



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRENDA RAFAELLA DA SILVA MAGALHÃES

**APLICAÇÃO DE DIFERENTES MARCADORES
CITOGENÉTICOS E MOLECULARES NO ESTUDO DE DUAS
PRAGAS DA SOJA:
ANTICARSIA GEMMATALIS E *CHRYSODEIXIS INCLUDENS***

Londrina
2018

BRENDA RAFAELLA DA SILVA MAGALHÃES

**APLICAÇÃO DE DIFERENTES MARCADORES
CITOGENÉTICOS E MOLECULARES NO ESTUDO DE DUAS
PRAGAS DA SOJA:**

ANTICARSIA GEMMATALIS E CHRYSODEIXIS INCLUDENS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Renata da Rosa.

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Magalhães, Brenda Rafaella da Silva.

Aplicação de diferentes marcadores citogenéticos e moleculares no estudo de duas pragas da soja : *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens* / Brenda Rafaella da Silva Magalhães. - Londrina, 2018.
57 f. : il.

Orientador: Renata da Rosa.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Lepidoptera - Tese. 2. COI - Tese. 3. FISH - Tese. 4. Citotaxonomia - Tese. I. Rosa, Renata da. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

BRENDA RAFAELLA DA SILVA MAGALHÃES

**APLICAÇÃO DE DIFERENTES MARCADORES CITOGENÉTICOS E
MOLECULARES NO ESTUDO DE DUAS PRAGAS DA SOJA:
ANTICARSIA GEMMATALIS E *CHRYSODEIXIS INCLUDENS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Renata da Rosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Lucia Giuliano Caetano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Luciana Andreia Borin de Carvalho
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 21 de fevereiro de 2018.

*Dedico esse trabalho aos meus pais pela melhor herança que um filho
pode receber, o amor incondicional.*

“ É a teoria que decide o que podemos observar”.

Albert Einstein (1879-1955)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Universidade Estadual de Londrina, especialmente ao Programa de Genética e Biologia Molecular pela oportunidade de aprimoramento da minha formação intelectual, profissional e pessoal e pelo apoio oferecido pela coordenação do curso.

À coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo financiamento do estudo.

À minha orientadora, Dr^a. Renata da Rosa, pela amizade e confiança. Agradeço pelos valiosos ensinamentos transmitidos durante esses dois anos, pela força, sensibilidade e compreensão. Obrigada por ter me recebido de braços abertos, me acolhido e por mostrar que pesquisa pode ser realizada com competência e doçura.

Às professoras Dr^a. Ana Lúcia Dias, Dr^a. Lúcia Giuliano Caetano e Dr^a. Fernanda Simões de Almeida por todo auxílio para o desenvolvimento do trabalho, pelas aulas ministradas cheias de atenção e sabedoria bem como pelas preciosas argumentações referente à qualificação do mesmo trabalho.

À professora Dr^a. Claudete de Fátima Ruas e toda equipe, principalmente ao Dr. Lucas Milanez Benício por toda ajuda e pela amizade.

Aos técnicos Melissa, Dario pela ajuda oferecida no laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Animal e de outros laboratórios do programa, especialmente à Jaqueline, pela convivência, auxílio no desenvolvimento do trabalho e amizade.

Aos professores Doutores que me ensinaram a diferença entre professor e educador, principalmente aos da Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, pelos bons momentos de ensinamentos compartilhados nas disciplinas e que sempre me receberam de braços abertos e dispostos a ensinar.

À Dr^a. Joana Baldissera pela atenção e disponibilidade constante em ajudar e pela contribuição na correção do trabalho. Obrigada pelas críticas construtivas durante minha caminhada.

Ao Dr. Daniel Sosa-Gomez por disponibilizar os insetos para a realização do trabalho e aos seus técnicos e assistente, principalmente ao Fábio, pela manutenção e disponibilidade dos animais.

Aos responsáveis pela minha existência, meus pais, Horácio e Simoni que me ensinaram os reais valores do ser humano e que me suportam nos bons e maus momentos e pela melhor herança que um filho pode receber, o amor incondicional.

Aos meus avós maternos, Neusa e Rafael (*in memoriam*) por todo carinho a mim

dedicado e por tornar minha infância tão alegre. À minha tia Cláudia por sua atenção e carinho e ao seu filho, meu primo Alexandre pela convivência de primo-irmão.

Ao meu namorado Edgar pela compreensão, pelo companheirismo, pelo carinho e pelo respeito. Por ser meu melhor amigo e calmante.

Aos meus amigos-irmãos, Fernanda, Bruno, Márcio pela atenção e companheirismo.

À minha amiga Mariane, minha amiga que o destino trouxe e que desde então tem sido extremamente valorosa e dedicada em nossa amizade. Para você uma só palavra: Gratidão.

À minha amiga Eneida por sua amizade, atenção e paciência por me ensinar muito tanto, sobre assuntos da vida acadêmica e profissional como pessoal.

À Deus pela proteção e por permitir ser o que SOU, iluminando e conduzindo os meus passos.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Gratidão!

MAGALHÃES, Brenda Rafaella da Silva. **Aplicação de diferentes marcadores citogenéticos e moleculares no estudo de duas pragas da soja: *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens***. 2018. 57f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Anticarsia gemmatalis (Hübner, 1818) e *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) são espécies de lepidópteros, causadores de grandes danos nas lavouras de soja no Brasil. Estima-se que de 37% da safra perdida, aproximadamente 13% seja devido ao ataque desses insetos. Apesar dessa importância, os estudos sobre a organização cromossômica dessas espécies são inexistentes recentemente, *A. gemmatalis*, que pertencia a família Noctuidae juntamente com *C. includens*, foi alocada na família Erebidae. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi analisar por meio de marcadores genéticos convencionais e moleculares, exemplares de ambas espécies. Adicionalmente, foi realizada uma análise do gene citocromo oxidase subunidade I (COI) de *A. gemmatalis*, afim de avaliar a sua nova classificação taxonômica. Foi observado um $2n = 62$, com sistema sexual ZZ/ZW e cromossomos holocinéticos para as duas espécies. Houve uma homogeneidade no número de sítios do DNAr 18S para ambas. Entretanto, variações na distribuição da heterocromatina foram observadas. A heterocromatina é constituída de sequências repetitivas, comumente formada por elementos transponíveis. Além de proteger o genoma de eventos mutagênicos, a heterocromatina também é portadora de sequências altamente importantes na organização de estruturas cromossômicas como os centrômeros e os telômeros. A análise de um único marcador molecular, o COI de *A. gemmatalis*, permitiu concluir que não há diferenças consistentes entre as populações analisadas referentes somente ao gene mitocondrial. As análises citogenéticas permitiram separar as espécies em relação a heterocromatina, identificadas tanto no bandamento-C quanto nos fluorocromos base-específicos, corroborando o posicionamento de *A. gemmatalis*, da família Noctuidae para Erebidae, sugerindo novas características, não mais somente morfológicas ou relacionada à genes mitocondriais e nucleares mas também citogenéticas referente a espécies classificadas como Erebidae e Noctuidae.

Palavras-chave: Lepidoptera. Erebidae. Noctuidae. FISH. COI. Citotaxonomia.

MAGALHÃES, Brenda Rafaella da Silva. **Application of different cytogenetic and molecular markers in the study of two soybean pests: *Anticarsia gemmatalis* and *Chrysodeixis includens***. 2018. 57p. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Anticarsia gemmatalis (Hübner, 1818) and *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) are lepidopteran species, which cause great damage to soybean crops in Brazil. It is estimated that of 37% of the crop lost, approximately 13% is due to insect attack. Despite the importance, studies on chromosome organization are non-existent species, *A. gemmatalis*, which belonged to the family Noctuidae together with *C. includens*, was allocated in the Erebidae family. Therefore, the objective of this work was analyzed by means of conventional and molecular genetic markers, exemplars of both species. In addition, an analysis of the gene cytochrome oxidase I subunit I (COI) of *A. gemmatalis* was carried out, in order to evaluate its new taxonomic classification. It was observed a $2n = 62$, with ZZ / ZW sexual system and holokinetic chromosomes for both species. There was a non-homogeneity of 18S rDNA sites for both. However, variations in heterochromatin distribution were observed. A heterochromatin is made up of repetitive sequences, commonly consisting of transposable elements. In addition to protecting the genome from mutagenic events, a heterochromatin also carries highly important sequences in the organization of chromosomal structures such as the centromere and the telomeres. An analysis of a single molecular marker, the COI of *A. gemmatalis*, has led to the conclusion that there are no consistent populations analyzed for the mitochondrial gene. As cytogenetic analyzes allowed to separate as species in relation to heterochromatin, identified both without C-bandage and in the base-specific fluorochromes, corroborating the positioning of *A. gemmatalis*, from the family Noctuidae to Erebidae, suggesting new characteristics, no longer only morphological or related to mitochondrial and nuclear genes but also cytogenetic for species classified as Erebidae and Noctuidae.

Keywords: Lepidoptera. Erebidae. Noctuidae. FISH. COI. Cytotaxonomy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Anticarsia gemmatalis* (a-d) e *C. includens* (e-g) em diferentes estágios do ciclo de vida. a Lagarta de *A. gemmatalis* (aproximadamente 3º ínstar); b e c Lagarta de *A. gemmatalis* (aproximadamente 5º ínstar); d *A. gemmatalis* adulta, com linha diagonal que une primeiro par de asas; e *C. includens* em estado larval (aproximadamente 5º ínstar); f *C. includens* adulta com duas manchas prateadas no centro do primeiro par de asas; g Dano causado pela desfolha de *C. includens*. Fonte: SOSA-GÓMEZ et al., 2014..... 18
- Artigo científico**
- Figura 1.** Prancha de *A. gemmatalis*. (A) Paquíteno corado com Giemsa; (B) Metáfase II de macho corada com Giemsa; (C) Anáfase II corada com Giemsa; (D) Metáfase II de fêmea corada com Giemsa; (E) Paquíteno com bandamento-C; (F) Metáfase II de macho com bandamento-C; (G) Metáfase I corada com CMA₃; (H) Núcleo interfásico corado com CMA₃; (I) Metáfase I corada com DAPI; (J) Núcleo interfásico corado com DAPI; (K) Núcleo interfásico após Hibridização Fluorescente *in situ* com sonda de DNAr 18S marcada com biotina e contra-corado com DAPI. Setas e cabeças de setas representam marcações positivas em bandamento-C, CMA₃/DAPI e FISH..... 39
- Figura 2.** Prancha de *C. includens*. (A) Paquíteno corado com Giemsa; (B) Metáfase II corada com Giemsa; (C) Paquíteno com bandamento-C; (D) Metáfase II com bandamento-C; (E) Metáfase II corada com CMA₃; (F) Núcleo interfásico corado com CMA₃; (G) Metáfase II corada com DAPI; (H) Núcleo interfásico corado com DAPI; (I) Núcleo interfásico após Hibridização Fluorescente *in situ* com sonda de DNAr 18S marcada com biotina e contra-corado com Iodeto de Propídeo. Setas e cabeças de setas representam marcações positivas em bandamento-C, CMA₃/DAPI e FISH..... 40
- Figura 3.** (A) *Blast* da sequência parcial de DNAr 18S (B) Sequência parcial obtida pelo sequenciamento de DNAr 18S 41
- Figura 4.** Eletroforese (agarose 1%) para visualização dos produtos de PCR de *A. gemmatalis*. À esquerda, “M”= marcador molecular de 1 kb; 1 à 10 = espécimes coletadas em Londrina, PR – Brasil..... 42
- Figura 5.** Cladograma representando distância genética (K2P) de diferentes populações de *A. gemmatalis*. Espécimes coletados em Morrinhos/GO, Campo Verde/MT, Mauá da Serra/PR e Londrina/PR. Grupo externo representado por *Bombyx mori*..... 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micromol
A	Adenina
Ba(OH) ₂ ·8H ₂ O	Hidróxido de bário
BS	<i>Bootstrap</i>
BSA	Albumina do soro bovino (do inglês: Bovine serum albumin)
bp	Pares de base (do inglês: base pair)
°C	Graus Celsius
C	Citosina
CMA ₃	Cromomicina A ₃
COI	Citocromo c oxidase
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octano
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNA _g	Ácido desoxirribonucléico genômico
DNA _r	Ácido desoxirribonucléico ribossômico
DNA _{mt}	Ácido desoxirribonucléico mitocondrial
DNA _{pol}	Ácido desoxirribonucléico polimerase
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (do inglês: Fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês: Fluorescein isothiocyanate)
g	Gramma
G	Guanina
g/mol	Gramma/mol
H ₂ O	Água
HCl	Ácido Clorídrico
MI	Meiose I
MII	Meiose II

MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mg	Miligrama
mL	Mililitros
Milli-Q	Água deionizada pelo sistema Milipore
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
ng	Nanograma
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês: Polymerase chain reaction)
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucléico
RONs	Regiões organizadoras nucleolares
RPM	Rotações por minuto
SSC	Saline-Sodium Citrate Buffer
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês sodium dodecyl sulfate)
T	Timina
<i>Taq</i> DNApol	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polimerase
Tris	Tris (Hidroximetil) aminometano
U	Uracila

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. ASPECTOS GERAIS TAXONÔMICOS E BIOLÓGICOS	14
2.2.1 <i>Anticarsia gemmatalis</i> e <i>Chrysodeixis includens</i>	16
2.2. ASPECTOS CITOGENÉTICOS DA ORDEM LEPIDOPTERA.....	19
2.3. HETEROCROMATINA.....	20
2.4. MARCADORES MOLECULARES: COI	21
3. OBJETIVOS	22
3.1. OBJETIVO GERAL	22
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. CAPÍTULO 1 – ARTIGO CIENTÍFICO	23
RESUMO	24
INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS	27
MATERIAL BIOLÓGICO E PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS	27
BANDAMENTO C E FLUOROCROMOS	27
EXTRAÇÃO DE DNA	27
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO DNAr 18S E COI.....	27
HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH)	28
FOTODOCUMENTAÇÃO DOS RESULTADOS	29
RESULTADOS	29
CITOGENÉTICA DE <i>A. GEMMATALIS</i> E <i>C. INCLUDENS</i>	29
GENE DO CITOCROMO C OXIDASE SUBUNIDADE I (COI)	31
DISCUSSÃO	31
CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS	45
<i>Apêndices</i>	50
APÊNDICE 1 - Sequência consenso fragmento de DNAr 18S	51
APÊNDICE 2 - Sequência consenso do fragmento de COI.....	54
APÊNDICE 3 - Gel de eletroforese 1% verificando a amplificação de DNAr 18S.....	57

1 1. INTRODUÇÃO

2

3 A soja, *Glycine max*, pertencente a família Fabaceae, é uma planta herbácea, de
4 fecundação autógama, cuja estatura varia com as condições do ambiente e da cultivar,
5 apresentando-se entre 60 a 110 cm de altura, o que em lavouras comerciais facilita a colheita
6 mecânica e evita o acamamento (NEPOMUCENO; FARIAS; NEUMAIER, 2008).

7 De acordo com Sediya (2009), a soja possui altos valores nutricionais, utilizadas
8 tanto no consumo animal, através do farelo de soja, quanto para o consumo humano, através de óleo
9 e proteína (FISCHER, 2014). Devido à sua importância econômica, a soja é destaque mundial entre
10 investidores e agricultores e dados do Departamento de Agricultura Americano (USDA) estimam
11 que a safra do Brasil em 2018 aumente de 2 milhões de toneladas para 110 milhões, reflexo das
12 estimativas de maior rendimento por aumento de área produzida. No Brasil, a estimativa de
13 rendimento para a safra de 2017/2018, se confirmada, será a segunda melhor produtividade do país,
14 maior do que uma produtividade de 3.364 kg/ha (CONAB, 2018).

15 A soja é a principal cultura das lavouras no Brasil e, devido à sua rentabilidade, tem
16 ocupado lugar de outras culturas, avançando principalmente sobre áreas de pastagens que têm sido
17 convertidas para o cultivo de grãos e pelos altos investimentos por parte dos produtores (CONAB,
18 2017). Em âmbito nacional, o maior produtor de soja brasileiro é o estado do Mato Grosso, seguido
19 do Paraná e do Rio Grande do Sul (EMBRAPA, 2016).

20 Todos os estágios de desenvolvimento, desde a germinação à colheita e da raiz às folhas
21 da soja, estão sujeitos ao ataque de insetos (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; DEGRANDE;
22 VIVAN, 2012).

23 Buscando sanar as “pragas da lavoura” (insetos, fungos ou erva-daninha), muitos
24 agricultores recorrem ao uso de agrotóxicos, muitas vezes manejando-os de forma indevida,
25 causando contaminação agrotóxica do solo, do meio ambiente, da lavoura, dos trabalhadores e da
26 população do entorno (TRAVISI et al., 2006; PIGNATI; OLIVEIRA; DA SILVA, 2014). Essas
27 contaminações alimentares, ocupacionais e ambientais podem gerar danos irreversíveis por
28 alterações dos ecossistemas, intoxicações agudas e crônicas e degradações do solo e dos sistemas
29 hídricos (FISHER, 2014).

30 Um inseto só pode ser considerado praga quando atinge um índice de dano econômico
31 para uma determinada cultura, cujo prejuízo pode ser em quantidade ou qualidade, dependendo da
32 espécie, do tamanho populacional da praga, da fase de desenvolvimento, da estrutura vegetal

1

33 atacada e da duração do ataque, implicando na redução da produtividade e na elevação dos custos
34 das produções (PANIZZI et al., 1977; ROSSETTO; SANTIAGO, 2008; CORRÊA-FERREIRA et
35 al., 2010).

36 O Manejo Integrado de Pragas (MIP) é uma estratégia que evita que insetos e outros
37 organismos fitófagos causem danos às cultivares objetivando resultados econômicos e ecológicos
38 aceitáveis, e dessa forma, buscam o controle biológico, natural ou aplicado, e o uso do controle
39 químico seletivamente (SALVADORI; PEREIRA, 2006). Conhecer as pragas que são importantes
40 nos danos causados, suas relações com as plantas hospedeiras e integrar táticas de controles
41 disponíveis (métodos biológicos, químicos, entre outros) são de extrema importância no combate às
42 pragas (SALVADORI; PEREIRA, 2006; VALICENTE; MOURÃO, 2008) A citogenômica através
43 da associação entre marcadores cromossômicos e metodologias de análise de diversidade biológica
44 e filogenética é uma ferramenta importante na busca de respostas sobre características evolutivas,
45 taxonômicas e estruturais tanto para o conhecimento da praga quanto da planta hospedeira.

