

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Marcos da Silveira Regueira Neto

**Análise estrutural, aplicação filogenética e *barcode* do ITS 2 na
broca pequena da cana-de-açúcar *Diatraea* spp (Lepidoptera)**

Recife

2014

Marcos da Silveira Regueira Neto

Análise estrutural, aplicação filogenética e *barcode* do ITS 2 na broca pequena da cana-de-açúcar *Diatraea* spp (Lepidoptera)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Valdir Queiroz Balbino

Coorientadora: Vilma Loreto da Silva

Recife

2014

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Regueira Neto, Marcos da Silveira

Análise estrutural, aplicação filogenética e *barcode* do ITS 2 na broca pequena da cana-de-açúcar *Diatraea* spp (Lepidoptera) / Marcos da Silveira Regueira Neto. – Recife: O Autor, 2014.

49 folhas: il.

Orientadores: Valdir Queiroz Balbino, Vilma Loreto da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Genética, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1. I. Mariposa 2. Filogenia I. Balbino, Valdir Queiroz (orient.) II. Silva, Vilma Loreto da (coorient.) III. Título.

595.78

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-131

**Análise estrutural, aplicação filogenética e *barcode* do ITS 2 na
broca pequena da cana-de-açúcar *Diatraea* spp (Lepidoptera)**

Aprovado em 24 / 02 / 2014

Banca Examinadora:

**Dra. Andrea Pedrosa Harand
Universidade Federal de Pernambuco**

**Dr. Hebert Álvaro Abreu de Siqueira
Universidade Federal Rural de Pernambuco**

**Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior
Universidade Federal de Pernambuco**

**Recife
2014**

*Aos meus pais, Roseane e Marcos Regueira Jr, as
minhas avós, Elâine e Dilma, e ao meu avô Marcos
Regueira, com amor dedico.*

Agradecimentos

À minha **família**, pelo amor, carinho, confiança, apoio, dedicação e por sempre torcerem muito por mim. Em especial aos meus pais, **Roseane** e **Marcos Regueira Jr.** Às minhas avós **Elaine** e **Dilma** e ao meu avô **Marcos Regueira** que sempre esteve presente em todos os momentos da minha vida. Aos meus irmãos **Márcio**, **Matheus** e **Bartozinho**.

À **Profa Dra Vilma Loreto**, que desde a iniciação científica sempre esteve presente me orientando, se dedicando ao máximo para atingirmos todos os objetivos e incentivando a sempre buscar mais.

Ao **Prof. Dr. Valdir Queiroz Balbino**, pela oportunidade de aprender coisas novas e pelo acesso ao LABBE.

À FACEPE pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

A João Dutra e à Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA) pelo fornecimento dos espécimes de *Diatraea saccharalis*.

Ao Prof. Dr. Edmilson Jacinto Marques e ao Prof. Dr. Hebert Siqueira e ao Laboratório de Patologia de Insetos pelo fornecimento dos espécimes de *Diatraea flavipennella*.

À **Cirlene Maria da Silva**, pelo apoio técnico, disponibilidade, e acima de tudo pela amizade e carinho.

À **Profa. Dra Neide Santos** pela amizade, pelo carinho e pelos conselhos.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Citogenética Animal (UFPE): **Luaninha**, **Merilane** (Maninha), **Izaquiel**, **Luiz**, **Carolina Machado**, **Allison**,

Andrezza (Miss FISH), **Helen**, **Kalyne**, **Suelen**, **Adriana** (Dida), **Amanda**, **Tyago** (Zóide), **Lucas**, **Rafaela**, **Juliana Vieira**, **Izabela**, minha sincera gratidão pela amizade, pela cumplicidade, pelos momentos divertidos no laboratório e pela ajuda nos trabalhos.

A **Rafael** por ajudar de todas as etapas experimentais do estudo e pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (UFPE): **Polly**, **Mitalle**, **Bruna Piereck**, **Flávia**, **Hévila**, **Santelmo**, **Vanessa** (Vainiesan), obrigado pelo companheirismo, amizade e pelas divertidas conversas nas horas de descanso entre um experimento e outro.

Aos amigos do Laboratório de Bioinformática e Biologia Evolutiva (UFPE): **Moisés**, **Lidiane**, **Carlos** e **Elaine**, pela companheirismo e ajuda nos experimentos.

A **Veronaldo Campos** pelo companheirismo, amizade e incentivo a sempre fazer mais e melhor.

Aos funcionários do Departamento de Genética, pela amizade, atenção, disponibilizade e respeito.

Aos meus eternos amigos: **Renan Yamashita**, **Kátia Regina**, **Kalyne**, **Tia Wanda**, **Carlos Henrique**, **Wanessa**, **Marcela Lopes**, **André**, **Rafaela Holanda**, **Thamires**, **Ana Paula**, **Marcos Ubiratam**, **Tarcyla**, **Jéssyca Marques** e **Jéssica** por todo apoio, companheirismo, carinho, farras, risadas... Um muito obrigado, adoro vocês.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

*“E um dia os homens descobrirão que esses discos
voadores estavam apenas estudando a vida dos
insetos...”*

