

## IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E HIBRIDIZAÇÃO EM ENTRE OS BIOTIPOS DE *Spodoptera frugiperda*

Vilmar Machado<sup>1</sup>, Milena Wunder<sup>1</sup>, Vanessa D. Baldisera<sup>1</sup>, Jaime V. Oliveira<sup>2</sup> & Lidia M. Fiúza<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia - Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Cx. Postal 275 - CEP 93022-000. São Leopoldo, RS, Brazil. (machado@unisin.br)  
<sup>2</sup>. Instituto Riograndense do Arroz - IRGA

A lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*, J. E. Smith, 1797) ataca diversas culturas importantes em vários países desde a América do Sul até América do Norte, utilizando uma diversidade de plantas como hospedeiro. *S. frugiperda* foi registrada em 80 espécies de plantas pertencentes a 23 famílias diferentes (Giolo et al. 2002; Fernandes et al. 2002). Estudos populacionais indicaram a presença de duas linhagens, (milho e arroz) simpátricas e sem diferenças morfológicas, apesar da presença de diferenças bioquímicas, comportamentais e na resposta para diferentes agentes de controle químico e biológico. A linhagem do arroz apresenta maior susceptibilidade a inseticidas como o diazinom e carbaryl, enquanto a linhagem do milho é mais susceptível ao carbofuran; além disso, as larvas da linhagem do arroz apresentam maior susceptibilidade a *Bacillus thuringiensis*. (Adamczyk et al. 1997; Edwards et al. 1999).

As linhagens podem ser diferenciadas pela utilização de vários marcadores moleculares (Martineli et al. 2006). A clivagem com as enzimas de restrição Msp I e Sac, de um segmento de 569 pares de bases do gene para Citocromo Oxidase I (COI), produz haplótipos específicos denominados de "corn strain" e "rice strain" (Nagoshi et al. 2006a). O segmento FR, corresponde a uma seqüência de 189 pares de bases repetida em tandem e localizada nos cromossomos sexuais. A amplificação ou não dessa região por PCR permite identificar as duas linhagens; o haplótipo milho (FR-) caracteriza-se pela ausência ou presença de bandas inferiores a 400 pares de bases e o haplótipo arroz (FR+), pela presença de bandas superiores a 500 pares de bases (Nagoshi & Meagher 2003a,b).

Este trabalho analisou o potencial destes marcadores na identificação das linhagens de *S. frugiperda* e dos níveis de hibridização em populações do Rio Grande do Sul.

As formas imaturas obtidas nas culturas do milho foram coletadas em São Borja (17), Cachoeirinha (19) e Novo Hamburgo (20). Na cultura do arroz as coletas foram realizadas em São Borja (17) e Cachoeirinha (17). O DNA total foi extraído conforme protocolo padronizado por Sambrook *et al.* (1989). As reações de amplificação e clivagem seguiram o protocolo descrito por Levy et al. (2002). A identificação da seqüência FR foi realizada utilizando-se os primers FR-C e FR-2 descritos por Nagoshi & Meagher (2003 a, b).

As 34 larvas provenientes de populações da cultura do arroz apresentaram o haplótipo Mt<sup>R</sup> típico das linhagens que atacam essa cultura. Nas 56 larvas provenientes de populações da cultura do milho foram encontradas 9 larvas com o haplótipo típico do arroz (Mt<sup>R</sup>): 6 em São Borja (35%), 1 em Cachoeirinha (5,2%) e 2 em Novo Hamburgo (10%). No total, 16,7% dos indivíduos encontrados nas plantações de milho apresentaram o haplótipo Mt<sup>R</sup>. Os resultados obtidos pela clivagem das amostras com a enzima Sac I são similares aos observados pela clivagem com Msp I. Em geral, os espécimes identificados como portadores do haplótipo típico da linhagem do arroz com a enzima Msp I, são clivados pela Sac I, o que não acontece quando o haplótipo foi identificado como pertencente à linhagem do milho (Tabela 1). A freqüência do segmento FR nas amostras da cultura do milho variou entre 23 e 40%. Nas amostras da cultura do arroz a freqüência foi elevada, sempre acima de 82%. O percentual de larvas coletadas na cultura do arroz que não apresentaram o fragmento FR variou entre 11,8 e 17,7%

**Tabela 1.** Freqüência dos haplótipos milho ( $Mt^C$ ) e arroz ( $Mt^R$ ) nas populações analisadas de *Spodoptera frugiperda*.

Local	Cultura	n	$Mt^R$	$Mt^C$
São Borja	Arroz	17	17 (100%)	0.0
	Milho	17	06 (35%)	11 (65%)
Cachoeirinha	Arroz	17	17 (100%)	0.0
	Milho	19	01 (5,0%)	19 (95%)
Novo Hamburgo	Milho	20	02 (10%)	17 (85%)

Os resultados obtidos para cromossomos sexuais são compatíveis com duas explicações: diferenças na especificidade para hospedeiro entre as linhagens com maior fidelidade na linhagem do milho e hibridização assimétrica, com as fêmeas da linhagem de arroz mais receptivas aos machos da linhagem do milho do que as fêmeas da linhagem do milho aos machos da linhagem do arroz. Neste caso, como o marcador utilizado é mitocondrial, os indivíduos com haplótipo  $Mt^R$  presentes na cultura do milho seriam híbridos resultantes do cruzamento entre fêmeas do arroz e machos do milho (Nagoshi & Meagher 2003a,b; 2006 a,b). Segundo estes autores, a hibridização afetaria a especificidade para o hospedeiro.