46 Apesar da importância econômica e ecológicas, não existem estudos citogenéticos e
47 escassos são os trabalhos de biologia molecular relativos às principais pragas da soja, *Anticarsia*
48 *gemmatalis* e *Chrysodeixis includens*. A associação de resultados obtidos no presente estudo por
49 análises com os dados já existentes na literatura pode, além de contribuir para o conhecimento
50 citogenético dos organismos elucidados, contribuir para uma questão citotaxonômica referente a
51 mudanças taxonômicas das espécies estudadas.

52

53 2. REVISÃO DE LITERATURA

54

55 2.1. ASPECTOS GERAIS TAXONÔMICOS E BIOLÓGICOS

56 A ordem Lepidoptera (Linnaeus, 1758), do grego *lepidon* = escamas, *ptera* = asas,
57 refere-se aos insetos que apresentam asas cobertas por escamas, representada pelas borboletas e
58 mariposas (GALLO et al, 2002). É composta por aproximadamente 15 mil gêneros e 157 mil
59 espécies (ZHANG, 2011). A classificação descrita por Kristensen, Scoble e Karsholt (2007) dispõe
60 a superfamília Noctuoidea como a maior da ordem Lepidoptera, com metade das espécies descritas,
61 o que perfaz um total de 70 mil espécies em 7.200 gêneros (DUARTE et al., 2012).

62 Os lepidópteros possuem uma grande importância econômica, uma vez que são
63 fitófagos quando em estágios larvais, o que faz muitos desses insetos pragas de grandes culturas,
64 alimentando-se de tecidos, grãos armazenados ou farinhas. Dentre os lepidópteros,

65 aproximadamente 6000 espécies que possuem importância econômica, estima-se que 25% estão
66 classificadas na superfamília Noctuoidea (KITCHING, 1984). Os adultos também são muito
67 procurados por colecionadores e servem como modelos para arte e *design*. Também vale salientar
68 que a seda natural provém de um membro desta ordem (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011).

69 São insetos holometábolos, ou seja, sofrem metamorfose completa durante seu
70 desenvolvimento e passam pela fase de ovo, lagarta, pré-pupa, pupa e adulta. Além disso, são
71 ovíparos (COSTA LIMA, 1950). Dos ovos saem as larvas, popularmente nomeadas de lagartas, que
72 após transformações, atingem o completo desenvolvimento e realizam a primeira metamorfose na
73 qual resulta a pupa, seguida da segunda metamorfose, do qual surge o inseto adulto ou imago,
74 borboleta ou mariposa. (COSTA LIMA, 1950).

75 Morfologicamente, os lepidópteros adultos são identificados de acordo com suas asas,
76 antenas, peças bucais, ocelos, pernas, genitálias masculina e feminina, abdômen e frequentemente,
77 são caracterizadas pelo seu tamanho e por suas cores (TRIPLEHORN; JOHNSON, 2011).
78 Apresentam caracteres sexuais secundários que diferenciam os sexos, como o tamanho (a fêmea é
79 maior que o macho), coloração (machos possuem cores mais vistosas), antenas mais ornamentadas
80 nos machos. São observáveis também policrosismo, ou seja, variações de colorações entre
81 espécimes da mesma espécie e do mesmo sexo (GALLO et al. 2002).

82 Classificações morfológicas realizadas por Kitching (1984) associadas com dados
83 moleculares (sequências de genes mitocondriais e nucleares) obtidos por Zahiri *et al.* (2011)
84 segmentou a super família em seis clados: Oenosandridae, Notodontidae, Erebidae, Euteliidae,
85 Nolidae e Noctuidae. A venação das asas é uma característica que classifica a superfamília em
86 quatro segmentos, sendo que um deles agrupa tanto a família Erebidae quanto a Noctuidae (Zahiri
87 *et al.*, 2012), o que dificulta a distinção das espécies. *A. gemmatalis* e *C. includens*. Anteriormente
88 eram classificadas como sendo da mesma família, a Noctuidae, até que estudos de Zahiri *et al.*
89 (2012) confirmaram que *A. gemmatalis* possuía muito mais similaridade ($BS \geq 86$) com espécies
90 pertencentes à subfamília Eulepidotinae da família Erebidae do que à subfamília Catocalinae da
91 família Noctuidae, remanejando-a ao novo grupo. Enquanto isso, *C. includens* continua pertencente
92 à subfamília Plusiinae da família Noctuidae (Moscardi *et al.*, 2012). As definições das classificações
93 de Noctuoidea ainda não estão bem elucidadas, embora muitos trabalhos indiquem que estudos
94 estão sendo encaminhados para o caminho correto (Mitchell *et al.*, 2006; Regier *et al.*, 2009;
95 Mutanen *et al.*, 2010; Zahiri *et al.*, 2011; Zahiri *et al.*, 2012). Dessa forma, a citogenética é uma
96 ferramenta extremamente importante no auxílio na tomada de decisão de mudanças da classificação
97 sistemática de diferentes organismos, bem como o desenvolvimento de estudos citotaxonômicos
98 envolvendo a evolução.

99 2.2.1 *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis includens*

100 Várias espécies de insetos se alimentam de folhas de soja, destacando-se entre eles, as
101 lagartas, que levam à redução da área foliar fotossinteticamente ativa que comprometem a
102 produtividade e ocasionam danos significativos à lavoura (MOSCARDI et al., 2012).

103 *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818), popularmente conhecida como “lagarta-da-
104 soja”, é uma espécie de ocorrência tropical e subtropical, desde as regiões Norte e Central da
105 Argentina até o Sudeste e Estados do Golfo do México nos Estados Unidos (PANIZZI et al., 1977;
106 HERZOG; TODD, 1980), sendo considerada a principal praga desfolhadora da soja nos EUA,
107 México, Colômbia, Venezuela, Brasil e Argentina (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000;
108 MOSCARDI et al., 2012). Porém, a dinâmica populacional e bioecologia deste lepidóptero podem
109 variar de acordo com as diferenças observadas na temperatura e nutrição dos insetos (MILANO,
110 2008).

111 O seu ciclo de vida tem uma duração média de 47 dias (ovo= 3 dias; lagarta= 15 dias;
112 pupa= 9 dias; adulto= 20 dias) (DEGRANDE; VIVAN, 2012). A maior proporção de acasalamento
113 ocorre entre 20 °C e 30 °C e a atividade de vôo inicia-se por volta das 22 h até o amanhecer. Os
114 ovos são colocados isoladamente ou de forma agrupada nas folhas ou hastes das plantas. Durante
115 sua vida adulta, uma lagarta-da-soja pode depositar até 400 ovos. Uma fêmea em condições de
116 campo pode depositar uma média de $73,5 \pm 5,0$ ovos (MAGRINI; BOTELHO, SILVEIRA NETO,
117 1999; MOSCARDI et al., 2012). Após 2,2 a 3,9 dias (depende da temperatura), as lagartas eclodem
118 (FUGI; LOURENÇÃO; PARRA, 2005; MILANO, 2008).

119 As lagartas podem ter de cinco a sete ínstaes, sendo seis ínstaes o mais comum. Essa
120 variação depende da temperatura, da planta hospedeira e da qualidade do alimento, como
121 anteriormente retratado por Milano (2008). Entre o quarto e o sexto ínstar que a lagarta possui
122 maior capacidade desfolhadora e quando não manejadas da forma correta, podem ocasionar perda
123 de até 100% da área foliar, com perdas das nervuras e do pecíolo (HOFFMANN-CAMPO et al.,
124 2000; BUENO et al., 2011; DEGRANDE; VIVAN, 2012).

125 Quando pequena (até 1 cm) , a lagarta apresenta uma coloração verde e quatro pares de
126 pernas abdominais, sendo dois vestigiais e mais um par anal (Figura 1a). Nessa fase, é muitas vezes
127 confundida com a lagarta-falsa-medideira, uma vez que se locomove como medindo palmos
128 (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000). Quando maiores que 1,5 cm, podem apresentar coloração
129 verde ou escura (Figura 1b, c) com três linhas longitudinais brancas no dorso e quatro pares de
130 propernas abdominais, além de um par anal (MOSCARDI et al., 2012; SOSA-GÓMEZ et al.,
131 2014). Após a conclusão dos seis ínstaes, a lagarta da soja se transforma em pupa (coloração

132 marrom) e se concentram no solo, das quais surgem as mariposas que se acasalam na primeira noite
133 após a emergência, iniciando a ovoposição 3 a 4 dias depois com pico no 5º dia de vida do adulto
134 (MAGRINI; BOTELHO, SILVEIRA NETO, 1999). O inseto adulto apresenta asas com
135 envergaduras de 30 a 38 mm e coloração variável no dorso (podendo variar de cinza claro ao
136 marrom escuro). Apresentam ainda, uma linha diagonal que une o primeiro par de asas, o que
137 caracteriza o inseto (Figura 1d) (HERZOG; TODD, 1980; SOSA-GÓMEZ et al., 2014).

138 *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) (Lepidoptera: Noctuidae), sinônimo de
139 *Pseudoplusia includens*, lagarta conhecida popularmente como falsa-medideira também são
140 desfolhadoras da cultura da soja, associada à *A. gemmatalis* (DEGRANDE; VIVAN, 2012).

141 O nome de falsa-medideira está relacionado aos movimentos realizados para seu
142 deslocamento, pois a lagarta arquea o corpo como se tivesse “medindo palmos”, uma vez que
143 possui apenas dois pares de falsas pernas abdominais anteriores e três pares abdominais anteriores
144 (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000).

145 O seu ciclo de vida tem uma duração média de 46 dias (ovo= 5 dias; lagarta= 20 dias;
146 pupa= 7 dias; adulto= 14 dias). As lagartas apresentam coloração verde claro com uma série de
147 linhas brancas longitudinais e pontuações pretas espalhadas sobre o dorso, podendo atingir até
148 45mm de comprimento em seu último estágio larval (Figura 1e) (SOSA-GÓMEZ et al., 2014). A
149 fase de pupa apresenta uma coloração que varia de marrom ao verde e sua transformação ocorre no
150 interior de um abrigo produzido pela própria lagarta, o que se assemelha a uma teia, em geral, na
151 face ventral das folhas (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000; BARRIONUEVO et al., 2012; SOSA-
152 GÓMEZ et al., 2014).

153 As mariposas podem medir até 35mm de envergadura e apresentar asas dispostas na
154 forma de uma quilha quando em repouso, de cor marrom acinzentada, com brilho cúpreo e duas
155 manchas prateadas na parte central do primeiro par de cada asa (SOSA-GÓMEZ et al., 2014). As
156 asas posteriores também são marrons (Figura 1f). O acasalamento ocorre em período noturno e a
157 oviposição ocorre individualmente, a maioria na face inferior das folhas. A fêmea é capaz de
158 depositar mais de 600 ovos durante seu período de vida (DEGRANDE; VIVAN, 2012).

159 O desfolhamento ocasionado por estas lagartas apresenta um aspecto rendilhado, uma
160 vez que consomem as folhas, mas não as nervuras e os pecíolos das plantas (Figura 1g)
161 (HOFFMANN-CAMPO et al., 2000). Contribui, dessa forma, para a redução da área foliar que
162 pode ser de 80cm² a 200cm² durante a fase larval (DEGRANDE; VIVAN, 2012). Tipicamente, esta
163 espécie é favorecida por condições de seca e lavouras biologicamente desequilibradas, com
164 ausência de inimigos naturais, como fungos entomopatogênicos, são mais atacadas pela praga
165 (DEGRANDE; VIVAN, 2012).

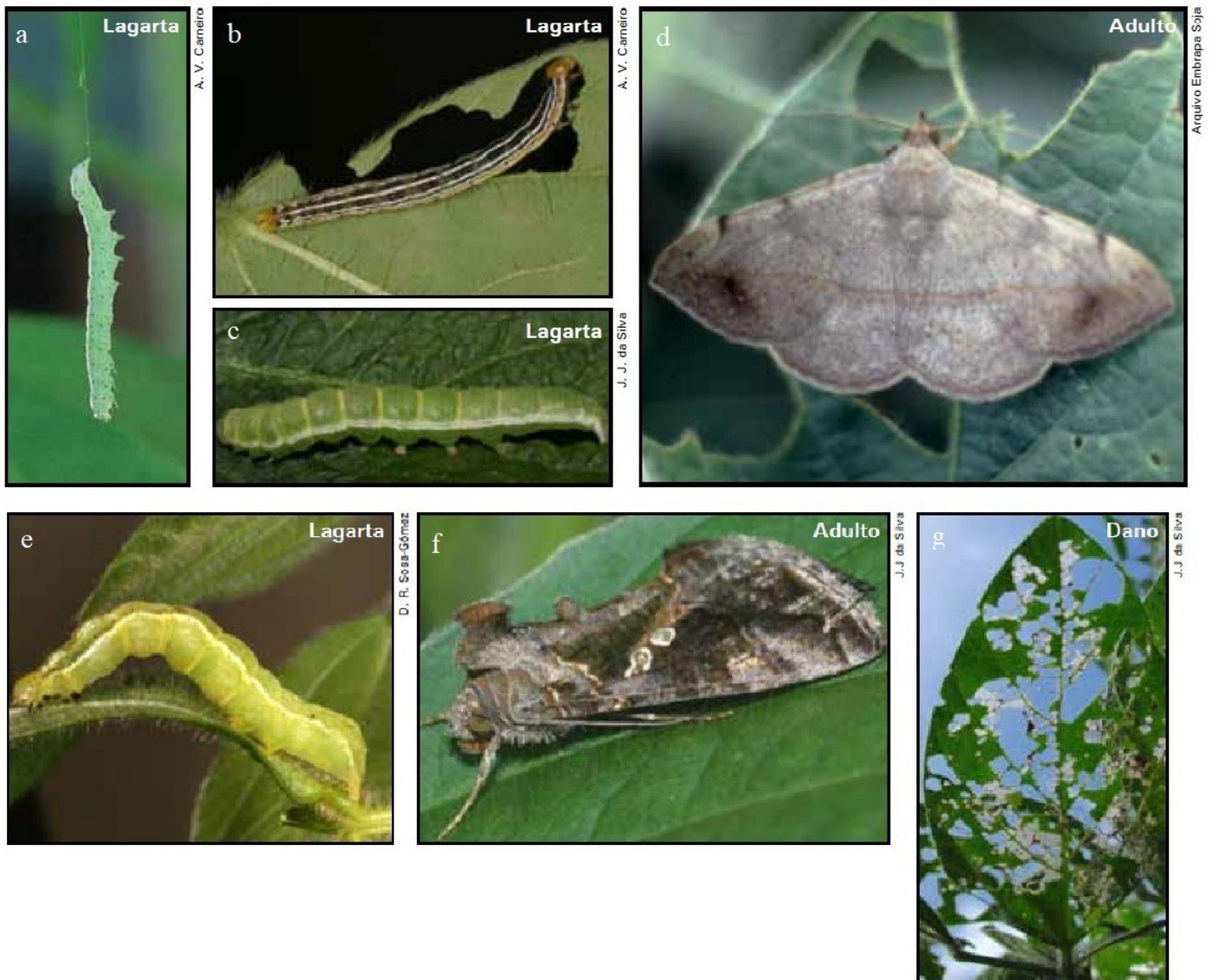


Figura 1. *Anticarsia gemmatalis* (a-d) e *C. includens* (e-g) em diferentes estágios do ciclo de vida. **a** Lagarta de *A. gemmatalis* (aproximadamente 3º instar); **b** e **c** Lagarta de *A. gemmatalis* (aproximadamente 5º instar); **d** *A. gemmatalis* adulta, com linha diagonal que une primeiro par de asas; **e** *C. includens* em estado larval (aproximadamente 5º instar); **f** *C. includens* adulta com duas manchas prateadas no centro do primeiro par de asas; **g** Dano causado pela desfolha de *C. includens*. Fonte: SOSA-GÓMEZ et al., 2014.

167 2.2. ASPECTOS CITOGENÉTICOS DA ORDEM LEPIDOPTERA

168 Os mecanismos de transmissão de caracteres através das gerações eram desconhecidas
169 até sua constatação por volta do século XX pela visualização do comportamento dos cromossomos
170 durante a divisão celular (SUTTON, 1903; BOVERI, 1904). A evidência da Teoria Cromossômica
171 da Herança deu início a uma nova área de conhecimento que agrega a citologia e a genética: a
172 citogenética (FERGUSON-SMITH, 2015). Estudos citogenéticos auxiliam as classificações
173 taxonômicas, mecanismos envolvidos na determinação cromossômica sexual, organização
174 cromossômica nuclear bem como comportamento dos cromossomos holocinéticos durante a divisão
175 celular (SNUSTAD; SIMMONS, 2013).

176 A união da citogenética e da biologia molecular proporcionou desenvolvimento na área
177 da biotecnologia e da engenharia genética, descobertas no campo da agricultura, da taxonomia e da
178 medicina veterinária e humana (SACCHET, 1999; SNUSTAD; SIMMONS, 2013).

179 Cromossomos de lepidópteros são pequenos, numerosos e possuem uniformidade em
180 relação ao formato e ao tamanho (ROBINSON, 1971), o que dificulta o desenvolvimento de
181 trabalhos na identificação de cromossomos por bandamentos (C, G, Q, R) e detecção das Regiões
182 Organizadoras de Nucléolos (RONs) por meio da impregnação com nitrato de prata (SHARMA;
183 SOBTI, 2002; HEIDEMANN, 2009). Porém, dados citogenéticos descritos para a ordem revelam
184 que o número cromossômico da maioria dos gêneros varia de $n=29$ a $n=31$ (ROBINSON, 1971). O
185 número modal $n=31$, sugere que esse seja o número ancestral cariotípico da ordem Lepidoptera
186 (LUKHTANOV, 2000; NGUYEN et al., 2010) embora sua ordem irmã, Trichoptera seja
187 caracterizada por $n=30$ (SUOMALAINEN, 1969).