Mário Quintana

Resumo

No Brasil as espécies *D. flavipennella* e *D. saccharalis* tem uma grande importância para o setor sucroalcooleiro por causar danos em cana-de-açúcar. Os estágios de ovo, larva, pupa e adulto são muito parecidos entre essas espécies e a identificação pode ser confusa. O Espaçador Interno Transcrito 2 (ITS2) do locus DNA ribossomal, que tem um papel importante no processamento do DNAr, vem sendo aplicado em estudos filogenéticos e populacionais por ter como característica divergência evolutiva. Este trabalho tem como objetivo compreender o grau de divergência evolutiva entre as espécies *D. flavipennella* e *D. saccharalis* com base no marcador ITS 2, analisar sua estrutura e características funcionais. O DNA foi extraído de amostras de ovo, lagarta e adulto. Foi realizada PCR e os amplicons foram purificados e sequenciados. As sequências foram analisadas com o programa MEGA 5.01. O tamanho do ITS 2 foi de 410 pb em *D. flavipennella* e 448 pb em *D. saccharalis*. O conteúdo de GC foi similar entre as duas espécies. As sequências apresentaram regiões conservadas intercaladas por regiões variáveis. Algumas regiões conservadas apresentavam motivos presentes também em espécies de diferentes grupos, provavelmente associados às estruturas participantes no processamento do RNA pós-transcricional. Três repetições microssatélites estavam presentes em *D. saccharalis* e ausentes em *D. flavipennella*, contribuindo para a diferença de tamanho entre as duas espécies. Apesar da divergência existente entre as sequências das espécies, existem regiões que são conservadas em níveis taxonômicos mais altos.

Palavras-chave: *Diatraea*; ITS 2; microssatélite

Abstract

In Brazil, the species *D. flavipennella* and *D. saccharalis* play an important role in the sugar and alcohol agribusiness by causing many damages in sugarcane fields. The egg, larvae, pupae and adult stages are very morphologically similar between these species and the identification can be confuse. The Internal Transcribed Spacer 2 (ITS 2) from ribosomal DNA has important features as evolutionary divergence. It is a good marker for species identification, participates in the rDNA processing and it has been applied in phylogenetic and populational studies. This study aims to understand the evolutionary divergence degree between the species *D. flavipennella* and *D. saccharalis* with the molecular marker ITS 2 and analyse its structural and functional features. The DNA was extracted from egg, larvae and adult samples. PCR amplicons were purified and sequenced. The sequences were analysed in MEGA 5.01. The ITS 2 length was 410 bp in *D. flavipennella* and 448 bp in *D. saccharalis*. The GC content was similar between the species. Conservative and variable regions were intercalated along the sequence. Some conserved regions showed motifs presented in species from other taxa, probably associated to structures that participates in pos-transcriptional processing of RNA. Three microsatellite loci were presented in *D. saccharalis* and absent in *D. flavipennella*, contributing for differences in ITS 2 length in the species.

Key words: *Diatraea*; ITS 2; microsatellite

Lista de Ilustrações

Figura 1 – Reconstrução filogenética mostrando a relação das 17 subfamílias existentes dentro da família Crambidae (Solis e Maes, 2002).	4
Figura 2 – Número de espécimes coletados de <i>D. flavipennella</i> e <i>D. saccharalis</i> em oito municípios no estado de Alagoas (Freitas et al., 2006).	6
Figura 3 – Massa de ovos de <i>Diatraea flavipennella</i> (a) e de <i>Diatraea saccharalis</i> em estágio final próximo à eclosão das larvas (b). Barra= 100 µm. Fotos do autor.	7
Figura 4 – Lagartas de <i>D. flavipennella</i> (a) e <i>D. saccharalis</i> (b) nos últimos instares. Foto do autor.	8
Figura 5 – Pupas de <i>D. flavipennella</i> (a) e <i>D. saccharalis</i> (b). Foto do autor (a) e LSU AgCenter (b).	9
Figura 6 – Formas adultas de <i>D. flavipennella</i> (a) e <i>D. saccharalis</i> (b). Foto do autor (a); Embrapa milho e sorgo (b).	10
Figura 7 – Organização estrutural das sequências ribossomais e dos espaçadores ITS 1 e ITS 2 (Martins et al., 2010).	15
Figura 8 – Gel de agarose a 3% mostrando a diferença de tamanho entre os amplicons de ITS 2 de <i>Diatraea flavipennella</i> e <i>D. saccharalis</i> nos três estágios de desenvolvimento	21
Figura 9 – Alinhamento mostrando o domínio 4 conservado em <i>Diatraea flavipennella</i> e <i>D. saccharalis</i> .	23
Figura 10 – Máxima verossimilhança baseada em ITS 2 de espécies da família Crambidae.	26

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Espécies de Lepidoptera que foram incluídas na análise dos domínios conservados.	19
Tabela 2 - Sequências microssatélites encontradas em <i>Diatraea saccharalis</i> e <i>D. flavipennella</i>	27

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Item	Definição
ATP6	ATP F0 Sintase Subunidade 6
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Ferramenta de Busca de Alinhamento Locais de Bases)
COI	Citocromo Oxidase I
COII	Citocromo Oxidase II
COIII	Citocromo Oxidase III
CYTB	Citocromo B
DNAr	DNA ribossomal
Indel	Inserção/Deleção
ITS 1	Internal Transcribed Spacer 1 (Espaçador Interno Transcrito 1)
ITS 2	Internal Transcribed Spacer 2 (Espaçador Interno Transcrito 2)
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Análise Genética de Evolução Molecular)
MV	Máxima Verossimilhança
ND1	Subunidade 1 da NADH Desidrogenase
ND3	Subunidade 3 da NADH Desidrogenase
ND5	Subunidade 5 da NADH Desidrogenase
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia de Polimerase)
RNAr	RNA ribossomal
RNAr 16S	RNA ribossomal 16S
SSR	Simple Sequence Repeats (Repetições de Sequências Simples)

Sumário

Resumo	vii
Abstract	viii
Lista de ilustrações	ix
Lista de tabelas	x
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	xi
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	3
2.1 Considerações gerais sobre a ordem Lepidoptera	3
2.2 Distribuição geográfica de <i>D. flavipennella</i> e <i>D. saccharalis</i>	5
2.3 Morfologia e estágios do desenvolvimento	6
2.4 Comportamento praga de <i>D. flavipennella</i> e <i>D. saccharalis</i>	10
2.5 Aspectos genéticos	12
2.5.1 Gênero <i>Diatraea</i>	12
2.5.2 Espaçadores internos transcritos (ITS)	14
3. Objetivos	16
3.1 Objetivo Geral	16
3.2 Objetivos Específicos	16
4. Material e Métodos	17

