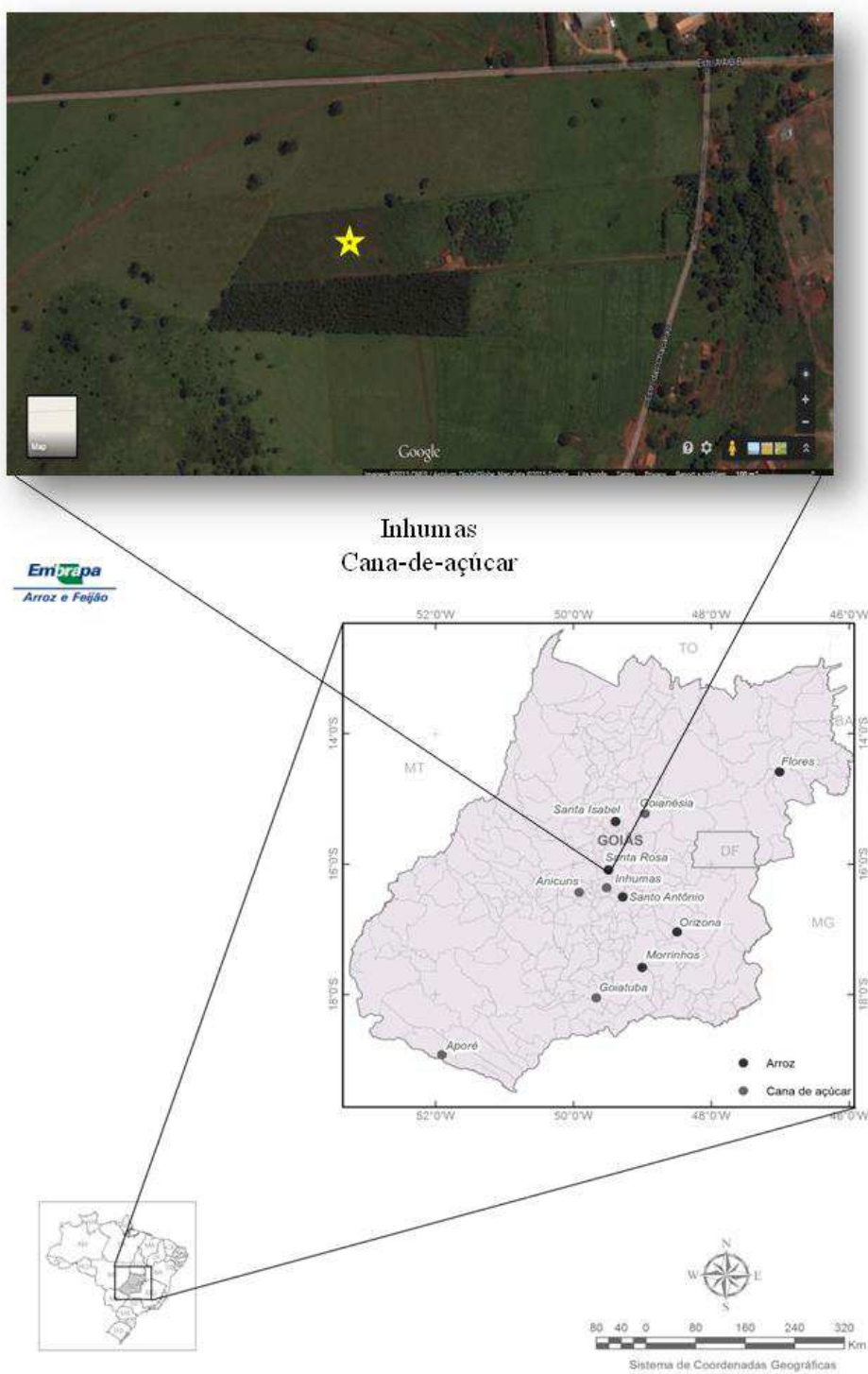




Goianésia
Cana-de-açúcar

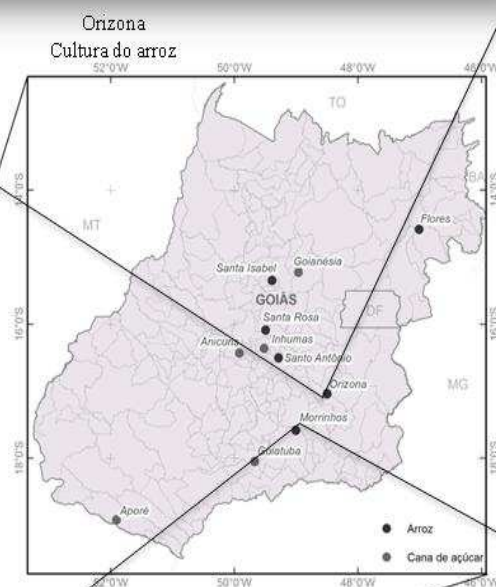


Anicuns
Cana-de-açúcar





Embrapa
Arroz e Feijão



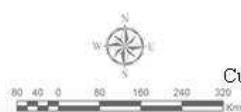
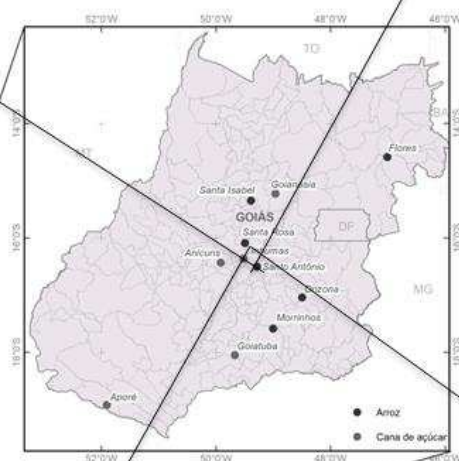
Morinhos
Cultura do arroz