188 Além disso, apresentam cromossomos holocêntricos, caracterizados por possuírem as
189 proteínas formadoras do cinetocoro dispersas ao longo das cromátides, o que faz com que a
190 associação dos microtúbulos não sejam concentrados somente em uma região como nos
191 cromossomos monocêntricos mas sim de forma dispersa, o que caracteriza esse tipo de cromossomo
192 (GUERRA et al., 2010; HIPPI; ESCUDERO, 2013). Essa característica propicia fissões, fusões e
193 translocações entre os cromossomos (como um mecanismo de reparo genético no intuito de manter
194 os cromossomos viáveis), o que pode justificar a grande variedade cariotípica da ordem
195 (WRENSCH; KETHLEY; NORTON, 1994).

196 Devido ao tamanho reduzido de seus cromossomos, preparações citológicas de
197 lepidópteros requerem pré-tratamentos para hipotonização das células, aumento do volume
198 citoplasmático e espaçamento entre os cromossomos para melhor visualização dos resultados
199 obtidos ao microscópio. Também passam por tratamentos enzimáticos para a redução de citoplasma

200 que muitas vezes pode interferir no resultado, encobrendo parcial ou totalmente as fases das divisões
201 celulares (GOODPASTURE, 1976).

202 Outra característica da ordem Lepidoptera está relacionado com o mecanismo de
203 determinação sexual cromossômica, no qual a fêmea heterogamética representada pelo sistema
204 cromossômico sexual Z0/ZZ e ZW/ZZ é associada a uma meiose aquiasmática, ou seja, ausência de
205 *crossing over* e formação de quiasmas na prófase I da meiose dos oócitos (TRAUT; SAHARA;
206 MAREC, 2007; ŠÍCHOVÁ et al.2016).

207 Como não existem estudos de RONS por meio da impregnação com nitrato de prata em
208 lepidópteros pela dificuldade de sua obtenção, um meio alternativo é seguido na obtenção e
209 visualização das regiões portadoras do DNAr, através da utilização de abordagens modernas, como
210 a FISH (Hibridização Fluorescente *in situ*) (ROY et al., 2005; NGUYEN et al., 2010). Estudos que
211 implicam na identificação de DNAr 18S indicam que há uma variação do número de RONS, porém
212 em muitas espécies o número se mantém conservado, apresentando duas marcações intersticiais ou
213 subteloméricas (NGUYEN et al., 2010).

214

215 2.3. HETEROCROMATINA

216 Descrito pela primeira vez em 1928 por Heitz como uma cromatina que não se
217 descondensa no final da telófase mas se mantém condensado até mesmo durante a intérfase. Em
218 1966, Brown classificou a heterocromatina em facultativa e constitutiva. Na heterocromatina
219 facultativa, a cromatina condensada está presente em somente em um par de cromossomos e dessa
220 forma, tem a mesma composição de DNA da cromatina de seu homólogo com eucromatina. Já na
221 constitutiva, além ocorrer no mesmo *locus* em ambos homólogos, tende a ter sua composição de
222 bases diferentes da eucromatina (SUMNER, 2003).

223 A heterocromatina constitutiva pode ser formada por DNA satélite, sequências
224 altamente ou moderadamente repetitivas, ricas em A/T ou G/C que vão de 2 pb a milhares. Essa
225 replicação também tem o objetivo de produzir múltiplas cópias da sequência sem efeitos deletérios.
226 Também é comum encontrar elementos transponíveis em sua composição (SUMNER, 2003).
227 Anteriormente, considerava-se a heterocromatina como inativa, porém hoje conhecemos muitas
228 funções de proteção do genoma. Além de proteger o genoma de eventos potencialmente
229 mutagênicos, a formação de heterocromatina sugere que sejam sequências cruciais para a
230 organização funcional de estruturas cromossômicas importantes, tais como os telômeros e os
231 centrômeros (GREWAL; JIA, 2007).

232

233 2.4. MARCADORES MOLECULARES: COI

234 O uso de ferramentas moleculares permite o sequenciamento e a caracterização de
235 populações. Um marcador molecular muito empregado para esse tipo de estudo é o que utiliza
236 sequências de genes de DNA mitocondrial (DNAMt). Esse marcador é muito utilizado desde a
237 década de 70 para estudos que envolvem estrutura populacional, relações filogenéticas e o
238 entendimento de aspectos biológicos e evolutivos dos mais variados organismos (ARIAS;
239 FRANCISCO; SILVESTRE, 2003; HEBERT et al., 2004).

240 Diversos são os fatores que levaram pesquisadores a escolher estudar o genoma
241 mitocondrial, entre eles podemos citar o seu tamanho pequeno e compacto com raras sequências
242 espaçadoras, sequências repetitivas, pseudogenes e íntrons (ARIAS; FRANCISCO; SILVESTRE,
243 2003). Seus genes são pouco numerosos, totalizando 37 genes no total, o conteúdo gênico é bastante
244 conservado, bem como sua organização no genoma. Há ausência de recombinações (salvo
245 exceções) e a taxa evolutiva (à partir de substituições de bases) é muito alta quando comparada ao
246 genoma nuclear. Apresenta herança exclusivamente materna e é independente do genoma nuclear,
247 pois não segue a segregação mendeliana (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

248 O gene citocromo c oxidase subunidade I, conhecida como COI, bem como outras
249 sequências do DNAMt tem sido utilizadas como marcadores moleculares na identificação e
250 descoberta de novas espécies. Essas regiões são referidas como um “código de barras”, ou
251 “barcode” e o fragmento de 648 pb do gene COI tem sido uma ferramenta complementar na
252 distinção das espécies, exceto em estudos de estruturas populacionais (LUNT et al., 1996; JUNG;
253 DUWAL; LEE, 2011).

254 Dessa forma, foram descritos iniciadores específicos para PCR que amplificam
255 fragmentos de 710 pb do gene COI em invertebrados, conhecidos como LCO1490 e HCO2198
256 (FOLMER et al, 1994), amplamente utilizado em pesquisas de insetos, principalmente lepidópteros.
257 No trabalho de Yano et al. (2012), por exemplo, esse tipo de marcador serviu de contribuição na
258 identificação de haplótipos nas subpopulações de *A. gemmatalis* presentes nas cultivares da soja no
259 Brasil.

260

261 3. OBJETIVOS

262

263 3.1. OBJETIVO GERAL

264

265 Diante a importância do conhecimento sobre as pragas agrícolas da soja, *Anticarsia*
266 *gemmatalis* e *Chrysodeixis includens* e a ausência de estudos citogenéticos das espécies em questão,
267 o presente trabalho tem como objetivo geral Integrar os dados citogenéticos a outras ferramentas de
268 genética molecular para obter informações cariotípicas e inferir mais precisamente a posição
269 taxonômica dessas duas importantes pragas da soja.

270

271 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

272

273 Como objetivos específicos deste trabalho, estão:

274 - Analisar o comportamento meiótico de ambas espécies;

275 - Obter dados citogenéticos convencionais e moleculares objetivando a identificação de
276 possíveis marcadores moleculares;

277 - Avaliar a nova classificação taxonômica de *A. gemmatalis* por uma perspectiva
278 citotaxonômica;

279 - Incorporar os dados obtidos ao sistema de classificação de lepidópteros, comparando-
280 os com a literatura para uma melhor compreensão da evolução e da sistemática do grupo.

281

282

283

284

285

286

287

288

Capítulo 1

289

4. CAPÍTULO 1 – ARTIGO CIENTÍFICO

290

291

Aplicação de diferentes marcadores citogenéticos e moleculares

292

no estudo de duas pragas da soja: *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis*

293

includens.

294

295

296

Artigo a ser submetido a revista *Biological Journal of the Linnean Society*.

297 **Aplicação de diferentes marcadores citogenéticos e moleculares no**
 298 **estudo de duas pragas da soja: *Anticarsia gemmatalis* e *Chrysodeixis***
 299 ***includens*.**

300

301 BRENDA RAFAELLA DA SILVA MAGALHÃES¹, DANIEL RICARDO SOSA-GOMEZ²,
 302 JAQUELINE FERNANDA DIONÍSIO¹, JOANA NERES DA CRUZ BALDISSERA¹, MATHEUS
 303 PIRES RINCÃO¹, LUCAS MILANEZ BENÍCIO³, RENATA DA ROSA¹.

304

305

306 ¹ *Laboratório de Citogenética Animal, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de*
 307 *Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 km 380, Londrina-PR 85051-900, Brasil*

308 ² *Embrapa Soja, Rodovia Carlos João Strass, s/nº Acesso Orlando Amaral, Distrito de Warta-PR*
 309 *86001-970, Brasil*

310 ³ *Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas, Departamento de Biologia*
 311 *Geral, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 km 380, Londrina-*
 312 *PR 85051-900, Brasil*

313

314

315

316 **RESUMO**

317

318 *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) e *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858) são espécies de
 319 lepidópteros, causadores de grandes danos nas lavouras de soja do Brasil. Estima-se que 37% da
 320 safra seja perdida, sendo que aproximadamente 13% seja devido ao ataque desses insetos. Apesar
 321 dessa importância, os estudos sobre a organização cromossômica dessas espécies são inexistentes e
 322 recentemente, *A. gemmatalis*, que pertencia a família Noctuidae juntamente com *C. includens*, foi
 323 alocada na família Erebidae. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi analisar por meio de
 324 marcadores citogenéticos convencionais e moleculares, exemplares de ambas espécies.
 325 Adicionalmente, foi realizada uma análise do gene citocromo oxidase subunidade I (COI) de *A.*
 326 *gemmatalis*, afim de avaliar a sua nova classificação taxonômica. Foi observado um $2n=62$, com
 327 sistema sexual ZZ/ZW e cromossomos holocinéticos para as duas espécies. Houve uma
 328 homogeneidade no número de sítios do DNAr 18S para ambas. Entretanto, variações na distribuição
 329 da heterocromatina foram observadas. A análise de um único marcador molecular, o COI em *A.*
 330 *gemmatalis*, permitiu concluir que não há diferenças consistentes entre as populações analisadas
 331 referentes somente ao gene mitocondrial. As análises citogenéticas permitiram separar as espécies,
 332 corroborando o posicionamento de *A. gemmatalis*, da família Noctuidae para Erebidae, sugerindo
 333 novas características, não mais somente morfológicas ou relacionadas à genes mitocondriais e
 334 nucleares mas também citogenéticas referente a espécies classificadas como Erebidae e Noctuidae.

335

336

337

338

339 Palavras-chave: Lepidoptera – Erebidae – Noctuidae – FISH – COI - citotaxonomia

340

341

342 INTRODUÇÃO

343

344 A ordem Lepidoptera (Linnaeus, 1758), é composta por aproximadamente 15 mil
345 gêneros e 157 mil espécies (Zhang, 2011). Seus representantes possuem asas cobertas por escamas,
346 e são conhecidos popularmente como borboletas e mariposas, sendo muitos deles com grande
347 importância econômica (Silva-Filho; Falco, 2000). São insetos holometábolos (Costa Lima, 1950) e
348 fitófagos quando em estágios larvais, o que faz muitos desses insetos pragas de grandes culturas.
349 Dentre os lepidópteros, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) e *Chrysodeixis includens* (Walker,
350 1858) destacam-se como pragas da cultura da soja no Brasil.

351 Dentre os lepidópteros, aproximadamente 6000 espécies que possuem importância
352 econômica, estima-se que 25% estão classificadas na superfamília Noctuoidea. Classificações
353 morfológicas realizadas por Kitching (1984) associadas com dados moleculares (sequências de
354 genes mitocondriais e nucleares) obtidos por Zahiri *et al.* (2011) separou a super família em seis
355 clados: Oenosandridae, Notodontidae, Erebidae, Euteliidae, Nolidae e Noctuidae. A venação das
356 asas é uma característica que classifica a superfamília em quatro segmentos, sendo que um deles
357 agrupa tanto a família Erebidae quanto a Noctuidae (Zahiri *et al.*, 2012), o que dificulta a distinção
358 das espécies. *A. gemmatalis* e *C. includens* anteriormente eram classificadas como sendo da família
359 Noctuidae, até que estudos de Zahiri *et al.* (2012) confirmaram que *A. gemmatalis* possuía muito
360 mais similaridade ($BS \geq 86$) com espécies pertencentes à subfamília Eulepidotinae da família
361 Erebidae do que à subfamília Catocalinae da família Noctuidae, remanejando-a ao novo grupo.
362 Enquanto isso, *C. includens* continua pertencente à subfamília Plusiinae da família Noctuidae
363 (Moscardi *et al.*, 2012). As definições das classificações de Noctuoidea ainda não estão bem
364 elucidadas, embora muitos trabalhos indiquem que estudos estão sendo encaminhados para o
365 caminho correto (Mitchell, Mitter & Regier, 2006; Regier *et al.*, 2009; Mutanen, Wahlberg & Kaila,
366 2010; Zahiri *et al.*, 2011; Zahiri *et al.*, 2012). Dessa forma, a citogenética é uma ferramenta
367 extremamente importante no auxílio na tomada de decisão de mudanças da classificação sistemática
368 de diferentes organismos, bem como o desenvolvimento de estudos citotaxonômicos envolvendo a
369 evolução.

370 Existem diferentes estudos citogenéticos convencionais em Lepidoptera que
371 demonstraram, até o momento para todas as espécies, algumas características comuns, como
372 cromossomos holocinéticos e sistemas cromossômicos sexuais (Wrench, Kethley & Norton, 1994;
373 Guerra *et al.*, 2010; Hipp, Scudero & Chung, 2013). As fêmeas, sexo heterogamético, é associada a
374 uma meiose aquiasmática durante a prófase I da meiose dos oócitos, conferindo às espécies, um

375 comportamento meiótico diferente entre autossomos e cromossomos sexuais no pareamento
376 conhecido como *touch-and-go* (Traut, Sahara & Marec, 2007; Šíchová *et al.*, 2016).

377 O número diplóide mais comum na ordem é $2n = 62$ (30A + ZW) (Robinson, 1971;
378 Lukhtanov, 2000; Nguyen *et al.*, 2010), entretanto são descritos números de $n = 10a - 108$ em alguns
379 lepidópteros, como os do gênero *Polyommatus* (Vershina, Anokhin & Lukhtanov, 2015).
380 Bandamentos citogenéticos convencionais (C, G, Q, R e NOR) são pouco abordados na ordem
381 (Suomalainen, 1969; Robinson, 1971; Goodpasture, 1976; Mandrioli, 2002; Sharma & Sobti, 2002;
382 Heidemann, 2009), provavelmente devido a dificuldade de obtenção dos cromossomos e por serem
383 pequenos, numerosos e uniformes. Nguyen *et al.* (2010) realizaram um grande estudo na
384 localização de *clusters* de DNA ribossômico 18S (DNAr 18S) em 30 espécies de 5 superfamílias
385 (Tortricoidea, Pylaroidea, Bombycoidea, Papilionoidea e Noctuoidea) e utilizaram a localização
386 dessa sequência como marcador para estudos evolutivos. Esses estudos revelaram que o DNAr 18S
387 possui uma distribuição preferencial na região intersticial na superfamília Noctuoidea, que inclui as
388 famílias Noctuidae e Erebidae.

389 Outras ferramentas de análise do genoma são importantes na elucidação das relações
390 entre os diferentes grupos animais. Marcadores moleculares são amplamente utilizados, embora
391 haja um pequeno número disponível e utilizados em borboletas, segundo Wahlberg e Wheat (2008).
392 O DNA mitocondrial é um importante marcador molecular, especificamente o gene citocromo c
393 oxidase subunidade I (COI), referido como um “código de barras” ou “*barcode*” (Lunt *et al.*, 1996;
394 Jung, Duwal & Lee, 2011). Folmer *et al.* (1994) descreveu um par de *primers* que amplificam
395 fragmentos de 710 pb do COI em invertebrados que tem sido referência em estudos com insetos,
396 principalmente lepidópteros, como na identificação de haplótipos nas subpopulações de cultivares
397 da soja no Brasil (Yano *et al.*, 2012).

398 Assim, o conhecimento biológico, genético e citogenético de lepidópteros contribuem
399 para a obtenção de novas estratégias para o controle destas pragas (Hoffmann-Campo *et al.*, 2000;
400 Heidemann, 2009; Corrêa-Ferreira, Alexandre & Pellizzaro, 2010; Moscardi *et al.*, 2012). Embora
401 existam estudos citogenéticos em lepidópteros, não existem relatos sobre a estrutura cariotípica de
402 *A. gemmatalis* e *C. includens*. Além disso, estudos relacionados à estrutura populacional desses
403 insetos-praga da soja são escassos também. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo a análise
404 citogenética e molecular dessas duas espécies, a fim de elucidar as relações evolutivas entre elas,
405 bem como se a estrutura populacional pode influenciar na diferenciação das espécies.

406

407 MATERIAL E MÉTODOS

408

409 MATERIAL BIOLÓGICO E PREPARAÇÕES CROMOSSÔMICAS

410 Os espécimes de *A. gemmatalis* (30 indivíduos) e *C. includens* (20 indivíduos) foram
411 cedidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e a criação foi desenvolvida pelo
412 Laboratório de Biologia Molecular de Artrópodes e Entomopatógenos (Embrapa Soja, CNPSO –
413 Brasil). Após aplicação de colchicina 0,2% via intraperitoneal por 6 horas, os testículos e ovários
414 foram dissecados, hipotonizados em água destilada por 10 min, fixados em solução de metanol e
415 ácido acético (3:1, v:v) e armazenados em *freezer* -20°C. Para a confecção das lâminas, o material
416 foi submerso em ácido acético 60% por aproximadamente 15 min e submetido à técnica de
417 “*SteamDrop*” descrita por Kirov *et al.* (2014). As lâminas foram secas e coradas com Giemsa 2%
418 para análises convencionais.