4.1 Obtenção do material e extração de DNA	17
4.2 Reação em Cadeia de Polimerase	17
4.3 Purificação dos amplicons, sequenciamento e análises	18
5. Resultados	21
5.1 Variação da sequência de ITS 2	21
5.2 Análise das sequências de ITS 2	21
5.3 Domínios conservados nas sequências de ITS 2 de <i>Diatraea</i>	22
5.4 Sequências conservadas em <i>Diatraea</i> e outras espécies de Lepidoptera	23
5.5 Filogenia do ITS 2 em Crambidae	25
5.6 Sequências Microssatélites	26
6. Discussão	28
7. Conclusões	35
8. Referências Bibliográficas	36
9. Anexos	41
10. Currículo Lattes atualizado	43

1. Introdução

No Brasil duas espécies do gênero *Diatraea*, a broca da cabeça amarela *D. flavipennella* e a broca comum *D. saccharalis*, têm uma grande importância para o setor sucroalcooleiro por causar danos consideráveis em cana-de-açúcar. *Diatraea flavipennella* ocorre apenas nos canaviais brasileiros enquanto que *D. saccharalis* ocorre em todo o Continente Americano. No Brasil, a espécie predominante é *D. saccharalis*, porém no estado de Alagoas e Pernambuco *D. flavipennella* é a mais amplamente distribuída. Essa inversão foi observada recentemente e pode ter inúmeros fatores relacionados tais como: métodos adotados de controle biológico (tal como o parasita *Cotesia flavipes*); introdução de variedades resistentes de cana-de-açúcar ou coleta manual que não foram eficientes para reduzir o nível de infestação de *D. flavipennella*.

Relatos de profissionais que trabalham no controle dessas pragas nas plantações de cana-de-açúcar sugerem que o controle com *Cotesia flavipes* é mais eficiente em *D. saccharalis* do que em *D. flavipennella*. Identificar de forma precisa e rápida qual dessas duas espécies estão infestando a plantação é crucial, principalmente quando em todos os estágios do desenvolvimento as duas espécies são parecidas e a identificação pode ser confusa, para a escolha da melhor estratégia de combate à praga. Aliado a isto também é importante avaliar o grau de divergência genética entre essas duas espécies e entre outros representantes da família Crambidae que também são importantes pragas agrícolas.

O espaçador interno transcrito 2 (ITS 2) é uma região nucleotídica não-codificante localizada dentro do DNA ribossomal nuclear entre as sequências do RNAr 5,8S e RNAr 28S. ITS 2 desempenha um papel importante na maturação do RNA pré-ribossomal com sua estrutura secundária contendo os sítios de clivagem

para o processamento do pré-RNAr. Estudos anteriores mostraram que ITS 2 é um bom marcador molecular para inferências filogenéticas entre espécies, gêneros e subfamílias. Este segmento genômico vem sendo usada para análise em várias famílias de Lepidoptera e poderá servir na identificação das duas espécies.

2. Revisão da Literatura

2.1 Considerações gerais sobre a ordem Lepidoptera

Atualmente a ordem Lepidoptera está constituída por mais de 160.000 espécies de borboletas e mariposas. De modo geral a ordem Lepidoptera é dividida em três agrupamentos: 1) as micromariposas, que compreendem as mais primitivas, aquelas em que as larvas geralmente se alimentam internamente ou escondidas na planta hospedeira; 2) as macromariposas, geralmente membros voadores noturnos de Macrolepidoptera; e 3) as borboletas, nas quais os adultos são diurnos e muito coloridos. Um total de nove superfamílias são atribuídas à ordem, são elas: Alucitoidea, Bombycoidea, Geometroidea, Noctuoidea, Papilionoidea, Pyraloidea, Sphingoidea, Tineoidea e Tortricoidea (Kristensen *et al.*, 2007).

Pyraloidea é descrita como a segunda maior superfamília da ordem Lepidoptera com mais de 16.000 espécies descritas (Solis, 2006). Dentro de Pyraloidea são encontradas duas famílias: Crambidae e Pyralidae e as relações taxonômicas dessas duas são muito discutidas entre os taxonomistas. Uma vertente mais conservadora prefere manter a superfamília somente com uma família, Pyralidae. Entretanto outra vertente de taxonomistas prefere a separação da superfamília em duas famílias: Minet em 1982 propôs a divisão de Pyraloidea em duas famílias: Crambidae e Pyralidae, considerando que a característica utilizada para esta divisão é a diferença na estrutura auditiva chamada *praecinctorium*, presente na família Crambidae e ausente na Pyralidae (Schaffer *et al.*, 1996; Kristensen, 1998; Holloway *et al.*, 2001).

A família Crambidae é composta por 906 gêneros agrupados em 17 subfamílias (Figura 1). Algumas importantes pragas agrícolas como as espécies

dos gêneros *Chilo*, *Crambus* e *Diatraea* estão agrupadas na subfamília Crambinae e outras, como as espécies dos gêneros *Maruca* e *Ostrinia*, pertencem às subfamílias Spilomelinae e Pyraustinae, respectivamente. *Diatraea* e *Chilo* são extremamente próximos e formam um grupo monofilético compacto. As espécies desses gêneros diferem por aspectos morfológicos destacando-se nos membros de *Diatraea* a ausência de ocelos, enquanto que algumas espécies de *Chilo* apresentam ocelos vestigiais ou ausentes (Bleszynski, 1969). O gênero *Diatraea* está constituído por 86 espécies, 21 dessas são encontradas em canaviais do continente americano e duas são amplamente distribuídas no Brasil: *D. saccharalis* e *D. flavipennella* (Mendonça, 1996; Animal Diversity Web).