Santo Antônio de Goiás
Cultura do arroz

Empresa
Arroz e Feijão



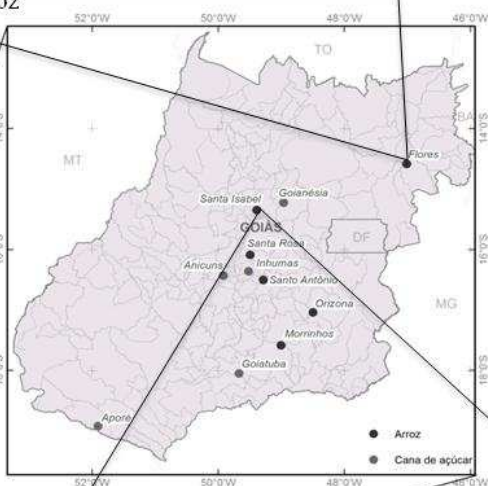
Santa Rosa
Cultura do arroz





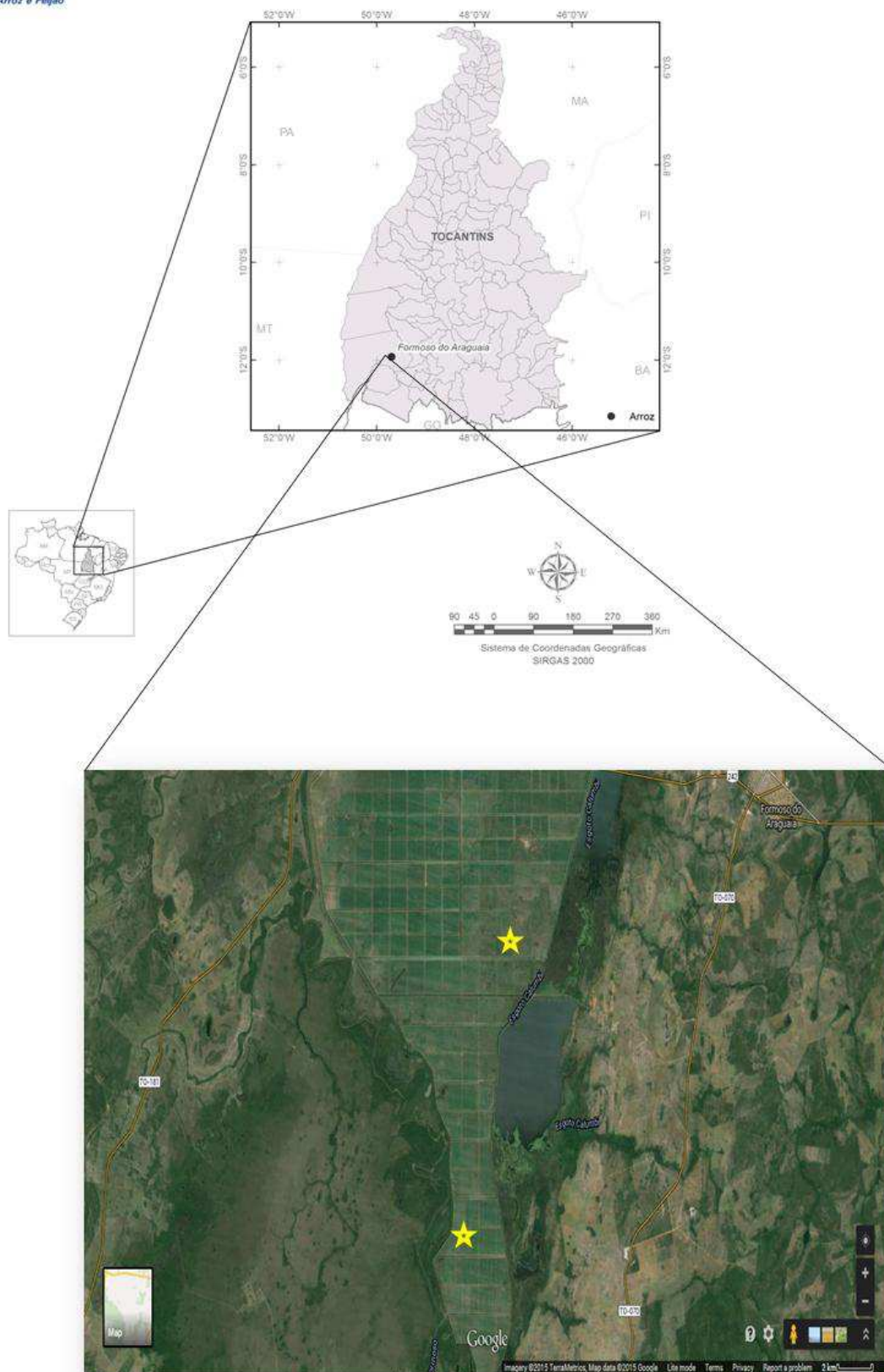
Flores de Goiás

Arroz

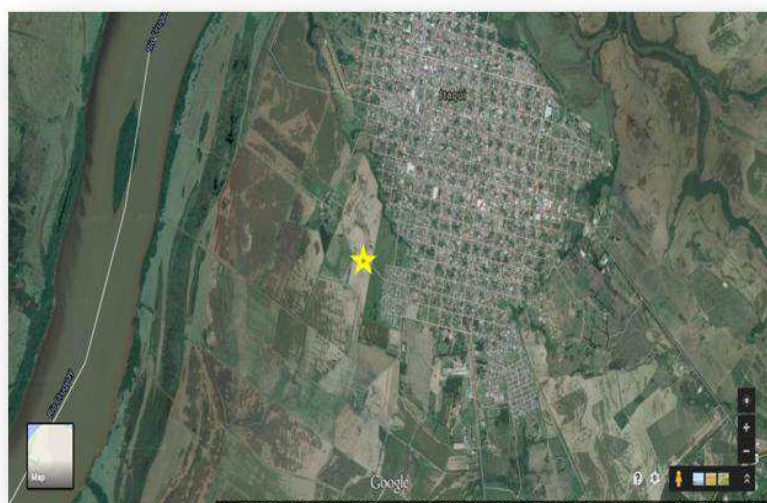
Embrapa
Arroz e Feijão

Santa Isabel

Arroz

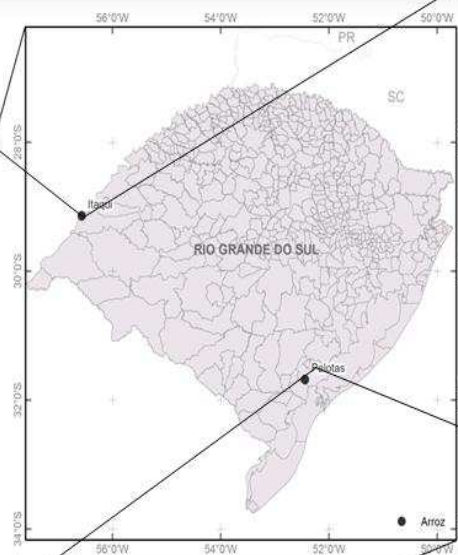


Formoso do Araguaia
Arroz



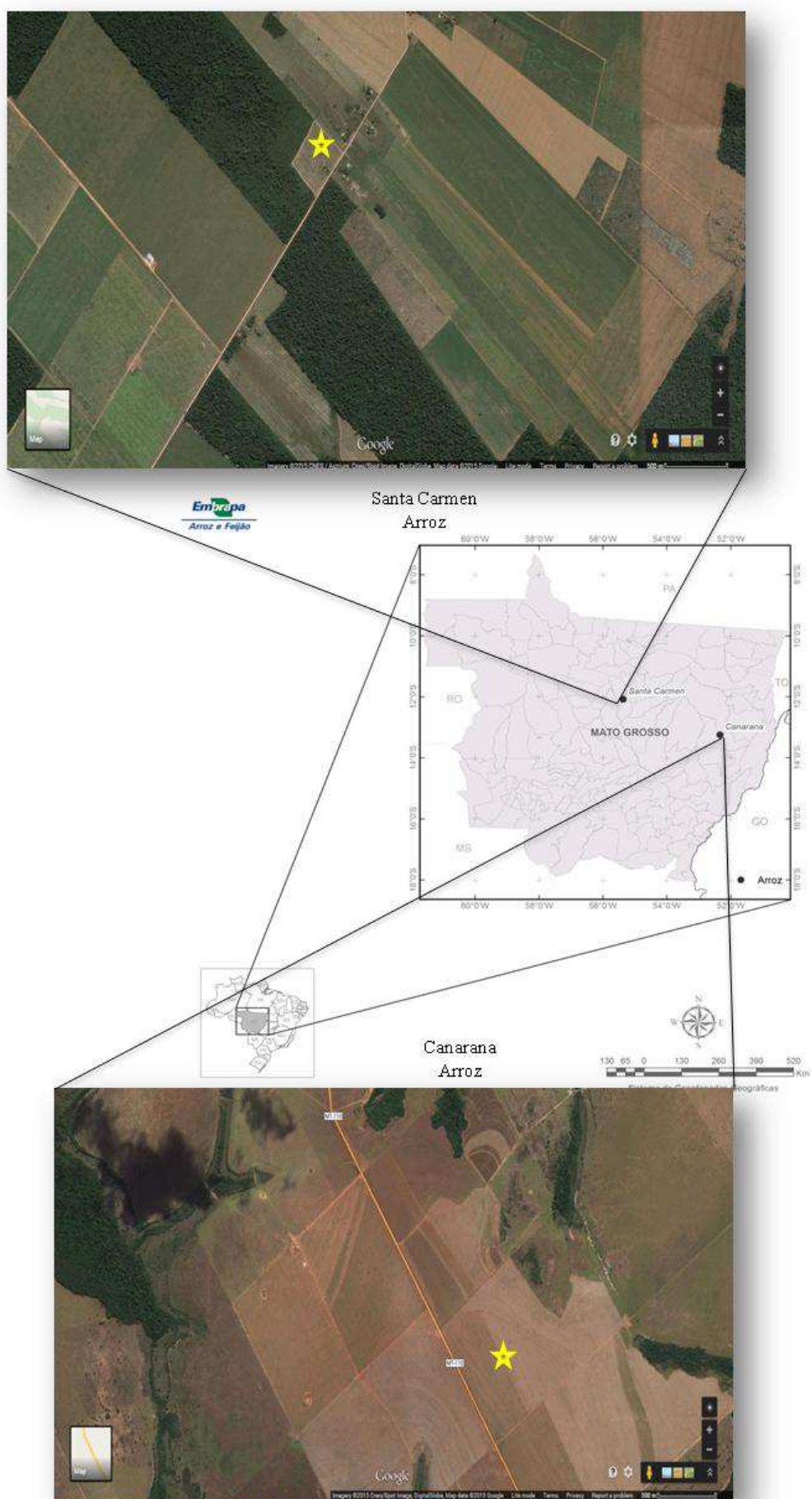
Itaquí
Arroz