419

420 BANDAMENTO C E FLUOROCROMOS

421 A heterocromatina constitutiva foi identificada pela técnica de banda-C seguindo o
422 protocolo de Sumner (1972). Após o bandamento-C as lâminas foram coradas com Giemsa 2% e
423 fluorocromos Cromomicina A₃ (CMA₃) e 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para a detecção das
424 regiões cromossômicas ricas em bases nitrogenadas C/G e A/T, respectivamente, seguindo o
425 protocolo de Schweizer (1980).

426

427 EXTRAÇÃO DE DNA

428 O DNA dos insetos foi extraído dos tecidos musculares de 30 espécimes de *A.*
429 *gemmatalis* seguindo o protocolo proposto por Suzuki *et al.* (2010) com modificações, optando-se
430 pela purificação com acetato de amônio 7,5M e etanol 70 e 100%. A concentração e pureza do
431 DNA foi determinada com o auxílio de NanoDrop™ e as amostras foram diluídas às concentrações
432 de 100 ng/μl para os procedimentos seguintes.

433

434 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO DNAr 18S E COI

435 Foram utilizados 3 espécimes de *A. gemmatalis* para o isolamento e caracterização do
436 DNAr 18S, no qual foi amplificado utilizando os *primers* 18S-Gal *Forward* 5'-
437 CGATACCGCGAATGGCTCAATA-3' e 18S-Gal *Reverse* 5'-
438 ACAAAGGGCAGGGACGTAATCAAC-3' (Fuková, Nguyen & Marec, 2005). A Reação em

439 Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada para um volume final de 25µl contendo 12,5µl de
 440 GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega), 1µl de DNA (100ng/µl), 0,5 µl de cada *primer* (10mM)
 441 e 10,5µl de H₂O. Após amplificação, confirmada em gel de agarose 1% (com corante SYBR Safe™,
 442 Invitrogen), os produtos foram purificados com acetato de amônio 7,5M e etanol 70 e 100%.

443 Para a amplificação de DNAm_t COI, foram utilizados 30 espécimes de *A. gemmatalis*.
 444 Seguindo o protocolo de Folmer *et al.* (1994), os *primers* selecionados foram LCO1490 5'-
 445 GGTCACAAATCATAAAGATATTGG-3' e HCO2198 5'-
 446 TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'. A PCR foi realizada para um volume final de 25µl
 447 contendo 12,5µl de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega), 1µl de DNA (100ng/µl), 0,5 µl de
 448 cada *primer* (10mM) e 10,5µl de H₂O. Após amplificação, confirmada em gel de agarose 1%, os
 449 produtos foram purificados com acetato de amônio 7,5M e etanol 70 e 100%.

450 Os produtos de PCR obtidos de DNAr 18S foram sequenciados automaticamente (ABI
 451 3500 XL Applied Biosystems). A limpeza das sequências de DNA, análise da qualidade das
 452 sequências e a montagem dos *contigs* foram feitas pelo *software* Mega 7.0 (Kumar, Stecher &
 453 Tamura, 2016) e BioEdit v.7.2.6.1 (Hall, 2011). As sequências consenso foram comparadas a outras
 454 sequências previamente depositadas no Banco de Dados do Centro Nacional de Informação em
 455 Biotecnologia (NCBI), com o auxílio da ferramenta BLAST Search.
 456 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

457 Além das sequências de COI amplificadas, outras sequências foram disponibilizadas
 458 pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Soja, CNPSO – Brasil). Também
 459 foram incorporados dados de sequenciamentos parciais da região depositadas no GenBank e do
 460 Bold Systems v4 (<http://www.boldsystems.org>). A análise evolutiva das sequências foi inferida pela
 461 utilização do método *Maximum Likelihood* do programa MEGA 6.06. Mil repetições foram
 462 realizadas e a porcentagem de árvores idênticas é exposta ao lado dos ramos. As distâncias
 463 evolutivas foram calculadas de acordo com o modelo K2P envolvendo 39 sequências de
 464 nucleotídeos (sendo uma delas o grupo externo) e todas as posições contendo lacunas e dados
 465 faltantes foram eliminados. Houve um total de 228 posições no conjunto de dados final.

466

467 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

468 A FISH seguiu o protocolo descrito por Pinkel, Straume e Gray (1986) com algumas
 469 modificações. O produto amplificado do DNAr 18S foi marcado com Biotin-11-dUTP por PCR. O
 470 pré tratamento das lâminas incluíram desidratação com etanol 70 e 100%, 5 min cada à temperatura
 471 ambiente, ácido acético 60% à 42°C por 15 min, lavagem com 2x SSC por 10 min à temperatura

472 ambiente e agitação, 100µl de RNase (0,4%) em cada lâmina por 1h à 37°C, 2 lavagens de 2x SSC
473 à temperatura ambiente, 5 min cada e com agitação, lavagem em pepsina 0,005% (em 10 mM de
474 HCl) à 37°C por 20 min, lavagem com 2x SSC à temperatura ambiente por 10 min, com agitação e
475 desidratação com etanol 70 e 100% à temperatura ambiente, 5 min cada. As lâminas foram tratadas
476 com 30µl de *mix* de hibridização contendo 5µl de sonda marcada, 15µl de formamida 50%, 6µl de
477 PEG 50%, 3µl de 20x SSC e 1µl de SDS 10%. A desnaturação dos cromossomos foi realizada em
478 formamida 70% a 70°C por 4 min em banho-maria, seguida da hibridização realizada por
479 aproximadamente 18h a 37°C em câmara úmida. As lavagens pós-hibridização foram realizadas
480 com 6x SSC à temperatura ambiente por 10 min, 4x SSC 0,5% *Tween* à temperatura ambiente por
481 10 min, em câmara escura. Para a detecção da sonda, foram utilizados 1µl de anticorpos (Avidin-
482 FITC para conjugação com biotina) em 49µl de BSA 5%. Após uma série de lavagens pós detecção
483 (4x SSC 0,5% *Tween* à temperatura ambiente por 10 min), as lâminas foram montadas com 15µl de
484 DABCO, 5µl de DAPI e 2µl de MgCl₂ (50mM) e 18µl de DABCO, 2µl de Iodeto de Propídio e 2µl
485 de MgCl₂ (50mM).

486

487 FOTODOCUMENTAÇÃO DOS RESULTADOS

488 As lâminas submetidas às técnicas de citogenética foram submetidas às análises em
489 fotomicroscópio de fluorescência Leica DM 2000 equipado com uma câmera DFC 300 FX, com
490 *software* de análise de imagens Motic Images Plus 3.2. As imagens obtidas foram captadas
491 separadamente em filtros específicos para cada fluoróforo.

492

493 RESULTADOS

494

495 CITOGENÉTICA DE *A. GEMMATALIS* E *C. INCLUDENS*

496 A coloração convencional com Giemsa evidenciou que ambas espécies compartilham do
497 mesmo número diploide de 62 (60A + ZW) com possível sistema cromossômico sexual simples
498 ZZ/ZW (Fig. 1B, 2B). Todos os cromossomos apresentaram características holocêntricas e possuem
499 tamanhos e formatos semelhantes, além de serem numerosos e pequenos.

500 Através da coloração Giemsa ainda permitiu observar que em paquíteno, tanto para *A.*
501 *gemmatalis* quanto *C. includens*, foi observada a formação de bivalentes, com a caracterização de
502 regiões heteropicnóticas positivas (Fig. 1A, 2A), contudo, em *C. includens* houve um número maior
503 dessas regiões. Em metáfase II, os cromossomos foram alinhados na placa equatorial, incluindo os

504 possíveis cromossomos sexuais. Em *C. includens*, os esses cromossomos apresentaram
505 heteropicnose positiva (ZZ) (Fig. 2B), enquanto que em *A. gemmatalis*, os cromossomos ZZ
506 apresentaram-se heteropicnóticos negativos (Fig. 1B) e heteropicnótico positivo para W (Fig. 1D)
507 na metáfase II de fêmea. O pareamento de cromossomos com heteropicnose e heteromorfismo
508 sugerem que os possíveis cromossomos sexuais apresentem a conformação “touch-and-go” e a
509 ocorrência de meiose invertida.

510 A anáfase II (Fig. 1C) confirmou o comportamento diferenciado dos cromossomos
511 holocêntricos e é possível visualizar o posicionamento das fibras do fuso com as proteínas
512 formadoras do cinetocoro que estão dispostas ao longo dos cromossomos. Além disso, é possível
513 observar a migração precoce de alguns cromossomos, que podem ser correspondentes aos
514 cromossomos sexuais.

515 O bandamento-C/Giemsa identificou marcações diferenciadas entre as espécies. Em
516 paquíteno, nas duas espécies foram observadas regiões mais condensadas, coradas mais escuras
517 (heterocromáticas) ao longo das cromátides, intercaladas com regiões mais claras ou eucromáticas
518 (Fig. 1E, 2C). Entretanto, em metáfase II de *A. gemmatalis*, dois bivalentes com marcações (Fig.
519 1F) foram observados, enquanto que em *C. includens*, diversos bivalentes apresentaram duas
520 marcações (Fig. 2D). Nenhum cromossomo foi inteiramente identificado como heterocromático.

521 Essas diferenças também foram observadas na coloração com fluorocromos. Para *A.*
522 *gemma*talis, a coloração com CMA₃ revelou marcações mais brilhantes em dois bivalentes (Fig.
523 1G) e duas marcações nucleares (Fig. 1H), o que sugere que sejam as mesmas identificadas pelo
524 bandamento-C. Algumas marcas discretas puderam ser observadas em outros bivalentes (Fig. 1G).
525 Já com a coloração DAPI não foi possível verificar nenhuma marcação, tanto em metáfase I quanto
526 em núcleo interfásico (Fig. 1I, J). Em *C. includens* também possível a identificação de bivalentes
527 em metáfase II (Fig. 2E) e duas marcações nucleares com CMA₃ (Fig. 2F), além de algumas
528 marcações discretas em vários cromossomos. A coloração DAPI identificou marcas discretas DAPI⁺
529 em metáfase II (Fig. 2G), porém nenhuma marcação positiva que permitisse sua visualização em
530 núcleo (Fig. 2H).

531 A sequência consenso parcial de DNAr 18S de *A. gemmatalis* apresentou comprimento
532 de 1034 pb e similaridade de 94-96% com a região conservada de DNAr 18S de diversas outras
533 espécies de lepidópteros (Fig. 3A). A sequência obtida pelo sequenciamento (Fig. 3B) foi
534 comparada com outras sequências e os resultados obtidos apresentaram semelhança com outros
535 lepidópteros, tais como *Hyles lineata* (número de acesso: AF423786.1), *Antheraea assama* (número
536 de acesso: KY676860.1), *Tanadema neutra* (número de acesso: KR068959.1), *Helicoverpa*
537 *armigera* (número de acesso: KT343378.1), *Plutella xylostella* (número de acesso: JX390653.1),

538 entre outras espécies depositadas no GenBank (NCBI). Pela técnica de FISH, foi possível
539 identificar apenas um bloco de DNAr 18S nos núcleos interfásicos de *A. gemmatalis* e em paquíteno
540 de *C. includens* (Fig. 1K, 2I).

541

542 GENE DO CITOCROMO C OXIDASE SUBUNIDADE I (COI)

543 Os *primers* Insect COI (LCO1490 e HCO2198) do gene citocromo c oxidase
544 subunidade I (COI) amplificaram fragmentos de DNAm de 750 pb a 800 pb, confirmados por
545 eletroforese em gel de agarose 1% (Fig. 4), o que comprova a eficácia dos iniciadores específicos e
546 que a metodologia de amplificação foi resolutive, seguindo o citado por Folmer *et al.* (1994). Dos
547 30 espécimes de *A. gemmatalis* que tiveram seu DNA extraído pela técnica salina, somente 15
548 sequências foram sequenciadas e comparadas com dados obtidos por bancos de dados.

549 O cladograma (Fig. 5) foi dividido em somente dois grupos, Grupo 1 e Grupo 2. O
550 Grupo 1 agrupou todas as sequências obtidas e sequenciadas além das sequências fornecidas pela
551 Embrapa. O Grupo 2, por sua vez, é representando pelo grupo externo. O Grupo 1 ainda, obteve um
552 nó com consistência de 74 (por BS).

553 A distância genética foi calculada e o resultado variou de 0 à 0,134. Entre as sequências
554 de *A. gemmatalis*, a variação foi de 0,024.

555

556 DISCUSSÃO

557

558 As espécies estudadas de *A. gemmatalis*, pertencente à família Erebidae, anteriormente
559 alocada na mesma família de *C. includens*, Noctuidae, apresentaram muitas características
560 citogenéticas em comum. As análises citogenéticas por coloração convencional permitiram a
561 identificação do número diplóide de *A. gemmatalis* e *C. includens* bem como o comportamento dos
562 cromossomos durante a divisão celular. O cariótipo formado por $2n = 62$ (30A + ZZ/ZW) e o
563 sistema cromossômico sexual permitiu observar que ambas espécies possuem um cariótipo muito
564 similar as demais espécies da ordem Lepidoptera já estudadas, seguindo o número modal $n = 31$, o
565 que demonstra uma grande conservação na macroestrutura cariotípica para a ordem (Robinson,
566 1971; Lukhtanov, 2000; Nguyen *et al.*, 2010; Saura *et al.*, 2013).

567 Assim como já tinham sido descritos, cromossomos de lepidópteros possuem tamanhos
568 e formatos uniformes, o que dificulta muitas vezes estudos que requerem a visualização de bandas
569 obtidas por tratamentos químicos e enzimáticos, necessitando de pré-tratamentos que auxiliem na
570 obtenção de fases satisfatórias para as análises (Suomalainen, 1969; Robinson, 1971; Sharma &

571 Sobti, 2002; Heidemann, 2009). Os cromossomos são holocêntricos, como pode ser observado pelo
 572 comportamento meiótico da figura 1C, como anteriormente relatado em outros lepidópteros
 573 (Nguyen *et al.*, 2010; Vershinina, Anokhin & Lukhtanov, 2015).

574 O sistema cromossômico sexual encontrado com maior frequência entre os lepidópteros
 575 é o ZZ/ZW, no qual a fêmea possui o par heterogamético. Ainda foram descritos sistemas
 576 cromossômicos sexuais ZZ/Z0, ZZ/ZW₁W₂ e Z₁Z₁Z₂Z₂/Z₁Z₂W (Traut, Sahara & Marec, 2007). No
 577 presente trabalho, a identificação de um pseudobivalente com heteromorfismo e heteropicnose
 578 levou à associação de uma meiose aquiasmática desses cromossomos sexuais nas fêmeas,
 579 identificando-os como ZW (Fig. 1D), assim como o já descrito para *Bombyx mori*, *Ephestia*
 580 *kuehniella* e *Leptidea amurensis* (Traut, Sahara & Marec, 2007; Šíchová *et al.*, 2016). Porém, não
 581 foi possível inferir sobre tais dados em fêmeas de *C. includens*. Em *C. includens*, a metáfase II (Fig.
 582 2B) apresentou um par de cromossomos com um tamanho um pouco maior do que os outros
 583 autossomos, que podemos sugerir como o par de cromossomos sexuais.

584 Embora a análise convencional tenha evidenciado uma conservação cariotípica, as
 585 técnicas de bandamento diferenciaram as duas espécies. Em *A. gemmatalis* foi observada uma
 586 menor quantidade de heterocromatina. Essas bandas são de difícil caracterização, sendo sua
 587 identificação dependente do grau de condensação dos cromossomos em outras fases meióticas,
 588 como em paquíteno. Já em *C. includens* foram encontradas marcações em quase todos os
 589 cromossomos, observadas em maiores quantidades e intensidade do que em *A. gemmatalis*.
 590 Goodpasture (1976) aplicou a técnica de bandamento-C em paquítenos de duas espécies de
 591 lepidópteros, *Pyrgus oileus* (Hesperiidae) e *Prodenia ornithogalli* (Noctuidae) e obteve marcações
 592 intersticiais mais evidentes e regiões terminais mais fracas. Ainda no mesmo trabalho, o autor
 593 analisou núcleos interfásicos no qual o nucléolo foi evidenciado e associados aos cromossomos com
 594 as marcações terminais. No presente trabalho, esse tipo de associação pode ser confirmado nos
 595 paquítenos de *A. gemmatalis*.

596 No caso dos fluorocromos, a coloração DAPI discriminou leves marcações em *C.*
 597 *includens*, enquanto que em *A. gemmatalis* não foram observadas regiões DAPI⁺. Ainda em *A.*
 598 *gemmatalis*, foram identificadas duas marcações CMA₃ na metáfase I e núcleo (Fig. 1G, H), o que
 599 sugere que sejam os mesmos cromossomos identificados pelo bandamento-C, inferindo que os
 600 cromossomos apresentam regiões ricas em bases nitrogenadas C/G. Podemos, ainda, sugerir que
 601 estes cromossomos identificados estejam relacionados com os cromossomos sexuais ou aos sítios de
 602 DNAr 18S, como o identificado no trabalho de Mandrioli (2002) e Mandrioli, Manicardi e Marec
 603 (2003) em *Mamestra brassicae*. Em *C. includens*, marcações CMA₃⁺ em metáfase II (Fig. 2E) e em
 604 núcleo (Fig. 2F) sugerem, assim como em *A. gemmatalis*, regiões ricas em C/G. Essas regiões,

605 ainda podem ser relacionadas com as RONS, identificadas nas marcações por FISH (Fig. 1K, 2I).

606 Essa diferenciação de blocos heterocromáticos detectados tanto pela técnica de
607 bandamento-C quando pela coloração de fluorocromos base-específicos pode ser sugerida pelo
608 processo de heterocromatinização ou pela presença de elementos transponíveis, como anteriormente
609 sugerido em trabalhos descritos por Pine *et al.* (2017) e Rocha *et al.* (2015) no qual observaram-se
610 diferenças na presença de bloco heterocromáticos intra e inter-específicos nas populações de
611 gafanhotos e por Cabral-de-Mello *et al.* (2010) em besouros. Além de proteger o genoma de eventos
612 potencialmente mutagênicos, a formação de heterocromatina sugere que sejam sequências cruciais
613 para a organização funcional de estruturas cromossômicas importantes, tais como os telômeros e os
614 centrômeros (Grewal & Jia, 2007), relacionando-a com estudos de evolução cariotípica.