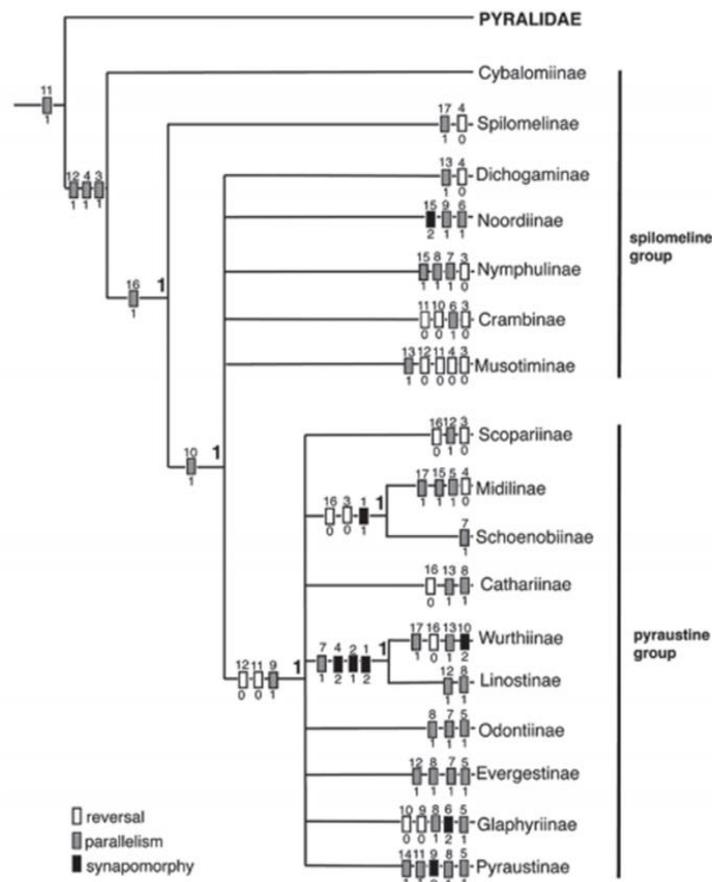


Figura 1 – Reconstrução filogenética mostrando a relação das 17 subfamílias existentes dentro da família Crambidae (Solis e Maes, 2002).

2.2 Distribuição geográfica de *D. flavipennella* e *D. saccharalis*

Dezenas de espécies de mariposas do gênero *Diatraea* já foram registradas em canaviais do continente americano, porém nem todas acarretam danos significativos às culturas (Mendonça, 1996; Pinto, 2006). Duas espécies são importantes como insetos praga, são elas: *D. saccharalis* (Fabricius, 1794) e *D. flavipennella* (Box, 1931).

Nativa do hemisfério ocidental, *D. saccharalis* ocorre em canaviais das Américas do Norte, Central e Sul (Cueva *et al.*, 1980; Capinera, 2001; Lange *et al.*, 2004; Cortés *et al.*, 2010). No Brasil, *D. saccharalis* ocorre em todas as regiões, enquanto que *D. flavipennella* só ocorre no Brasil e se restringe aos canaviais dos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e da região Nordeste (Mendonça, 1996; Freitas *et al.*, 2006). Entre as duas espécies, *D. saccharalis* apresenta um sucesso reprodutivo e potencial praga maior ao longo de toda a sua distribuição com exceção do estado de Alagoas e Pernambuco, segundo senso mais recente, em que há uma predominância mais atual de *D. flavipennella* (Figura 2) (Freitas *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2013).

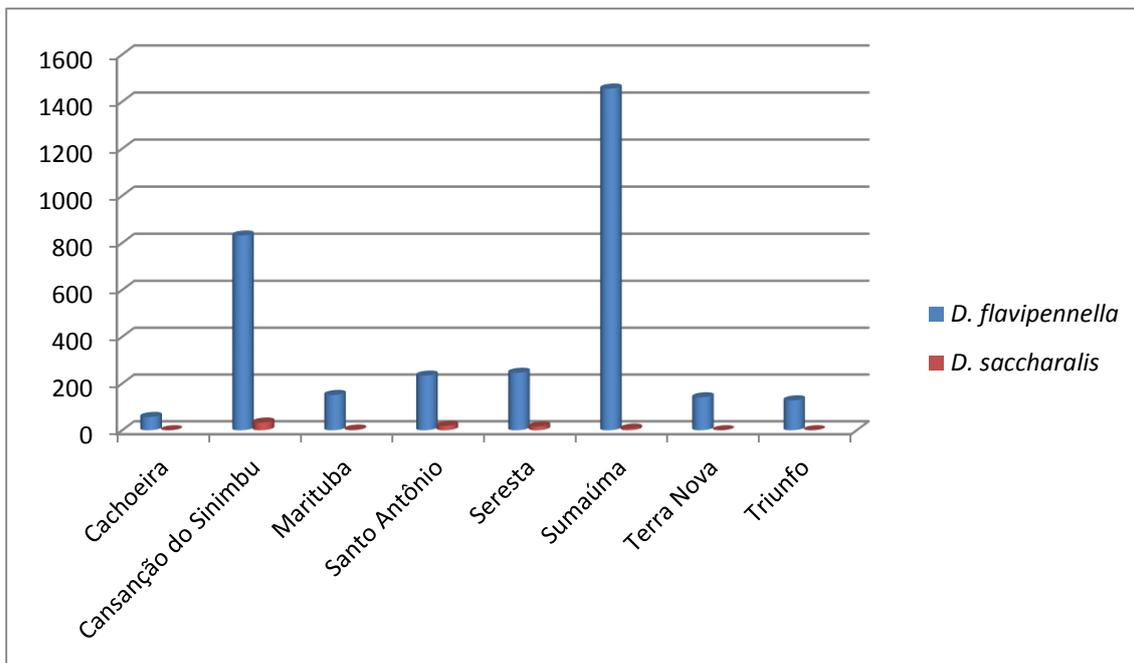


Figura 2 – Número de espécimes coletados de *Diatraea flavipennella* e *Diatraea saccharalis* em oito municípios no estado de Alagoas (Freitas et al., 2006).