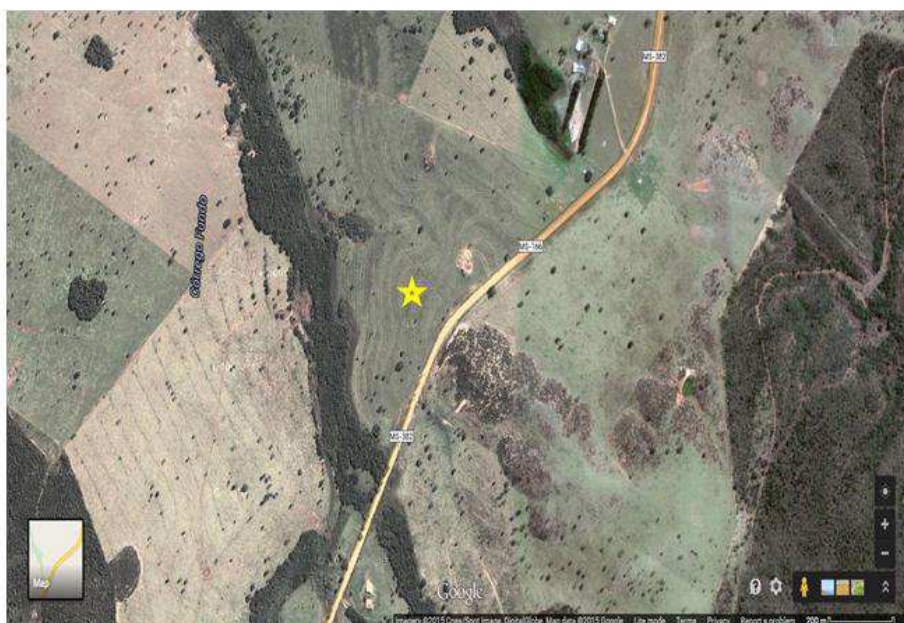
Embrapa
Arroz e Peão



Pelotas
Arroz

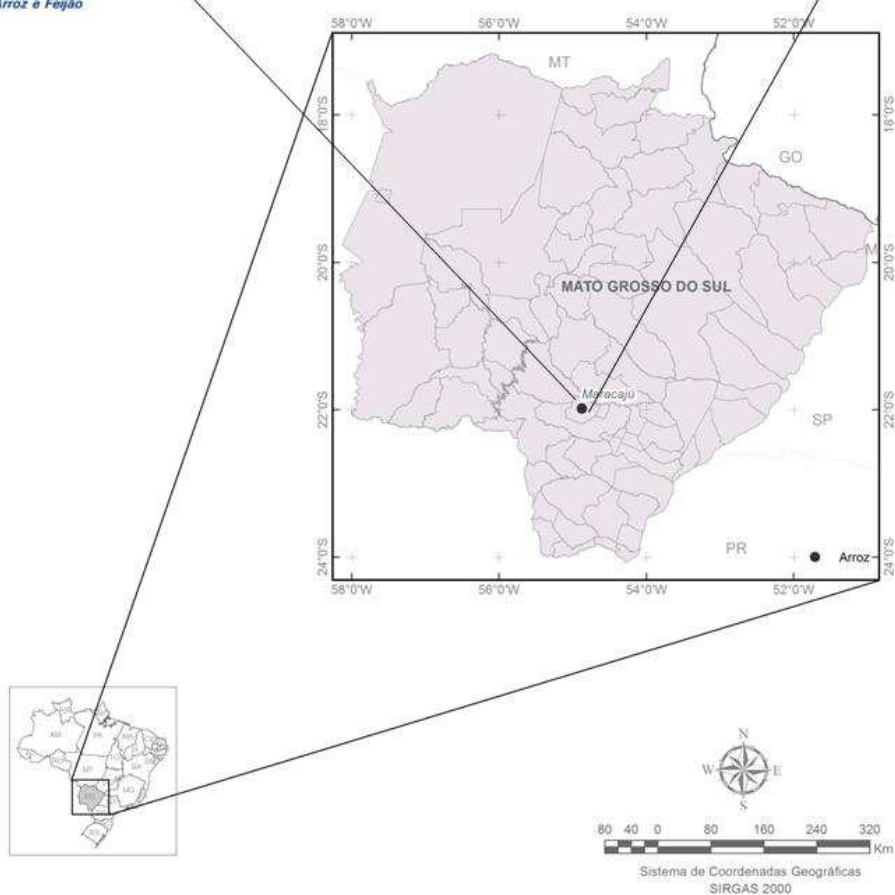






Maracajú
Arroz

Embrapa
Arroz e Feijão



Anexo B. Distâncias geográficas em quilometro par a par entre as dezessete populações de *D. saccharalis*.

Populações	An.	Ap.	Ca.	Fl.	F. A.	Gn.	Gb.	In.	It.	Ma.	Mo.	Oz	Pt	S. A.	S. C.	S. I.
Ap.	491,0															
Ca.	566,0	758,0														
Fl.	515,0	891,0	1062,0													