Os resultados obtidos para esse marcador de cromossomo sexual indicam a presença do segmento FR em alta freqüência em larvas da linhagem do milho e, muitas das larvas com o haplótipo mitocondrial do arroz não apresentaram esse segmento. Uma explicação possível, é que as populações destas linhagens apresentam um polimorfismo associado ao fragmento FR com variação espacial na freqüência do fragmento. Nesta hipótese, não há uma correspondência entre o marcador para cromossomo sexual e os marcadores mitocondriais como sugerido por LU et al. (1994). Portanto as configurações  $Mt^C$ FR+ e  $Mt^R$ FR- não podem ser utilizadas para estimar níveis de hibridização entre as linhagens. Por outro lado, se a presença do segmento FR+ em linhagens do milho é resultante da ocorrência de hibridização, as configurações  $Mt^C$ FR+ e  $Mt^R$ FR- podem ser produzidas após duas gerações de hibridização.

Nossos resultados estão de acordo com estudos de laboratório que demonstram a compatibilidade reprodutiva das duas linhagens de *S. frugiperda*, mas em ambientes naturais o cruzamento entre elas é limitado por fatores ambientais (Pashley et al. 1992; NAGOSHI et al. 2006a). Os níveis de hibridização encontrados entre as linhagens de *S. frugiperda* indicam que estas não podem ser utilizadas como exemplo de biótipos representando espécies crípticas (Drès & Mallet, 2002). Porém, de acordo com os critérios destacados pelos autores, são linhagens adaptadas a diferentes hospedeiros.

Os diferentes níveis de hibridização registrados em *S. frugiperda* podem estar associados ao tempo de ocorrência da sobreposição na área de distribuição das linhagens, em grande parte influenciada pela expansão da cultura do milho e do arroz nas Américas. A expansão destas culturas contribui para o processo de hibridização, gerando um padrão de hibridização diferente do que ocorre na maioria das espécies ou linhagens que evoluem alopaticamente e entram em contato em algumas áreas, formando as zonas de hibridização definidas.

A análise dos níveis e dos resultados do processo de hibridização entre as linhagens de *S. frugiperda* são relevantes para programas de controle e manejo, especialmente, se considerarmos que as duas linhagens diferem na susceptibilidade a diferentes agentes de controle. Esse aspecto é mais relevante ainda, se considerarmos, expansão das áreas cultivadas com plantas-Bt e que as duas linhagens de *S. frugiperda* ocorrem em várias destas culturas. Portanto, a possibilidade de fluxo entre as linhagens de *S. frugiperda* tem impactos significantes para programas de manejo da evolução da resistência. Nesse contexto, um aspecto importante é monitorar os níveis de fluxo gênico entre as linhagens e definir o quanto essas diferem aos diferentes agentes de controle.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamczyk, J.J.; J.W. Holloway; B.R. Leonard & J.B. Graves. 1997. Susceptibility of fall armyworm collected from different plant hosts to selected insecticides and transgenic bt cotton. **Journal of Cotton Science**, Bossier, 1:21-28.
- Dres, M. & J. Mallet. 2002. Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B**, London, 357: 471-492.
- Edwards, L.M.; J.L.H. Mendoza; A.P. Rubio; J.M. Ochoa & R.L. Gutiérrez. 1999. Biological differences between five populations of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) collected from corn in Mexico. **Florida Entomologist**, Florida, 82 (2): 254-262.
- Fernandes, M.G.; A.C. Busoli & J.C. Barbosa. 2002. Distribuição espacial de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) em algodoeiro. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, 8 (3): 203-211.
- Giolo, F.P.; A.D. Grützmacher; M.S. Garcia & G.R. Busato. 2002. Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lep.: Noctuidae) oriundas de diferentes localidades e hospedeiros. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, 8 (3): 219-224.
- Levy, H.C.; A. Garcia-Muruniak & J.E. Muruniak. 2002. Strain identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) insects and cell line: PCR-RFLP of cytochrome oxidase C subunit I gene. **Florida Entomologist**, Florida, 85 (1): 186-190.
- Lu, Y.J.; G. D. Kochert; D. J. Isenhour & M. J. Adang. 1994. Molecular characterization of a strain-specific repeated DNA sequence in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Molecular Biology**, London, 3:123-130.
- Martinelli, S.; R.M. Barata; M.I. Zuch.; M.C. Silva-Filho & C. Omoto. 2006. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Baltimore, 99 (2): 519-526.
- Nagoshi, R.N. & R. Meagher. 2003a. Fall armyworm FR sequences map to sex chromosomes and their distribution in the wild indicate limitations in interstrain mating. **Insect Molecular Biology**, London, 12 (5): 453-458.
- Nagoshi, R.N. & R. Meagher. 2003b. RF tandem-repeat sequence in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. **Annals Entomological Society of America**, Baltimore, 96 (3): 329-335.
- Nagoshi, R.N.; R.L. Meagher; G. Nuessly & D. Hall. 2006a. Effects of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Interstrain Mating in Wild Populations. **Environmental Entomology**, Washington DC, 35(2): 561-568.
- Nagoshi, R.N.; R.L. Meagher; J.J. Adamczyk; Jr. S. K. Braman; R. L. Brandenburg & G. Nuessly. 2006b. New Restriction Fragment Length Polymorphisms in the Cytochrome Oxidase I Gene Facilitate Host Strain Identification of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Populations in the Southeastern United States. **Journal of Economic Entomology**, Florida, 99: 671-677.
- Pashley, D.P. & L.D. KE. 1992. Sequence evolution in mitochondrial ribosomal and ND-1 genes in Lepidoptera: implications for phylogenetic analyses. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, 9(6): 1061-1075.
- Sambrook, J.; E. Fritsch & T. Maniatis. 1989. **Molecular cloning. A laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.