2.3 Morfologia e estágios do desenvolvimento

Os ovos de *D. flavipennella* e *D. saccharalis* tem forma elíptica com coloração inicial esbranquiçada. *Diatraea flavipennella* apresenta ovos com aproximadamente 1 mm de comprimento e aproximadamente 0,8 mm de largura; os ovos em *D. saccharalis* medem em média 1,16 mm de comprimento e 0,75 mm de largura (Capinera, 2001). Com o passar do tempo os ovos vão adquirindo uma coloração amarela ou laranja e próximo à eclosão das larvas os ovos apresentam uma coloração escura (Figura 3). Uma fêmea de *Diatraea* pode por de dois a 58 ovos em uma massa na superfície das folhas. O período de incubação para *D. saccharalis* é de quatro a seis dias, enquanto que em *D. flavipennella* em condições de laboratório é de em média oito dias (Capinera, 2001; Freitas et al., 2007).

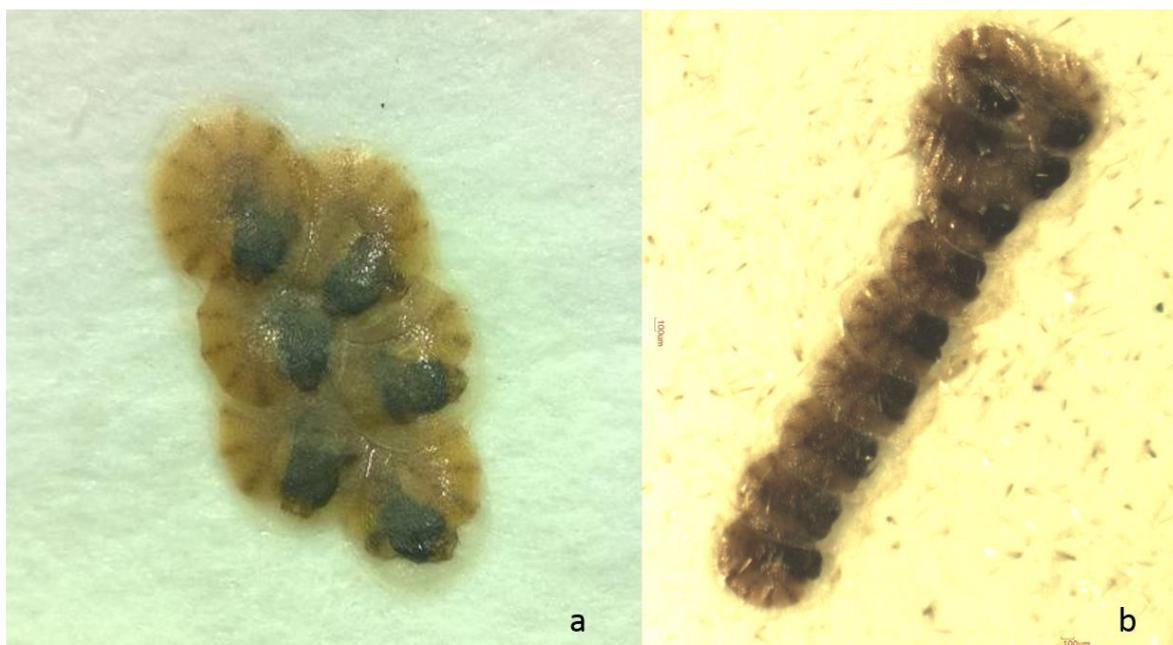


Figura 3 – Massa de ovos de *Diatraea flavipennella* (a) e de *Diatraea saccharalis* em estágio final próximo à eclosão das larvas (b). Barra= 100 µm. Fotos do autor.

As larvas de *D. flavipennella* e *D. saccharalis* apresentam cor amarelada ou esbranquiçada com pontos marrons ao longo da superfície dorsal (Figura 4). A cápsula cefálica apresenta cor amarronzada nas duas espécies, podendo apenas em *D. flavipennella* apresentar coloração amarelada. A cápsula cefálica atinge 1,75 mm no último instar de *D. saccharalis* e 1,5 mm no último instar de *D. flavipennella* (Capinera, 2001; Freitas *et al.*, 2007). Para *D. saccharalis* foram relatadas duas formas larvais diferentes: uma de verão com pontos marrons e uma de inverno sem pontos (Capinera, 2001). Em *D. saccharalis* a duração do estágio larval é de em média 30 dias, com seis instares em condições de laboratório, podendo variar em condições naturais. *Diatraea flavipennella* apresentou em condições de laboratório um estágio larval que durou em média 35 dias contabilizando sete instares (Freitas *et al.*, 2007).