615 A identificação de *clusters* de DNAr 18S por FISH em lepidópteros é muito variável,
616 relacionada diretamente com as fissões, fusões e translocações que ocorrem e que são facilitadas
617 pelas características dos cromossomos holocêntricos (Vershina, Anokhin & Lukhtanov, 2015).
618 Dessa forma, quando esse evento ocorre como nos estudos de Šichová *et al.* (2016) em *Leptidea*
619 *amurensis*, é possível realizar um estudo filogenético e identificar a evolução cariotípica da espécie
620 levando em consideração somente o *cluster* de DNAr 18S.

621 O padrão de RON na superfamília Noctuoidea é a presença de somente uma marcação
622 intersticial, exceto em *Spodoptera latifascia* e *S. descoinsi*, que apresentam mais de uma marcação
623 (Maffei, Pompolo & Petitpierre, 2004; Nguyen *et al.*, 2010). Uma marcação nos núcleos de *A.*
624 *gemmatalis* e *C. includens* confirma o observado na superfamília, o que corrobora a conservação
625 cariotípica quanto ao número dessa sequência, entretanto, devido a dificuldade de observar esses
626 cromossomos, não foi possível observar a localização do DNAr 18S em cromossomos metafásicos,
627 o que nos impossibilitou determinar a posição desse sítio.

628 Embora tenhamos observado uma grande conservação cariotípica quanto ao $2n$,
629 tamanho cromossômico, sistemas sexuais e DNAr 18S, diferenças nos padrões de distribuição da
630 heterocromatina foram observados. Esses procedimentos são relevantes na busca de marcadores
631 cromossômicos espécie-específicos e população-específica na contribuição de análises evolutivas e
632 merecem atenção, uma vez que estes são os primeiros resultados obtidos das espécies estudadas.
633 Dessa forma, nossos dados corroboram os estudos Zahiri *et al.* (2011), confirmando a posição
634 filogenética do gênero *Anticarsia* em Erebiidae, desta vez contributiva por uma abordagem
635 citogenética.

636 Na análise do cladograma gerado com a amplificação do gene COI entre os indivíduos
637 de *A. gemmatalis* das diferentes populações, foi possível observar a formação de dois grupos (Fig.
638 5). O primeiro grupo reuniu espécimes de *A. gemmatalis* de GO, MT e PR. O segundo grupo foi

639 representado pelo indivíduo escolhido para ser o grupo externo representado pela espécie *Bombyx*
640 *mori*, popularmente conhecido como bicho-da-seda, lepidóptero da superfamília Bombycoidea.

641 A distância evolutiva entre os dois grupos foi de 0,134, o que representa uma baixa
642 variação levando em consideração de que se tratam de espécies de superfamílias diferentes. Dentro
643 do Grupo 1 a variação da distância genética foi de 0,024 em relação às sequências analisadas. Yano
644 (2012) comparou as mesmas sequências dos espécimes de Mauá da Serra/ PR, Campo Verde/ MT e
645 Morrinhos/ GO e ainda mais de Luiz Eduardo de Magalhães (Formosa do Rio Preto) em relação à
646 três fragmentos de regiões de gene mitocondriais de COI, COII e CytB para análise populacionais e
647 verificou que os haplótipos identificados variam de acordo com a região de coleta, porém não cita
648 sobre a divergência evolutiva da espécie, analisando cada gene isolado do grupo.

649 Dessa forma, podemos sugerir novamente que a ausência de variações intraespecíficas
650 nas amostras analisadas por nós, estejam relacionadas por se tratar de uma região geneticamente
651 conservada.

652 Em um estudo realizado no Canadá, o segundo maior país do mundo e com área de
653 coleta abrangente, observou-se uma variação intraespecífica em *A. gemmatalis*, concluindo que
654 somente uma variação maior do que 2% configura essa variação (Zahiri *et al.*, 2014). O mesmo foi
655 constatado no trabalho de Dincă *et al.* (2011) realizado na Europa, no qual identificou casos de
656 divergências intraespecíficas no COI devido à abrangente amostragem dos materiais de estudo.

657 A espécie identificada como *A. gemmatalis* já possuía dados de sequenciamentos
658 parciais para a região COI depositados no GenBank e no BOLD, e nossas análises confirmam a
659 conservação dessa espécie. Zahiri *et al.* (2014) alocou *A. gemmatalis* em Erebidae utilizando esse
660 mesmo marcador associado a outros marcadores nucleares. Nossos dados moleculares, associados
661 aos resultados citogenéticos, corroboram a nova posição da espécie, e trazem a luz as diferenças
662 entre os representantes de Erebidae e Noctuidae.

663

664 CONCLUSÃO

665

666 Reconhecendo o potencial da aplicação de diferentes metodologias de análise do
667 genoma, conclui-se que estudos complementares, tais como a otimização das técnicas citogenéticas,
668 análises cromossômicas em outras espécies do grupo, e a utilização de outros marcadores
669 moleculares (nucleares e mitocondriais), haverá um incremento em estudos biológicos de *A.*
670 *gemmatalis* e *C. includens*, auxiliando na compreensão da evolução do grupo.

671

672 REFERÊNCIAS

673

674 **Cabral-de-Mello DC, De Moura RC, Melo AS, Martins C. 2010.** Evolutionary dynamics of
675 heterochromatin in the genome of *Dichotomius* beetles based on chromosomal analysis. *Genetica*
676 **139**: 315-325.

677

678 **Corrêa-Ferreira BS, Alexandre TM, Pellizzaro EC. 2010.** *Práticas de Manejo de Pragas*
679 *Utilizadas na Soja e seu Impacto sobre a Cultura*. Londrina: Embrapa-CNPSo.

680

681 **Costa Lima A. 1950.** Lepidóptero, 2ª parte. In: Costa Lima A. *Insetos do Brasil*. Rio de Janeiro:
682 De. Imprensa Nacional, 7-134.

683

684 **Dincă V, Zakharov EV, Hebert PDN, Vila R. 2011.** Complete DNA barcode reference library for a
685 country's butterfly fauna reveals high performance for temperate Europe. *Proceedings. Biological*
686 *Sciences* **278**: 347-355.

687

688 **Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994.** DNA *primers* for amplification of
689 mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular*
690 *Marine Biology and Biotechnology* **3**: 294-299.

691

692 **Fuková I, Nguyen P, Marec F. 2005.** Codling moth cytogenetics: karyotype, chromosomal location
693 of DNAr, and molecular differentiation of sex chromosomes. *Genome* **48**: 1083-1092.

694

695 **Goodpasture C. 1976.** High-resolution Chromosome Analysis in Lepidoptera. *Annals of the*
696 *Entomological Society of America* **69**: 764-771.

697

698 **Grewal SI, Jia S. 2007.** Heterochromatin revisited. *Nature Reviews Genetics* **8**: 35-46.

699

700 **Guerra M, Cabral G, Cuacos M, González-García M, Vega J, Puertas MJ. 2010.** Neocentrics
701 and holokinetics (holocentrics): chromosomes out of centromeric rules. *Cytogenetic and Genome*
702 *Research* **1-3**: 82-96.

703

704 **Hall T. 2011.** BioEdit: An important *software* for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*
705 **2**: 60-61.

706

707 **Heidemann CI. 2009.** Cariótipo e Identificação de Marcadores Moleculares Sexo-Específico em
708 *Diatraea saccharalis*. Dissertação, Universidade Estadual de Maringá.

709

710 **Hipp AL, Escudero M, Chung K-S, 2013.** Holocentric Chromosomes. In: Maloy S, Hughes K.
711 *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Amsterdam: Elsevier, 499-501.

712

713 **Hoffmann-Campo CB, Moscardi F, Corrêa-Ferreira BS, Oliveira LJ, Sosa-Gómez DR,**
714 **Panizzi Ar, Corso IC, Gazzoni DL, Oliveira EB. 2000.** *Pragas da soja no Brasil e seu manejo*
715 *integrado*. Londrina: Embrapa-CNPSo.

716

717 **Jung S, Duwal RK, Lee S. 2011.** COI barcoding of true bugs (Insecta, Heteroptera). *Molecular*
718 *Ecology Resources* **2**: 266-270.

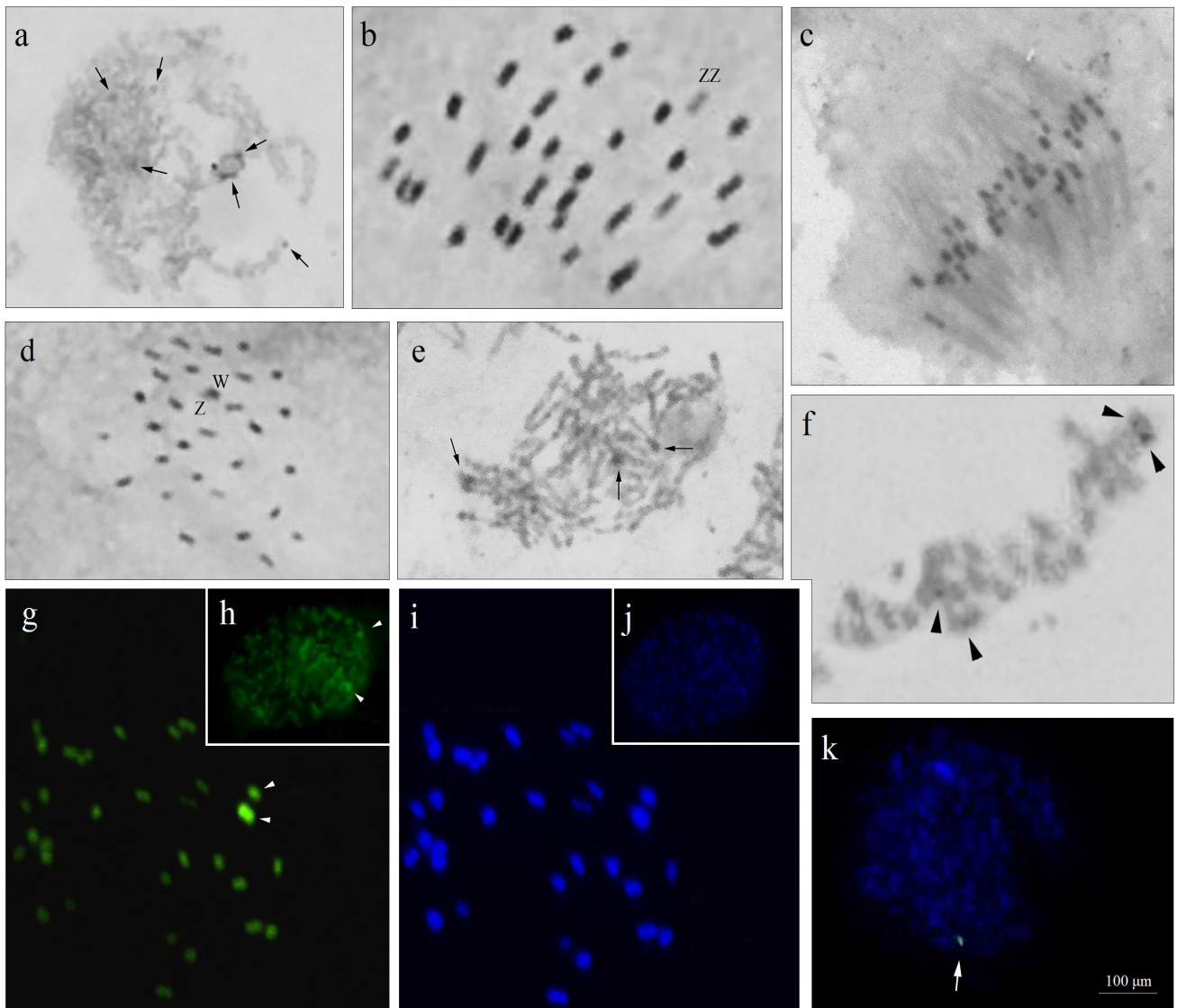
719

720 **Kirov I, Divashuk M, Laere KV, Soloviev A, Khrustaleva L. 2014.** An easy “SteamDrop”
721 method for high quality plant chromosome preparation. *Molecular Cytogenetics* **7**: 1-10.

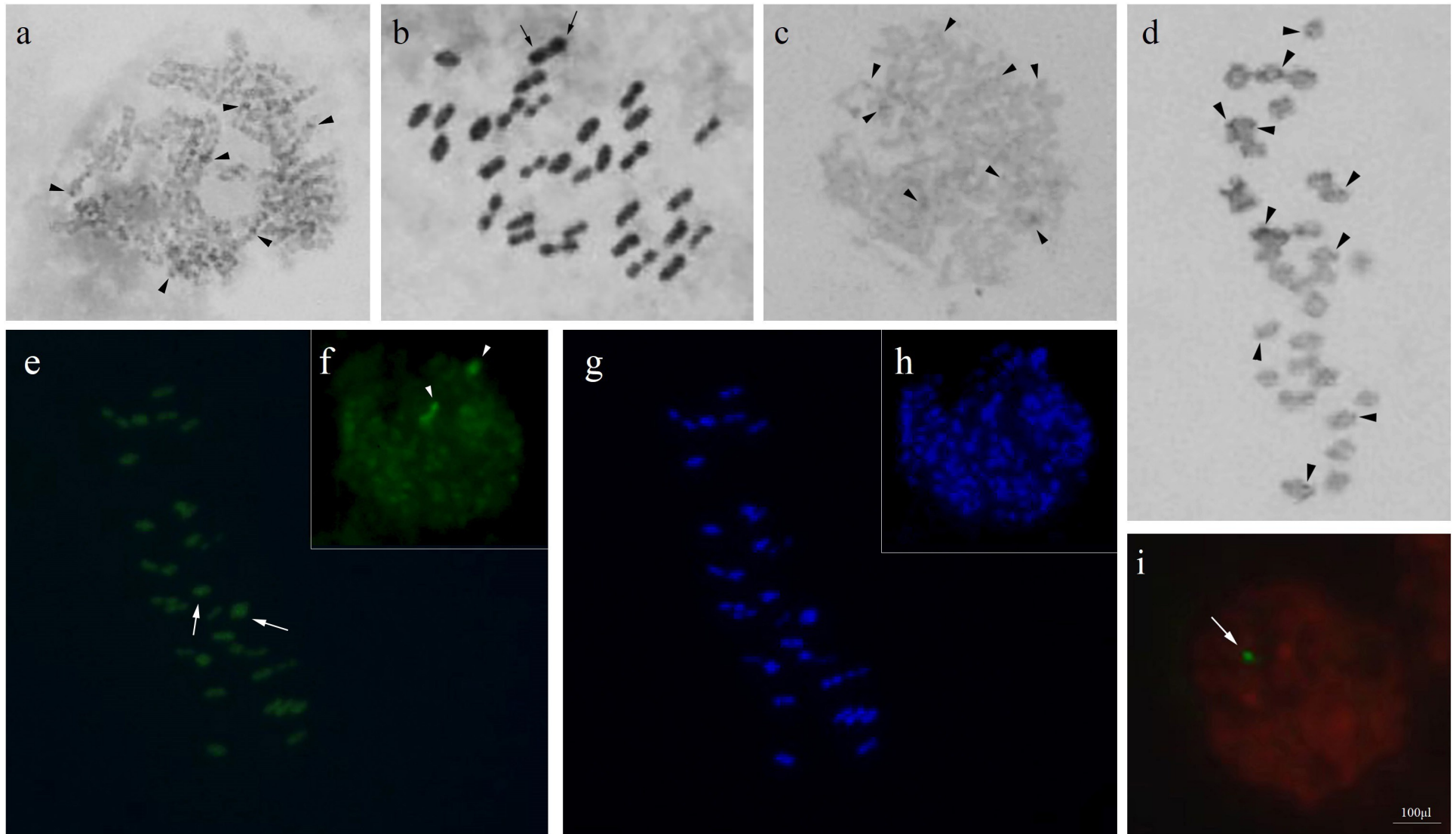
- 722
 723 **Kitching IJ. 1984.** Spectacles and silver Ys : a synthesis of the systematics, cladistics and biology
 724 of the Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of the British Museum* **54**: 76-262.
 725
- 726 **Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016.** Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for
 727 Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**: 1870-1874.
 728
- 729 **Lukhtanov VA. 2000.** Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera
 730 (Insecta). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **38**: 73-79.
 731
- 732 **Lunt DH, Zhang DX, Szymura JM, Hewitt GM. 1996.** The insect cytochrome oxidase I gene:
 733 evolutionary patterns and conserved *primers* for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology* **5**:
 734 153-165.
 735
- 736 **Maffei EMD, Pompolo SG, Petitpierre E. 2004.** C-banding and fluorescecent *in situ* hybridization
 737 with DNAr sequences in chromosomes of *Cycloneda sanguine* Linnaeus (Coleoptera,
 738 Coccinellidae). *Genetics and Molecular Biology* **27**: 191-195.
 739
- 740 **Mandrioli M. 2002.** Cytogenetic characterization of telomeres in the holocentric chromosome of
 741 the lepidopteran *Mamestra brassicae*. *Chromosome Research* **10**: 279-286.
 742
- 743 **Mandrioli M, Manicardi GC, Marec F. 2003.** Cytogenetic and molecular characterization of the
 744 MBSAT1 satellite DNA in holokinetic chromosomes of the cabbage moth, *Mamestra brassicae*
 745 (Lepidoptera). *Chromosome Research* **11**: 51-56.
 746
- 747 **Mitchell A, Mitter C, Regier JC. 2006.** Systematics and evolution of the cutworm moths
 748 (Lepidoptera: Noctuidae): Evidence from two protein-coding nuclear genes. *Systematic Entomology*
 749 **31**: 21-46.
 750
- 751 **Moscardi F, Bueno AF, Sosa-Gómez DR, Roggia S, Hoffmann-Campo CB, Pomari AF, Corso**
 752 **IC, Yano SAC. 2012.** Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: Hoffmann-Campo CB, Corrêa-
 753 Ferreira BP, Moscardi, F. *Soja- Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga*. Londrina:
 754 Embrapa CNPSo, 213-334.
 755
- 756 **Mutanen M, Wahlberg N, Kaila L. 2010.** Genomic outposts serve the phylogenomic pioneers:
 757 designing novel nuclear markers for genomic DNA extractions of lepidoptera. *Systematic Biology*
 758 **277**: 2839-2848.
 759
- 760 **Nguyen P, Sahara K, Yoshido A, Marec F. 2010.** Evolutionary dynamics of DNAr clusters on
 761 chromosomes of moth and butterflies (Lepidoptera). *Genetica* **138**: 343-354.
 762
- 763 **Pine MB, Gallo RB, Da Silva CRM, Pezenti LF, De Domenico FC, Loreto V, Da Rosa R. 2017.**
 764 Chromosome mapping in *Abracris flavolineata* (De Geer, 1773) (Orthoptera) from the Iguaçu
 765 National Park – Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil. *Comparative Cytogenetics* **11**: 203-212.
 766
- 767 **Pinkel D, Straume T, Gray JW. 1986.** Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity,
 768 fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 2934-2938.
 769
- 770 **Regier JC, Zwick A, Cummings MP, Kawahara AY, Cho S, Weller S, Roe A, Baixeras J,**
 771 **Brown JW, Parr C, Davis DR, Epstein M, Hallwachs W, Hausmann A, Janzen DH, Kitching**
 772 **IJ, Solis MA, Yen SH, Bazinet AL, Mitter C. 2009.** Toward reconstructing the evolution of