F. A.	643,0	1058,0	620,0	665,0												
Gn.	214,0	630,0	635,0	453,0	454,0											
Gb.	245,0	390,0	790,0	623,0	796,0	352,0										
In.	74,30	493,0	601,0	451,0	593,0	153,0	229,0									
It.	2047,0	1678,0	2428,0	2386,0	2706,0	2262,0	1933,0	2114,0								
Ma.	1004,0	570,0	1216,0	1446,0	1615,0	1185,0	922,0	1047,0	1327,0							
Mo.	212,0	429,0	776,0	563,0	751,0	307,0	54,80	176,0	1947,0	983,0						
Oz.	221,0	612,0	785,0	431,0	708,0	264,0	210,0	182,0	2090,0	1139,0	156,0					
Pt.	2354,0	2002,0	2606,0	2455,0	2783,0	2339,0	2010,0	2116,0	612,0	1452,0	2042,0	2092,0				
S. A.	103,0	479,0	696,0	433,0	601,0	157,0	204,0	36,30	2096,0	1033,0	158,0	156,0	2190,0			
S. C.	1156,0	1285,0	745,0	1639,0	1365,0	1272,0	1355,0	1191,0	2602,0	1368,0	1346,0	1375,0	2785,0	1223,0		
S. I.	234,0	665,0	594,0	501,0	455,0	51,90	406,0	184,0	2278,0	1220,0	361,0	299,0	2485,0	192,0	1257,0	
S. R.	112,0	531,0	599,0	458,0	562,0	122,0	260,0	35,70	2152,0	1086,0	223,0	194,0	2247,0	65,0	1189,0	153,0

Anexo C. Volumes (μL) dos *primers* utilizados em uma reação de PCR para a genotipagem dos indivíduos presentes nas dezessete populações de *D. saccharalis*.

<i>Primers</i>	Volume (μL)	<i>Primers</i>	Volume (μL)
Dsc 01	0,10	Dsc 10	0,05
Dsc 03	0,05	Dsc 11	0,05
Dsc 07	0,05	Dsc 13	0,10
Dsc 09	0,05	Dsc 20	0,05