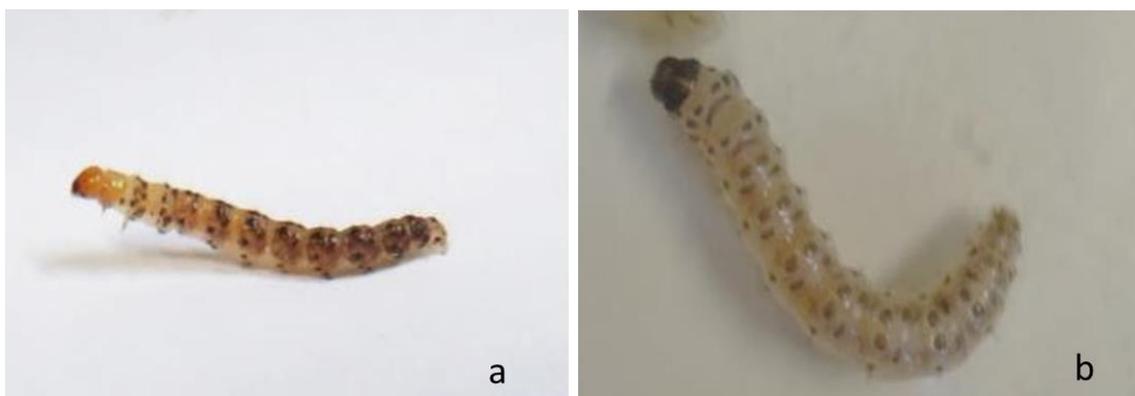


Figura 4 – Lagartas de *D. flavipennella* (a) e *D. saccharalis* (b) nos últimos instares.

Foto do autor.

A pupa de ambas as espécies tem uma coloração amarronzada e aspecto alongado e delicado (Figura 5). O tamanho médio para a pupa em machos de *D. flavipennella* é de 14.77 mm, enquanto que nas fêmeas é de 17.9 mm (Freitas *et al.*, 2007); em *D. saccharalis* o tamanho varia de 16 a 20 mm entre machos e fêmeas (Capinera, 2001). O tempo observado para o estágio de pupa em *D. saccharalis* foi de oito a nove dias e para *D. flavipennella* foi em média de 12 dias (Capinera, 2001; Freitas *et al.*, 2007). O macho e a fêmea de *D. flavipennella* podem ser distinguidos um do outro pela presença de um poro que está presente na genitália do macho e que está ausente nas fêmeas (Freitas *et al.*, 2007).

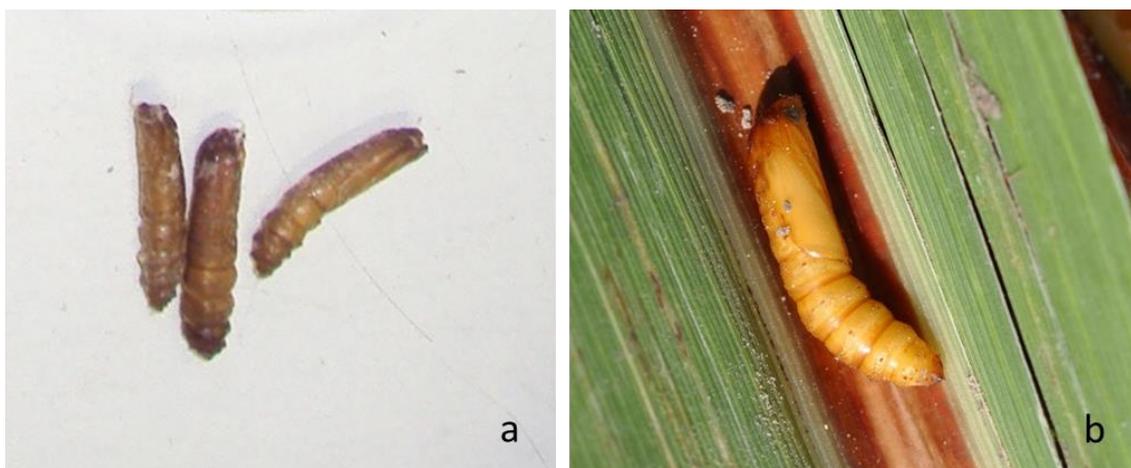


Figura 5 – Pupas de *D. flavipennella* (a) e *D. saccharalis* (b). Foto do autor (a) e LSU AgCenter (URL: <http://www.lsuagcenter.com>) (b).

O indivíduo adulto em ambas as espécies de *Diatraea* apresenta coloração cor de palha. *Diatraea saccharalis* apresenta um tamanho que vai de 18 a 28 mm para os machos e 27 a 39 mm para as fêmeas e para *D. flavipennella* um valor médio de 20 mm para os machos e 28 mm para as fêmeas foram observados. O estágio adulto dura de 3 a 8 dias em *D. saccharalis* e em média 9 dias em *D. flavipennella* (Hall *et al.*, 1991; Freitas *et al.*, 2007; Capinera, 2001). Como característica que distingue a forma adulta das espécies, *D. flavipennella* apresenta em suas asas frontais um ponto preto (Figura 6a) (Freitas *et al.*, 2007). Em contrapartida, *D. saccharalis* apresenta pontos nas extremidades das asas formando um desenho em forma de “V” (Figura 6b) (Hall *et al.*, 1991).