- 773 advanced moths and butterflies (Lepidoptera: Ditrysia): an initial molecular study. *BMC*
 774 *Evolutionary Biology* **9**: 280-300.
 775
- 776 **Rocha MF, Pine MB, Oliveira EFAS, Loreto V, Gallo RB, Da Silva CRM, Domenico FC, Da**
 777 **Rosa R. 2015.** Spreading of heterochromatin and karyotype differentiation in two *Tropidacris*
 778 Scudder, 1869 species (Orthoptera, Romaleidae). *Comparative Cytogenetics* **9**: 435-450.
 779
- 780 **Robinson. 1971.** *Lepidoptera Genetics*. Oxford: Pergamon Press.
 781
- 782 **Saura A et al. 2013.** Chromosome evolution in Neotropical butterflies. *Hereditas* **150**: 26-37.
 783
- 784 **Schweizer D. 1980.** Simultaneous fluorescent staining of R bands and specific heterochromatic
 785 regions (DA-DAPI bands) in human chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics* **27**: 190-193.
 786
- 787 **Sharma VL, Sobti RC. 2002.** Cytogenetics of lepidopteran insects. In: Sobti RC. *Some Aspects of*
 788 *Chromosome Structure and Functions*. New Delhi: Narosa Publishing House, 192-206.
 789
- 790 **Šichová J, Ohno M, Dincă V, Watanabe M, Sahara K, Marec F. 2016.** Fissions, fusions, and
 791 translocations shaped the karyotype and multiple sex chromosome constitution of the northeast-
 792 Asian wood white butterfly, *Leptidea amurensis*. *Biological Journal of the Linnean Society* **118**:
 793 457-471.
 794
- 795 **Sumner AT. 1972.** A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin.
 796 *Experimental Cell Research* **75**: 304-306.
 797
- 798 **Suomalainen E. 1969.** Chromosome evolution in the Lepidoptera. In: DARLINGTON, C.D.;
 799 LEWIS, K.R. *Chromosome Today* **2**: 132-138.
 800
- 801 **Suzuki KM, Arias MC, Giangarelli DC, Freiria GA, Sofia SH. 2010.** Mitochondrial DNA
 802 diversity of orchid bee *Euglossa fimbriata* (Hymenoptera: Apidae) populations assessed by PCR-
 803 RFLP. *Biochemical Genetics* **48**: 326-341.
 804
- 805 **Traut W, Sahara K, Marec F. 2007.** Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera.
 806 *Sexual Development* **1**: 332-346.
 807
- 808 **Vershinina AO, Anokhin BA, Lukhtanov VA. 2015.** Ribosomal DNA clusters and telomeric
 809 (TTAGG)_n repeats in blue butterflies (Lepidoptera, Lycaenidae) with low and high chromosome
 810 numbers. *Comparative Cytogenetics* **9**: 161-171.
 811
- 812 **Wahlberg N, Wheat CW. 2008.** Genomic outposts serve the phylogenomic pioneers: designing
 813 novel nuclear markers for genomic DNA extractions of lepidoptera. *Systematic Biology* **2**: 231-242.
 814
- 815 **Wrench DL, Kethley JB, Norton RA. 1994.** Cytogenetics of holokinetic chromosomes and
 816 inverted meiosis: keys to the evolutionary success of mites, with generalization on eukaryotes. In:
 817 Houck MA. *Mites: Ecological and Evolutionary Analyses of Life-History Patterns*. New York:
 818 Chapman & Hall, 282-343.
 819
- 820 **Yano SAC, Abreu AG, Zucchi MI, Brandão KLS, Sosa-Gómez DR. 2012.** *Variabilidade*
 821 *genética em populações de Anticarsia gemmatalis Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) nas regiões*
 822 *produtoras de soja no Brasil*. Londrina: Embrapa-CNPSO.
 823

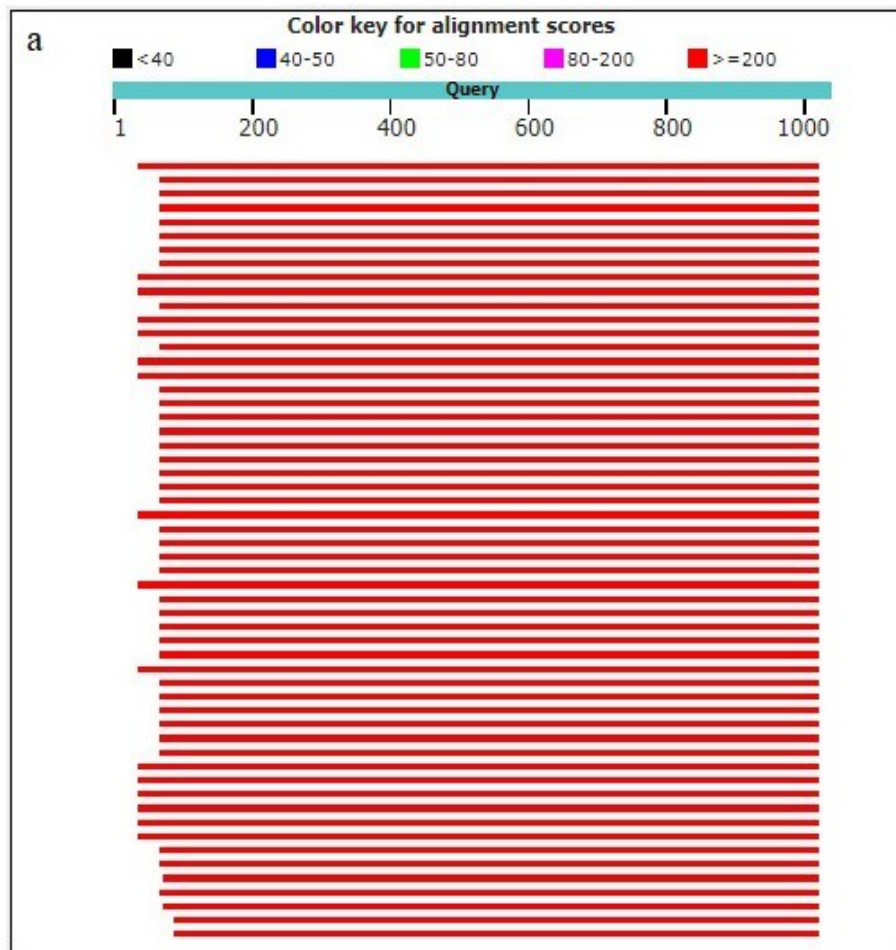
- 824 **Zahiri R, Kitching IJ, Lafontaine JD, Mutanen M, Kaila L, Holloway JD, Wahlberg N. 2011.**
825 A new molecular phylogeny offers hope for a stable family level classification of the Noctuoidea
826 (Lepidoptera). *Zoologica Scripta* **40**: 158-173.
827
- 828 **Zahiri R, Holloway JD, Kitching IJ, Lafontaine JD, Mutanen M, Wahlberg N. 2012.** Molecular
829 phylogenetics of Erebidae (Lepidoptera, Noctuoidea). *Systematic Entomology* **37**: 102-124.
830
- 831 **Zahiri R, Lafontaine JD, Schmidt C, deWaard JR, Zakharov EV, Hebert PDN. 2014.** A
832 Transcontinental Challenge – A Test of DNA Barcode Performance for 1,541 Species of Canadian
833 Noctuoidea (Lepidoptera). *PloS One* **9**: 1-12.
834
- 835 **ZHANG Z-Q. 2011.** ORDER LEPIDOPTERA LINNAEUS, 1758. IN: ZHANG Z-Q. *ANIMAL BIODIVERSITY: AN*
836 *OUTLINE OF HIGHER-LEVEL CLASSIFICATION AND SURVEY OF TAXONOMIC RICHNESS*. AUCKLAND: MAGNOLIA
837 PRESS, 212-221.



839 **Figura 1.** Prancha de *A. gemmatalis*. (A) Paquíteno corado com Giemsa; (B) Metáfase II de macho
 840 corada com Giemsa; (C) Anáfase II corada com Giemsa; (D) Metáfase II de fêmea corada com
 841 Giemsa; (E) Paquíteno com bandamento-C; (F) Metáfase II de macho com bandamento-C; (G)
 842 Metáfase I corada com CMA₃; (H) Núcleo interfásico corado com CMA₃; (I) Metáfase I corada com
 843 DAPI; (J) Núcleo interfásico corado com DAPI; (K) Núcleo interfásico após Hibridização
 844 Fluorescente *in situ* com sonda de DNAr 18S marcada com biotina e contra-corado com DAPI.
 845 Setas e cabeças de setas representam marcações positivas em bandamento-C, CMA₃/DAPI e FISH.



846 **Figura 2.** Prancha de *C. includens*. (A) Paquíteno corado com Giemsa; (B) Metáfase II corada com Giemsa; (C) Paquíteno com bandamento-C; (D)
 847 Metáfase II com bandamento-C; (E) Metáfase II corada com CMA₃; (F) Núcleo interfásico corado com CMA₃; (G) Metáfase II corada com DAPI; (H)
 848 Núcleo interfásico corado com DAPI; (I) Núcleo interfásico após Hibridização Fluorescente *in situ* com sonda de DNAr 18S marcada com biotina e
 849 contra-corado com Iodeto de Propídeo.

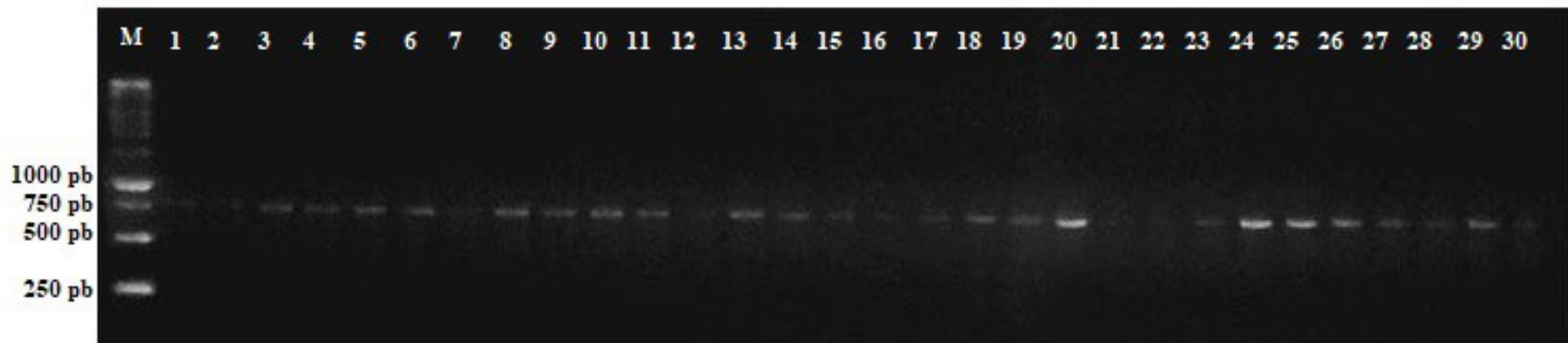


b

>*Anticarsia gemmatalis* 18S ribosomal RNA gene partial sequence
GCTTCAGTGC GCAATCCGGTGAATTGAACAGTAATGGGAGCAATGATCAGTGAGCCGCCGTAATCTGTTC
AGAATCCAAATCTATCCGTGCTCTTCGTGAGGTGTCGAAGGTGGGCCGAACAAGTTTAGCTTTGAACAAA
TTAGAAGTGCTCAAGCCGGCTCAAATGCTGCTTGATATTTCTTGCATGGAATAATAGAATATGATCTCG
GGTCTATTTGTTGGTTTTTCAGAACTCCGAGGGTAATGATTAATAGGGATAACTGGGGGCATTTCGATTGC
GACGTTAGAGGTGGAAATTTCTGGATCGTCGAGACGAACATCAGCGAAAGCATTTCGCAAAAGGTGTTTT
CATCAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGTTGGAAGGCGATTAGATAAAGCACTAGTTCTAACCGTAAATATG
TCATCTAGCGATCCGCCGACGTTACTACAATGGTTCGGCGGGCAGCTTCGGGAAACCAGAGATTTTGGGA
CTCCGGGGGGAGTATGGGTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACGCACCAGGAGTGGA
GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAATCTCACCAGGCCCGGACACCGGAAGGATTGACAGATTA
ACAGCTCTTTCTTGATTCGGTGGTGGTGGTGGCGATGGCCGTTCTTAGTTTCGTGGAGCGATTTGTCTGG
TTAATCCGGTAACGAACGAGACTCTAGCCTGCTAAATAGCCGTCGTCATTTAGGTGTGCAGTGCTCCG
TCACGCAACTCACTGGCGACGTATTAATTTCTTCTTAGAGGGACCGCGGCTTCGAGCCGCACGAGATT
GAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCTGGGCCGCACGCGCTACACTGAAGGAATCAGCA
TGTTCTCCCTGGCCTAGAGGCCCGGGCAACCCGCTGAAACTCCTTCGTGCTGGGGATTGGGGTTTGAAT
TATCCCCATAAACGAGGAATCCTAGAAGCGGAGTACGCGCTATAAGGTCTTT

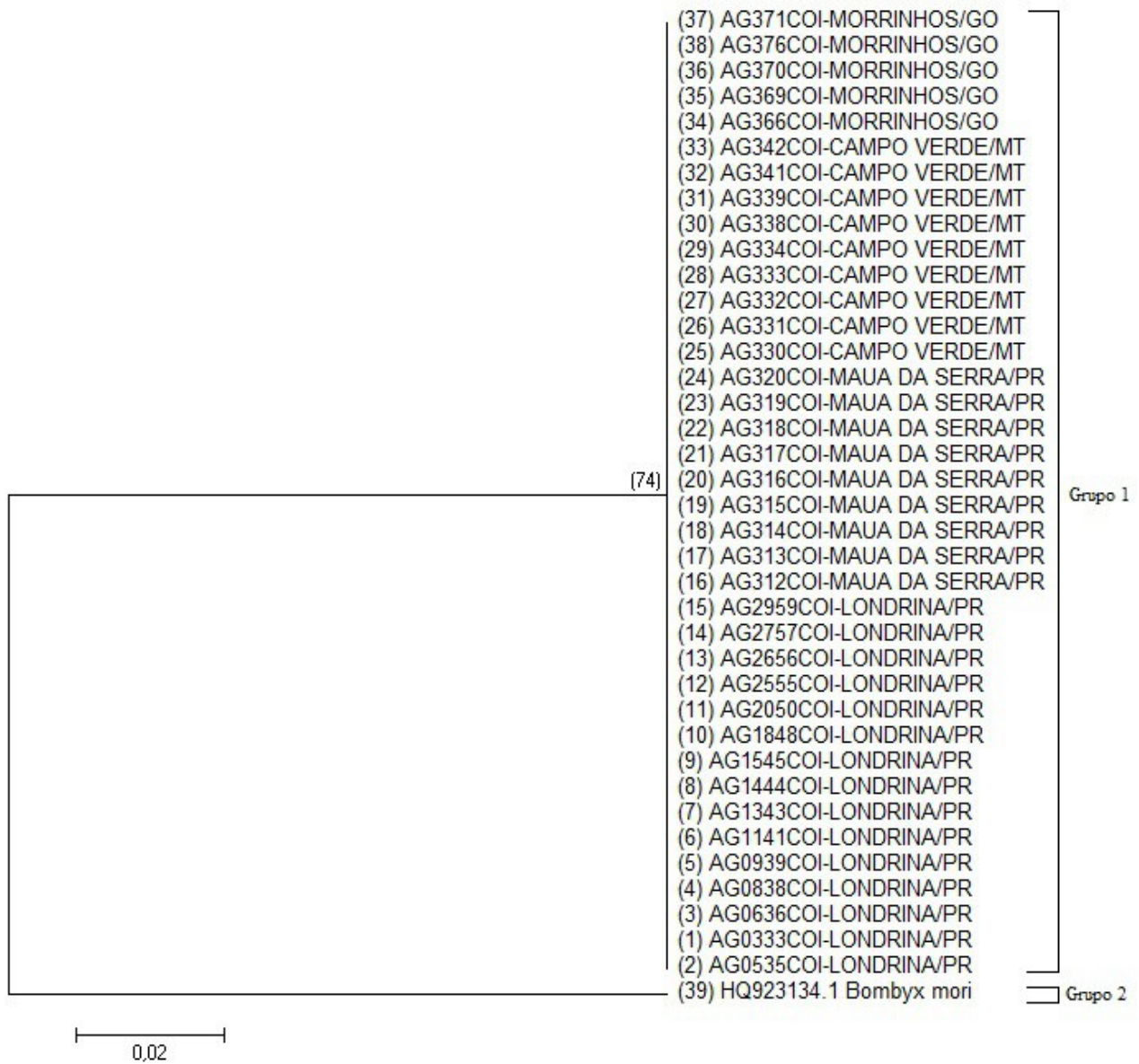
851 **Figura 3.** (A) *Blast* da sequência parcial de DNAr 18S (B) Sequência parcial obtida pelo
852 sequenciamento de DNAr 18S.

853
854
855
856



858 **Figura 4.** Eletroforese (agarose 1%) para visualização dos produtos de PCR de *A. gemmatalis*. À esquerda, “M”= marcador molecular de 1 kb; 1 à 10 =
859 espécimes coletadas em Londrina, PR – Brasil.

860
861
862



864
 865 **Figura 5.** Cladograma representando distância genética (K2P) de diferentes populações de *A.*
 866 *gemmatalis*. Espécimes coletados em Morrinhos/GO, Campo Verde/MT, Mauá da Serra/PR e
 867 Londrina/PR. Grupo externo representado por *Bombyx mori*.

868

869 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

870

871 Os dados obtidos pela caracterização citogenética de duas espécies pragas da soja,
872 identificações de marcações citogenéticas que podem servir de base para a confirmação das
873 características das famílias Erebidae e Noctuidae.

874 A análise cromossômica permitiu concluir que:

875 - O número diplóide foi o mesmo para ambas espécies, $2n = 62$;

876 - O padrão de distribuição da heterocromatina foi diferente em *A. gemmatalis* e *C. includens*, fato
877 evidenciado em bandamento-C e coloração com fluorocromo base-específicos;

878 - O DNAr 18S foi detectado por FISH em ambas espécies no núcleo interfásico.

879 Dados moleculares referentes ao COI de *A. gemmatalis* de diferentes regiões do Brasil
880 são indicativos que esse gene é muito conservado na espécie. Estudos com outros marcadores
881 mitocondriais e moleculares e sua identificação citogenética devem ser realizados para a
882 confirmação das linhas evolutivas do grupo, considerando a superfamília Noctuoidea um importante
883 objeto de estudo para a resolução citotaxonômica de lepidópteros e outros organismos.

884

885

886 **REFERÊNCIAS**

887

888 ARIAS, M.C.; FRANCISCO, F. De O.; SILVESTRE, D. O DNA mitocondrial em estudos
889 populacionais e evolutivos de meliponíneos. In: MELO, G.A.R.; ALVES-DOS-SANTOS, I.
890 **Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure.** Criciúma: UNESC, 2003.
891 p. 305-309.

892

893 BARRIONUEVO, M.J., et al. Life table studies of *Rachiplusia nu* (Guenée) and *Chrysodeixis* (= *Pseudoplusia*) *includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) on artificial diet. **Florida Entomologist**, Londrina,, v. 95, n. 4, p. 944-951, dez. 2012.

896

897 BOVERI, T. **Ergebnisse uber die Konstitution der Chromatischen Substanz des Zellkerns.** 1 ed. Jena: Gustav Fischer, 1904. 152 p.

899

900 BUENO, R.C. et al. Lepidopteran larvae consumption of soybean foliage: basis for developing
901 multiple-species economic thresholds for pest management decisions. **Pest Management Science**,
902 v. 67, n. 2, p. 170-174, fev. 2011.

903

904 CONAB, 2017. **Levantamentos de Safra.** 2018. Disponível em:
905 <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/18_01_11_14_17_49_graos_4o_levantamento.pdf>. Acesso em: 24 de janeiro de 2018.

907

908 CORRÊA-FERREIRA, B.S. et al. **Práticas de Manejo de Pragas Utilizadas na Soja e seu Impacto sobre a Cultura.** Londrina: Embrapa-CNPSo, 2010. 16 p. (Embrapa-CNPSo. Circular Técnica, 30).

911

912 COSTA LIMA, A. Lepidóptero, 2ª parte. In: _____. **Insetos do Brasil.** Rio de Janeiro: De. Imprensa Nacional, 1950. p. 7-134.

914

915 DEGRANDE, P.E.; VIVAN, L.M. Pragas da Soja. In: **Tecnologia e Produção: Soja e Milho 2011/2012.** Maracaju: Fundação MS, 2012. p. 117-170.

917

918 DUARTE, M. *et al.* Lepidoptera. In: RAFAEL, J.A. *et al.* **Insetos do Brasil: Diversidade e Taxonomia.** 1. ed. Ribeirão Preto: Holos, 2012. p. 626-682.

920

921 EMBRAPA. **Área de estudo.** 2016. Disponível em:
922 <https://www.cnpm.embrapa.br/projetos/agspec/conteudo/area_estudo.html>. Acesso em 08 set. 2017.

924

925 FERGUSON-SMITH, M.A. History and evolution of cytogenetics. **Mol. Cytogenet.**, v.8, n.19, p.1-8, mar. 2015.

927

928 FISCHER, T.D. **Avaliação do inseticida biológico (*Bacillus thuringiensis*) no manejo de pragas em cultivares de soja (*Glycine max* L.) modificadas geneticamente.** 2014. 32 fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia – Departamento de Estudos Agrários da UNIJUÍ) – Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2014.

932

933 FOLMER, O. *et al.* DNA *primers* for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 3, n.5, p. 294-299, out. 1994.

936

33

- 937 FUGI, C.G.Q.; LOURENÇÃO, A.L.; PARRA, J.R.P. Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean
938 genotypes with different degrees of resistance to insects. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 1, p. 31-35,
939 jan. 2005.
- 940
941 GALLO, D. et al. Os insetos e o Reino Animal. In: _____. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba:
942 Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz - FEALQ, 2002. p. 11-106.
- 943
944 GOODPASTURE, C. High-resolution Chromosome Analysis in Lepidoptera. **Annals of the**
945 **Entomological Society of America**, v. 69, n. 4, p. 764-771, jul. 1976.
- 946
947 GREWAL, S.I.; JIA, S. Heterochromatin revisited. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 1, p. 35-46,
948 jan. 2007.
- 949
950 GUERRA, M. *et al.* Neocentrics and holokinetics (holocentrics): chromosomes out of centromeric
951 rules. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 1-3, n. 129, p. 82-96, jul. 2010.
- 952
953 HERZOG, D.C.; TODD J.H. Sampling velvetbean cartepillar on soybean. In: KOGAN, M.;
954 HERZOG, D.C. **Sampling methods in soybean entomology**. 1 ed. New York: Springer-Verlag,
955 1980. p. 107-140.
- 956
957 HEIDEMANN, C.I. **Cariótipo e Identificação de Marcadores Moleculares Sexo-Específico em**
958 ***Diatraea saccharalis***. 2009. 59 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) –
959 Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.
- 960
961 HIPPI, A.L.; ESCUDERO, M., CHUNG, K.-S. Holocentric Chromosomes. In: MALOY, S.;
962 HUGHES, K. **Brenner's Encyclopedia of Genetics**, 2 ed. Amsterdam: Elsevier. 2013. p. 499-501.
- 963
964 HOFFMANN-CAMPO, C. et al. **Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado**. Londrina:
965 Embrapa-CNPSo, 2000. 70 p. (Embrapa-CNPSo. Circular Técnica, 30).
- 966
967 JUNG, S.; DUWAL, R.K.; LEE, S. COI barcoding of true bugs (Insecta, Heteroptera). **Molecular**
968 **Ecology Resources**, v. 2, n. 11, p. 266-270, mar. 2011.
- 969
970 JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. 9. ed. Rio de Janeiro:
971 Guanabara Koogan, 2012. 376p.
- 972
973 KITCHING, I.J. Spectacles and silver Ys : a synthesis of the systematics, cladistics and biology of
974 the Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of the British Museum**, v. 54, n. 2, p. 76-262,
975 1987.
- 976
977 KRISTENSEN, N.P.; SCOBLE, M.J.; KARSHOLT, O. Lepidoptera phylogeny and systematics: the
978 state of inventorying moth and butterfly diversity. **Zootaxa**, v. 1668, p. 699-747, dez. 2007.
- 979
980 LUKHTANOV, V.A. Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera
981 (Insecta). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, Germany, v.38, n.2, p.
982 73-79, jun. 2000.
- 983
984 LUNT, D.H. et al. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved
985 primers for phylogenetic studies. **Insect Molecular Biology**, v.5, n. 3, p. 153-165, ago. 1996.
- 986
987 MAGRINI, E.A.; BOTELHO, P.S.M.; SILVEIRA NETO, S. Biologia de *Anticarsia*
988 *gemmatalis* Hübner, 1818 na cultura de soja, *Glycine max* (L.) Merrill.

- 989 **Scientia Agricola**, v. 56, p. 527-535, 1999.
990
- 991 MILANO, P. **Influência da nutrição e temperatura na reprodução de representantes de**
992 **Noctuidae, Crambidae, Tortricidae e Elachistidae**. 2008. 75 f. Tese (Doutorado em Entomologia)
993 – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2008.
994
- 995 MITCHELL, A.; MITTER, C.; REGIER, J.C. Systematics and evolution of the cutworm moths
996 (Lepidoptera: Noctuidae): Evidence from two protein-coding nuclear genes. **Systematic**
997 **Entomology**, v. 31, n. 1, p. 21-46, jan. 2006.
998
- 999 MOSCARDI, F. *et al.* Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: HOFFMANN-CAMPO, C.B.;
1000 CORRÊA-FERREIRA, B.P.; MOSCARDI, F. **Soja – Manejo Integrado de Insetos e outros**
1001 **Artrópodes-Praga**. 1 ed. Londrina: Embrapa CNPSo, 2012. p. 213-334.
1002
- 1003 MUTANEN, M.; WAHLBERG, N.; KAILA, L. Comprehensive gene and taxon coverage elucidates
1004 radiation patterns in moths and butterflies. **Proceedings of the Royal Society (B)**, v. 277, n. 1695,
1005 p. 2839-2848, maio 2010.
1006
- 1007 NEPOMUCENO, A.L.; FARIAS, J.R.B.; NEUMAIER, N. **Árvore do Conhecimento: soja**. 2008.
1008 Disponível em:
1009 <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/soja/arvore/CONTAG01_24_271020069131.html>.
1010 Acesso em 20 de fevereiro de 2017.
1011
- 1012 NGUYEN, P. *et al.* Evolutionary dynamics of DNAr clusters on chromosomes of moth and
1013 butterflies (Lepidoptera). **Genetica**, v.138, n.3, p. 343-354, mar. 2010.
1014
- 1015 PANIZZI, A.R. *et al.* **Insetos da soja no Brasil**. Londrina: Embrapa-CNPSo, 1977. 20 p. (Embrapa
1016 CNPSo. Boletim Técnico, 1).
1017
- 1018 PIGNATI, W.; OLIVEIRA, N.P.; DA SILVA, A.M.C. Vigilância aos agrotóxicos: quantificação do
1019 uso e previsão de impactos na saúde-trabalho-ambiente para os municípios brasileiros. **Ciênc.**
1020 **saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v.19, n.12, p.4669-4678, dez. 2014.
1021
- 1022 REGIER, J.C. *et al.* Toward reconstructing the evolution of advanced moths and butterflies
1023 (Lepidoptera: Ditrysia): an initial molecular study. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 1, p. 280-
1024 300, dez. 2009.
1025
- 1026 ROBINSON, R. **Lepidoptera Genetics**. Oxford: Pergamon Press, 1971. 687 p.
1027
- 1028 ROSSETTO, R.; SANTIAGO, A.D. **Árvore do Conhecimento: Cana-de-açúcar**. 2008.
1029 Disponível em:<[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_53_711200516718.html)
1030 [acucar/arvore/CONTAG01_53_711200516718.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_53_711200516718.html)>. Acesso em 20 ago. 2017.
1031
- 1032 ROY, V. *et al.* Evolution of the chromosomal location of rDNA genes in two *Drosophila* species
1033 subgroups: *ananassae* and *melanogaster*. **Heredity**, v. 94, n. 4, p. 388-395, abr. 2005.
1034
- 1035 SACCHET, A.M.O.F. Variabilidade genética: ponto de partida para o melhoramento de plantas. In:
1036 _____. **Genética para que te quero?** Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1999. p.99-104.
1037
- 1038 SALVADORI, J.R.; PEREIRA, P.R.V.S. **Manejo integrado de corós em trigo e culturas**
1039 **associadas**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 13p. (Embrapa-CNPT. Comunicado Técnico, 203).
1040

- 1041 SEDIYAMA, T. **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina: Mecnas, 2009. 314p.
1042
- 1043 SHARMA, V.L.; SOBTI, R.C. Cytogenetics of lepidopteran insects. In: SOBTI, R.C. **Some Aspects**
1044 **of Chromosome Structure and Functions**. New Delhi: Narosa Publishing House, 2002. p. 192-
1045 206.
- 1046
1047 ŠÍCHOVÁ, J. *et al.* Fissions, fusions, and translocations shaped the karyotype and multiple sex
1048 chromosome constitution of the northeast-Asian wood white butterfly, *Leptidea amurensis*.
1049 **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 118, n. 3, p. 457-471, jul. 2016.
- 1050
1051 SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. Variações no Número e na Estrutura dos Cromossomos. In:
1052 _____. **Fundamentos de Genética**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p.110-133.
1053
- 1054 SOSA-GÓMEZ, D. R. et al. **Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da**
1055 **cultura da soja**. 3 ed. Londrina: Embrapa CNPSo, abr. 2014. 100 p.
- 1056
1057 SUMNER, A. T. Chapter 7: Constitutive heterochromatin. In: _____. Chromosomes: Organization
1058 and Function. 1. ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2003. p. 84-96.
- 1059
1060 SUOMALAINEN, E. Chromosome evolution in the Lepidoptera. In: DARLINGTON, C.D.;
1061 LEWIS, K.R. **Chromosome Today**. v. 2, Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press,
1062 1969. p. 132-138.
- 1063
1064 SUTTON, W.S. The chromosomes in heredity. **Biological Bulletin**, Alabama, v. 4, n. 5, p.231-251,
1065 abr. 1903.
- 1066
1067 TRAUT, W.; SAHARA, K.; MAREC, F. Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera.
1068 **Sexual Development**, v. 1, n. 6, p. 332-346, fev. 2007.
- 1069
1070 TRAVISI, C. M; NIJKAMP, P; VINDIGNI, G. Pesticide risk valuation in empirical economics: a
1071 comparative approach. **Ecological Economics**; 56: 455-474, 20.
- 1072
1073 TRIPLEHORN, C.A.; JOHNSON, N.F. Ordem Lepidoptera. In: _____. Estudo dos insetos. 7. ed.
1074 São Paulo: Cengage Learning, 2011. p. 544-610.
- 1075
1076 USDA, 2018. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **World Agricultural**
1077 **Supply and Demand Estimates**. Disponível em:
1078 <<https://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/latest.pdf>>. Acesso em: 24 jan. 2018.
- 1079
1080 VALICENTE, F.H.; MOURÃO, A.H.C. Use of By-Products Rich in Carbon and Nitrogen as a
1081 Nutrient Source to Produce *Bacillus thuringiensis* (Berliner)- Based Biopesticide. **Entrop.**
1082 **Entomol.**, Londrina, v.37, n.6, p.702-708, nov.-dez. 2008.
- 1083
1084 WRENSCH, D.L.; KETHLEY, J.B.; NORTON, R.A. Cytogenetics of holokinetic chromosomes and
1085 inverted meiosis: keys to the evolutionary success of mites, with generalization on eukaryotes. In:
1086 HOUCK, M.A. **Mites: Ecological and Evolutionary Analyses of Life-History Patterns**. New
1087 York: Chapman & Hall, 1994. p. 282-343.
- 1088
1089 YANO, S.A.C. *et al.* **Variabilidade genética em populações de *Anticarsia gemmatalis* Hübner**
1090 **(Lepidoptera: Noctuidae) nas regiões produtoras de soja no Brasil**. Londrina: Embrapa-CNPSo,
1091 2012. 1 p. (Embrapa-CNPSo. Separata).
- 1092

- 1093 ZAHIRI, R. *et al.* A new molecular phylogeny offers hope for a stable family level classification of
1094 the Noctuoidea (Lepidoptera). **Zoologica Scripta**, v. 40, n. 2, p. 158-173, mar. 2011.
1095
- 1096 ZAHIRI, R. *et al.* Molecular phylogenetics of Erebidæ (Lepidoptera, Noctuoidea). **Systematic**
1097 **Entomology**, v. 37, n. 1, p. 102-124, out. 2012.
1098
- 1099 ZHANG, Z.-Q. Order Lepidoptera Linnaeus, 1758. In: _____. **Animal biodiversity: An outline of**
1100 **higher-level classification and survey of taxonomic richness**. Auckland: Magnolia Press. 2011. p.
1101 212-221.