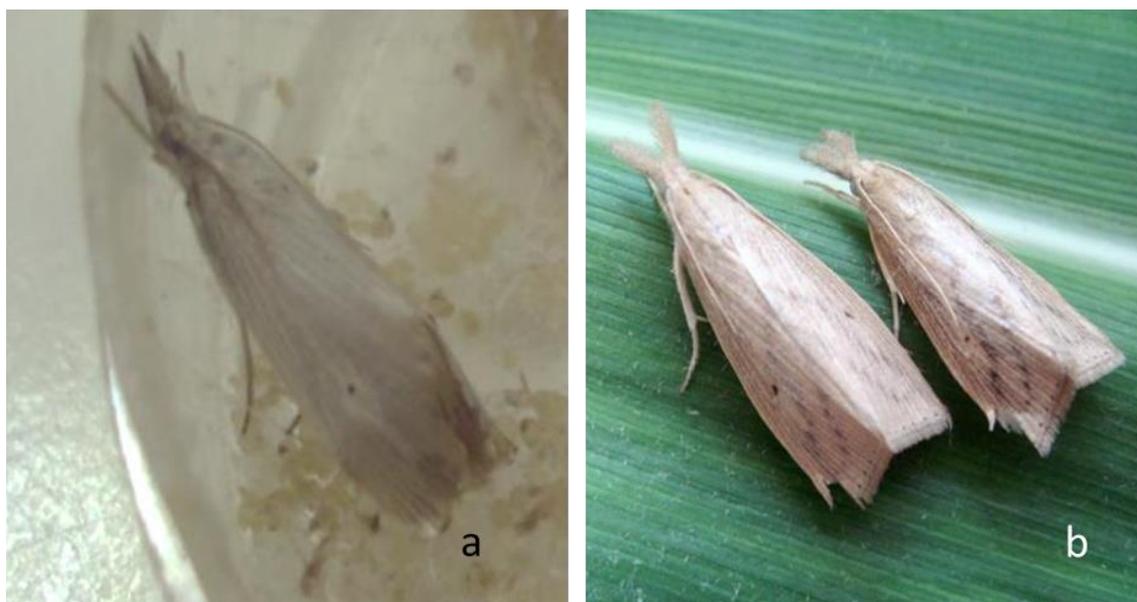


Figura 6 – Formas adultas de *D. flavipennella* (a) e *D. saccharalis* (b). Foto do autor (a); Embrapa milho e sorgo (URL: <http://panorama.cnpms.embrapa.br/>) (b).

2.4 Comportamento praga de *D. flavipennella* e *D. saccharalis*

No Brasil, as espécies *D. saccharalis* (Fabricius, 1794) e *D. flavipennella* (Box, 1931), mais conhecidas como broca-da-cana, são pragas que infestam principalmente lavouras de cana-de-açúcar (Complexo *Saccharum*). Ataques causados por esses insetos limitam a produção sucroalcooleira. Os danos causados pela *Diatraea* são muito variáveis dependendo de vários fatores como, por exemplo, idade do canavial, local da infestação, nível de infestação e variedade da cana-de-açúcar (Freitas *et al.*, 2006; Demetrio *et al.*, 2008). A intensidade de infestação é a porcentagem de entrenós brocados em relação ao total examinado e a infestação é a porcentagem de canas brocadas em relação ao total de canas examinadas (Batista e Francisco, 2010). Segundo Gallo *et al.* (2002), cada 1% de intensidade de infestação representa perdas equivalentes a 0,77% da produção de

cana, 0,25% de açúcar e 0,20% de etanol. A lagarta da *D. saccharalis* também é responsável por causar danos em outras culturas que não a cana-de-açúcar, como o milho, arroz e o sorgo (Hall *et al.*, 1991; Bortoli *et al.*, 2005; Araújo *et al.*, 2010).

A infestação se dá quando as lagartas eclodem do ovo e começam a se alimentar inicialmente do parênquima foliar, convergindo posteriormente para a bainha e após a primeira ecdise penetram no colmo pela sua parte mais tenra, construindo túneis nos entrenós da cana-de-açúcar (Gallo *et al.*, 1988; Hall *et al.*, 1991). A cana-de-açúcar em qualquer estágio do desenvolvimento está sujeita ao ataque da broca pequena o que torna difícil o controle deste tipo de praga, embora os danos causados pelas lagartas sejam mais evidentes a partir do terceiro mês de plantio quando ocorre a formação dos primeiros internódios (Lange *et al.*, 2004). As injúrias diretas causadas pela lagarta na cana-de-açúcar são caracterizados pela morte da gema apical (conhecido como “coração morto”) em plantas jovens de dois a quatro meses; perda de peso da cana; falha na germinação; enraizamento aéreo; tombamento e brotações laterais em plantas adultas (Mendonça *et al.*, 1996). As injúrias indiretas são caracterizados pela infecção pelos fungos *Colletotrichum falcatum* (Went) e *Fusarium moniliforme* (Sheldon) através dos orifícios abertos pelas lagartas, acarretando na doença conhecida como podridão vermelha do colmo (Gallo *et al.*, 2002).

Nas plantações de cana-de-açúcar são aplicados dois métodos de controle: o controle químico e o controle biológico. O controle químico empregado para as lagartas de *Diatraea* faz uso de alguns inseticidas como o triflumuron®, lambdacyhalothrin® e fipronil®. Dentre os inseticidas citados o lambdacyhalothrin é o que apresenta maior toxicidade (Mena, 2010). O controle biológico se dá pela utilização de um parasitoide larval *Cotesia flavipes* (Cam), que tem sido empregado

desde 1974 no Brasil e pela utilização de fungos como *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) e *Beauveria bassiana* (Bals.), os quais ocorrem infectando naturalmente cerca de 10% das larvas nas condições do Nordeste do Brasil e são amplamente usados em estudos para o controle de pragas (Mendonça *et al.*, 1996; Alves, 1998; Alves *et al.* 2008).

2.5 Aspectos genéticos

2.5.1 Gênero *Diatraea*

A maioria dos estudos genéticos realizados no gênero *Diatraea* concentram-se na espécie *D. saccharalis* por ser a representante do gênero mais difundida entre as plantações de cana-de-açúcar, sorgo, arroz e milho (Bravo *et al.*, 2008). Entretanto, outras espécies deste gênero (*e.g.* *D. flavipennella*, *D. grandiosella*, *D. crambidoides*, *D. busckella*, *D. centrella* e *D. rosa*) estão sendo introduzidas nestes estudos por também terem participação em infestações de cultivares importantes (Lange *et al.*, 2004).