1102

1103

1104

1105

1106

1107

Apêndices

1108 **APÊNDICE 1**

1109 Sequência consensado fragmento de DNAr 18S.

1110 >18S-17

1111 GCTTCAGTGC GCAATCCGGTGAATTGAACAGTAATGGGAGCAATGATCAGTGAGCCGCC
1112 GTAATCTGTT CAGAATCCAAATCTATCCGTGCTCTTCGTGAGGTGTCTGAAGGTGGGCCGA
1113 ACAAGTTTAG CTTTGAACAAATTAGAAGTGCTCAAGCCGGCTCAAATGCTGCTTGATAT
1114 TTCTTGCATG GAATAATAGAATATGATCTCGGGTCTATTTGTTGGTTTTTCAGAACTCCGAG
1115 GGTAATGATTA ATAGGGATAACTGGGGGCATTCGTATTGCGACGTTAGAGGTGGAAATTC
1116 TTGGATCGTC GCAGACGAACATCAGCGAAAGCATTGCGCAAAGGTGTTTTTCATCAATCA
1117 AGAACGAAAG TTAGAGGTTCGAAGGCGATTAGATAAAGCACTAGTTCTAACCGTAAATA
1118 TGTCATCTAG CGATCCGCCGACGTTACTACAATGGTTCGGCGGGCAGCTTCCGGGAAAC
1119 CAGAGATTTT GGACTCCGGGGGGAGTATGGGTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGA
1120 CGGAAGGGC ACGCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAAT
1121 CTCACCAGGC CC GGACACCGGAAGGATTGACAGATTAACAGCTCTTTCTTGATTCCGGTG
1122 GGTGGTGGT GCGATGGCCGTTCCCTTAGTTCGTGGAGCGATTTGTCTGGTTAATCCGGTA
1123 ACGAACGAG ACTCTAGCCTGCTAAATAGCCGTCGTCATTTAGGTGTGCAGTGGCTCCGT
1124 CACGCAACTC ACTGGCGACGTATTAATAATTCTTCTTAGAGGGACCGGCGGCTTCGAGCC
1125 GCACGAGATT GAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGATGTCCTGGGCCGCACGCGC
1126 GCTACACTGA AAGGAATCAGCATGTTCTCCCTGGCCTAGAGGCCCGGGCAACCCGCTGAA
1127 ACTCCTTCGT GCTGGGGATTGGGGTTTGCAATTATCCCCATAAACGAGGAATCCTAGAA
1128 GCGCGAGTAC GCGCTATAAGGTCTTT

BLAST® » blastn suite » RID-6UU2K67B016

BLAST Results

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#)

Job title: 18S-17

RID 6UU2K67B016 (Expires on 01-29 13:06 pm)
 Query ID lc|Query_30099
 Description 18S-17
 Molecule type nucleic acid
 Query Length 1034

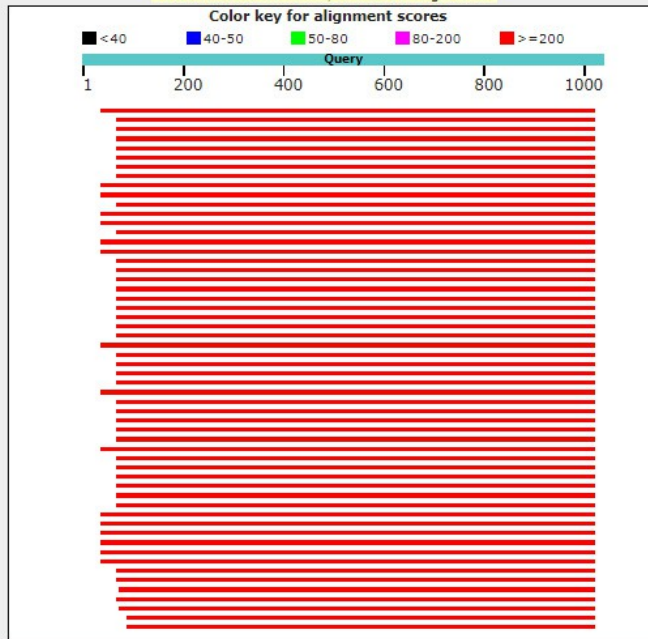
Database Name nr
 Description Nucleotide collection (nt)
 Program BLASTN 2.7.1+ [Citation](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Graphic Summary

Distribution of the top 100 Blast Hits on 100 subject sequences

Mouse over to see the title, click to show alignments



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Mytilina separata clone a1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1548	1548	94%	0.0	95%	MG854885.1
Hyles lineata 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1544	1544	91%	0.0	96%	AF423786.1
Antheraea assama 18S ribosomal RNA gene, complete sequence	1543	1543	91%	0.0	96%	KY678880.1
Tanadema neutra 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1537	1537	91%	0.0	96%	KR088950.1
Samyra bella 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1537	1537	91%	0.0	96%	KR088956.1
Mesoscia pusilla 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1537	1537	91%	0.0	96%	KR088943.1
Brachyodilla skorius 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1537	1537	91%	0.0	96%	KR088931.1
Meroptera cravella external transcribed spacer 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, intergenic spacer, and 28S ribosomal RNA gene, complete sequence	1533	1533	91%	0.0	96%	MF073208.1
Helicoverpa zea voucher Hzea_652 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, complete sequence, and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	1533	1533	94%	0.0	95%	KT343381.1
Helicoverpa zea voucher Hzea_SIMRU 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, complete sequence, and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	1533	1533	94%	0.0	95%	KT343380.1
Heliothis virescens voucher Hvir_SIMRU 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, complete sequence, and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	1533	1533	91%	0.0	96%	KT343379.1
Helicoverpa armigera voucher Harm_Au-14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, complete sequence, and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	1533	1533	94%	0.0	95%	KT343378.1
Helicoverpa armigera voucher Harm_Ch-107 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, complete sequence, and 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence	1533	1533	94%	0.0	95%	KT343377.1
Alarodia slossoniae 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1533	1533	91%	0.0	96%	KR088933.1
Plutella xylostella 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	1533	1533	94%	0.0	95%	JX390853.1

Alignments

[Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#)

Mythimna separata clone a1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [MG654665.1](#) Length: 1905 Number of Matches: 1

Range 1: 716 to 1700 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1548 bits(838)	0.0	948/996(95%)	27/996(2%)	Plus/Plus
Query 37	GGAGCA-ATGATCAGTGAGCCG-CCGT--AA--TCTGTTCAGAATCCAAAT-CTATC-C-	87		
Sbjct 716	GGAGCATATCGTCGGTGAGCCGTCGGTCAAACGTCGGTTCAATATCAAATCCTATCGCG	775		
Query 88	GTGCTCTTC-GTGAGGTGTGCAAGGTGGGCCGAACAAGTTTAGCTTTGAACAAATTAGAA	146		
Sbjct 776	GTGCTCTTCAATGA-GTGTGCG-AGGTGGGCCG-ACAATTTTA-CTTTGAACAAATTAGA-	830		
Query 147	GTGCTC-AAGCCGGCTCAAATGCTGCTTG-ATATTTCTTGCATGGAATAATAGAATATG	204		
Sbjct 831	GTGCTCAAAGCGGGCTCAAATGCTGCTTGAATATTTCTGTCATGGAATAATAGAATATG	890		
Query 205	ATCTCGGGTCTA-TTTGTTGGTTTTCAGAACTCCGAGGGTAATGATTAATAGGGATAACT	263		
Sbjct 891	ATCTCGGTTCTATTTGTTGGTTTTCAGAACTCCGA-GGTAATGATTAATAGGGATAACT	949		
Query 264	GGGGGCATTGCTATTGCGACGTTAGAGGTGGAAATCTTGGATCGTCGC-AGACGAACAT	322		
Sbjct 950	GGGGGCATTGCTATTGCGACGTTAGAGGT-GAAATCTTGGATCGTCGCAAGACGAACAT	1008		
Query 323	CAGCGAAAGCATTGCCAAAGGTGTTTTCATCAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGTTGCGAA	382		
Sbjct 1009	CAGCGAAAGCATTGCCAAAGGTGTTTTCATCAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGTTGCGAA	1068		
Query 383	GGCGATTAGATAAAGCACTAGTTCCTAACCGTAAATATGTCATCTAGCGATCCGCCGACGT	442		
Sbjct 1069	GGCGATTAGATACGCCCTAGTTCCTAACCGTAAATATGTCATCTAGCGATCCGCCGACGT	1128		
Query 443	TACTACAATGGTTCGGCGGGCAGCTTCGGGAAACCAGAGATTTTGGACTCCGGGGGGAG	502		
Sbjct 1129	TACTACAATGGTTCGGCGGGCAGCTTCGGGAAACCAGAGATTTTGGACTCCGGGGGGAG	1188		
Query 503	TATGGGTGCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACGCCAGGAGTGGAGC	562		
Sbjct 1189	TATGGTTCCAAAGCTGAAACTTAAAGGAATTGACGGAAGGGCAC-CACCAGGAGTGGAGC	1247		
Query 563	CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAATCTCACCAGGCCGGACACCGGAAGGATTG	622		
Sbjct 1248	CTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAATCTCACCAGGCCGGACACCGGAAGGATTG	1307		
Query 623	ACAGATTAACAGCTCTTTCTTGATTCCGGTGGTGGTGGCGATGGCCGTTCTTAGTTTC	682		
Sbjct 1308	ACAGATTAACAGCTCTTTCTTGATTCCGGTGGTGGTGGTGC-ATGGCCGTT-CTTAGTTG	1365		
Query 683	GTGGAGCGATTGTCTGGTTAATTCGGTAACGAACGAGACTCTAGCCTGCTAAATAGCC	742		
Sbjct 1366	GTGGAGCGATTGTCTGGTTAATTCGGTAACGAACGAGACTCTAGCCTGCTAAATAGCC	1425		
Query 743	GTCGTCATTTAGGTGTGCAAGTGGCTCCGTACGCAACTCACTGGCGACGTATTAATTC	802		
Sbjct 1426	GTCGTCATTTAGGTGTGC-GTGGCTCCGTACGCAACTCACTGGCGACGTATTAATTC	1484		
Query 803	TTCTTAGAGGGACCGCGGCTTCGAGCCGCACGAGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATG	862		
Sbjct 1485	TTCTTAGAGGGACCGCGGCTTCGAGCCGCACGAGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATG	1544		
Query 863	CCCTTAGATGTCCTGGCCGCACGCGCTACACTGAAGGAATCAGCATGTTCTCCCTGG	922		
Sbjct 1545	CCCTTAGATGTCCTGGCCGCACGCGCTACACTGAAGGAATCAGCATGTTCTCCCTGG	1604		
Query 923	CCTAGAGGCCCGGCAACCCGCTGAAACTCCTTCGTGCTGGGGATTGGGGTTTGAATTA	982		
Sbjct 1605	CCTAGAGGCCCGGCAACCCGCTGAAACTCCTTCGTGCTGGGGATTGGGGTTTGAATTA	1664		
Query 983	TCCCCATAAACGAGGAAT-CCTAG-AAGCGCGAGT	1016		
Sbjct 1665	TCCCCATAAACGAGGAATCCTAGTAAGCGCGAGT	1700		

1131 **APÊNDICE 2**

1132 Sequência consenso do fragmento de COI.

1133 >AG0535COI – LONDRINA/PR

1134 TTATTTTATTTTCTTCATTAAGTTTATTAATTCGGGCCGAATTGGGAAATCCTGGATCTTTG
1135 ATTGGTGATGATCAAATTTATAATACTATCGTAACAGCTCATGCTTTTATTATAATTTTTTTT
1136 ATGGTTATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGATTAGTACCTTTAATATTAGGAGC
1137 TCCTGATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGACTACTTCCCCCCTCATTAA
1138 CTCTTTTAATCTCAAGAAGAATTGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGATGAACAGTCTATC
1139 CTCCCTTATCGTCTAATATTGCTCATGGAGGAAGATCTGTAGATTTAGCTATTTTTTCACTA
1140 CATTAGCTGGTATTTTCATCTATTTTAGGAGCTATTAATTTTATTACAACAATTATTAACATA
1141 CGATTAAATAATCTATCATTGATCAAATACCTTTATTTGTTTGAGCTGTTGGAATTACAGC
1142 ATTTTTATTATTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATACTTTAACAGATCG
1143 AAATTTAAATACATCTTTTTTTTGACCCAGCTGGAGGAGGAGA

BLAST ® » blastn suite » RID-6VPYXEDT01N

BLAST Results

[Edit and Resubmit](#) [Save Search Strategies](#) [Formatting options](#) [Download](#)

Job title: Nucleotide Sequence (601 letters)

RID [6VPYXEDT01N](#) (Expires on 01-29 21:19 pm)

Query ID [lcl|Query_223541](#)

Description None

Molecule type nucleic acid

Query Length 601

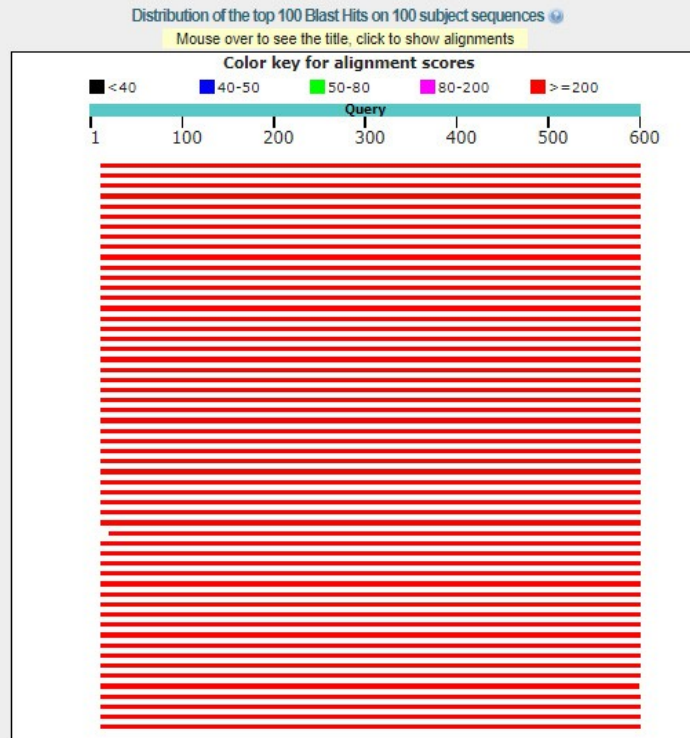
Database Name nr

Description Nucleotide collection (nt)

Program BLASTN 2.7.1+ [Citation](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#) [Distance tree of results](#) [MSA viewer](#)

Graphic Summary



Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

[Alignments](#) [Download](#) [ConsRank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Anticarsia gemmatalis cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	1088	1088	98%	0.0	100%	JG574089.1
<input type="checkbox"/>	Anticarsia gemmatalis voucher R2287 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	1088	1088	98%	0.0	100%	JN401299.1
<input type="checkbox"/>	Anticarsia gemmatalis voucher MM20154 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	1088	1088	98%	0.0	100%	JF584767.1
<input type="checkbox"/>	Anticarsia gemmatalis cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	1088	1088	98%	0.0	100%	GU330291.1
<input type="checkbox"/>	Anticarsia gemmatalis cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	1085	1085	98%	0.0	99%	JQ551888.1
<input type="checkbox"/>	Anticarsia gemmatalis voucher 1858-COI-07 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	1083	1083	98%	0.0	99%	KJ378605.1
<input type="checkbox"/>	Anticarsia gemmatalis cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	1083	1083	98%	0.0	99%	JQ004745.1
<input type="checkbox"/>	Anticarsia gemmatalis cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	1083	1083	98%	0.0	99%	JQ873880.1
<input type="checkbox"/>	Anticarsia gemmatalis cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	1083	1083	98%	0.0	99%	JQ558123.1
<input type="checkbox"/>	Anticarsia gemmatalis cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	1083	1083	98%	0.0	99%	JQ555203.1
<input type="checkbox"/>	Lepidoptera sp. BCLD:AAA6923 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	1083	1083	98%	0.0	99%	JF345823.1
<input type="checkbox"/>	Lepidoptera sp. BCLD:AAA6923 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	1083	1083	98%	0.0	99%	JF345741.1
<input type="checkbox"/>	Anticarsia gemmatalis cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	1077	1077	98%	0.0	99%	KX281227.1
<input type="checkbox"/>	Anticarsia gemmatalis voucher 1858-COI-07 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	1077	1077	98%	0.0	99%	KJ377658.1

Alignments

Download ▾ [GenBank](#) [Graphics](#)

Anticarsia gemmatalis cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial
Sequence ID: [JQ574069.1](#) Length: 656 Number of Matches: 1

Range 1: 43 to 631 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1088 bits(589)	0.0	589/589(100%)	0/589(0%)	Plus/Plus
Query 13	CTTCATTAAGTTTATTAATTCGGGCCGAATTGGGAAATCCTGGATCTTTGATTGGTGATG			72
Sbjct 43	CTTCATTAAGTTTATTAATTCGGGCCGAATTGGGAAATCCTGGATCTTTGATTGGTGATG			102
Query 73	ATCAAATTTATAATACTATCGTAACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTATGGTTA			132
Sbjct 103	ATCAAATTTATAATACTATCGTAACAGCTCATGCTTTTATTATAAATTTTTTATGGTTA			162
Query 133	TACCTATTATAAATTGGAGGATTTGGTAATTGATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCTG			192
Sbjct 163	TACCTATTATAAATTGGAGGATTTGGTAATTGATTAGTACCTTTAATATTAGGAGCTCCTG			222
Query 193	ATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGACTACTTCCCCCTCATTAACTC			252
Sbjct 223	ATATAGCTTTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTGACTACTTCCCCCTCATTAACTC			282
Query 253	TTTTAATCTCAAGAAGAATTGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGATGAACAGTCTATCCTC			312
Sbjct 283	TTTTAATCTCAAGAAGAATTGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGATGAACAGTCTATCCTC			342
Query 313	CCTTATCGTCTAATATTGCTCATGGAGGAAGATCTGTAGATTAGCTATTTTTCTACTAC			372
Sbjct 343	CCTTATCGTCTAATATTGCTCATGGAGGAAGATCTGTAGATTAGCTATTTTTCTACTAC			402
Query 373	ATTTAGCTGGTATTTTCATCTATTTTAGGAGCTATTAATTTTATTACAACAATTATTAACA			432
Sbjct 403	ATTTAGCTGGTATTTTCATCTATTTTAGGAGCTATTAATTTTATTACAACAATTATTAACA			462
Query 433	TACGATTAATAATCTATCATTTGATCAAATACCTTTATTTGTTTGAGCTGTTGGAATTA			492
Sbjct 463	TACGATTAATAATCTATCATTTGATCAAATACCTTTATTTGTTTGAGCTGTTGGAATTA			522
Query 493	CAGCATTTTTATTATTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATACTTTTAA			552
Sbjct 523	CAGCATTTTTATTATTATTATCTTTACCAGTTTTAGCAGGAGCTATTACTATACTTTTAA			582
Query 553	CAGATCGAAATTTAAATACATCTTTTTTTGACCCAGCTGGAGGAGGAGA			601
Sbjct 583	CAGATCGAAATTTAAATACATCTTTTTTTGACCCAGCTGGAGGAGGAGA			631

1147 APÊNDICE 3



1148 Gel de eletroforese 1% verificando a amplificação de DNAr 18S.