Uma parte dos estudos realizados com *D. saccharalis* visa ajudar no monitoramento e manejo dessa praga dentro das plantações onde ela age. No momento do corte da cana-de-açúcar, que acontece durante o dia, é quando são encontradas as lagartas. Contudo é difícil identificar o sexo em estágios larvais iniciais, mesmo através da cariotipagem. Para resolver este problema, um marcador molecular ligado ao sexo foi testado em *Diatraea saccharalis* e foi observado um fragmento de 700 pb apenas presente na amostra de fêmeas (Heideman *et al.*, 2010).

Microssatélites, também chamados de *simple-sequence repeats* (SSR), são marcadores genéticos altamente polimórficos e abundantes. Com o intuito de auxiliar no manejo e em estudos evolutivos da espécie *D. saccharalis* foi desenvolvido um conjunto de primers para doze locus microssatélites com tamanho médio de 200 pb (Pavinato *et al.*, 2013). Com o objetivo de facilitar a identificação da espécie *D. saccharalis*, a região barcode do gene citocromo oxidase I (COI) foi sequenciada e estudada por Bravo *et al.* (2008) e foi observado sua eficiência e utilidade para este grupo.

Li *et al.* (2010) descreveu o genoma mitocondrial de *D. saccharalis* com 15.490 pb de extensão, 13 genes codificadores de proteína, dois genes de RNA ribossomal, 22 genes de RNA transportador e uma região rica em A+T. De posse desses dados, os autores realizaram análise filogenética da região do genoma mitocondrial de 10.974 pb (que compreendem os 13 genes codificantes de proteínas) de oito mitogenomas de lepidópteros, incluindo *D. saccharalis*. A análise confirmou a relação existente entre os lepidópteros das superfamílias Pyraloidea (*Ostrinia furnacalis*, *O. nubilalis* e *D. saccharalis*) e Bombycoidea (*Bombyx mandarina*, *Bombyx mori*, *Antheraea pernyi* e *Manduca sexta*) constituindo o clado Obtectomera.

Seis espécies do gênero *Diatraea* (*D. busckella*, *D. centrella*, *D. crambidoides*, *D. grandiosella*, *D. rosa* e *D. saccharalis*) e outras espécies da superfamília Pyraloidea e da família Noctuidae foram estudadas filogeneticamente por Lange *et al.* (2004) utilizando os marcadores COII e RNAr 16S. As árvores geradas deram suporte à origem monofilética do gênero *Diatraea*, o qual foi dividido em dois grupos: *centrella-crambidoides-grandiosella* e *busckella-rosa-saccharalis*. Lange *et al.* (2004) também observaram que as seis populações de *D. saccharalis*

incluídas no estudo foram agrupadas em dois grupos: México-América do Sul e Caribe-EUA. No Brasil, analisando-se o marcador COII, foram observados dois haplótipos diferentes. As populações provenientes dos estados de Pernambuco, Paraná e São Paulo apresentaram um mesmo haplótipo, enquanto as populações do Mato Grosso e Goiás possuem outro (Cortés *et al.*, 2010).

2.5.2 Espaçadores internos transcritos (ITS)

O DNAr 45S de eucariotos está organizado em repetições em tandem e é formado pelas subunidades de genes ribossomais 18S, 5,8S e 28S. Entre as subunidades dos genes ribossomais há regiões intergênicas chamadas de ITS (Espaçadores Internos Transcritos) de dois tipos: o ITS 1 se encontra entre os genes 18S e 5,8S e o ITS 2 situado entre os genes 5,8S e 28S (Figura 7). Essas regiões espaçadoras apresentam divergência evolutiva e aparentemente não tem função. As sequências de nucleotídeos dessas regiões vêm sendo usadas em análises filogenéticas e diferenciação de populações em diversos grupos de organismos como, por exemplo, fungos, *Drosophila*, peixes, ouriços do mar e também em lepidópteros (Hindenach e Stafford, 1984; Schlötterer *et al.*, 1994; Marçon *et al.*, 1999; Matesujová *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2001).

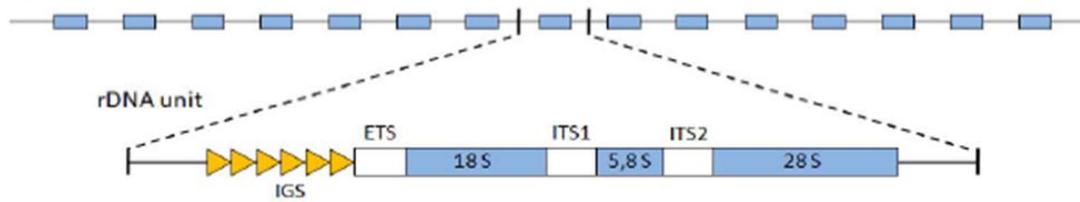


Figura 7 – Organização estrutural das sequências ribossomais e dos espaçadores ITS 1 e ITS 2 em eucariotos (Martins *et al.*, 2010).

Estudos filogenéticos e populacionais utilizando o espaçador ITS vêm sendo realizado em algumas famílias de lepidópteros: Bombycidae, Tortricidae, Saturniidae, Lasiocampidae, Lycaenidae, Sesiidae, Pyralidae e Crambidae. Dentre os estudos realizados com espécies pertencentes a estas famílias já foram observadas diferenças no tamanho, composição e estrutura secundária da sequência tanto intraespecífica quanto entre espécies diferentes (Marçon *et al.*, 1999; Mahendran *et al.*, 2006; Mackern e Szalanski, 2007 Barr *et al.*, 2009; Wiemers *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2011). Essas características fazem do ITS 1 e ITS 2 bons candidatos para estudos de diversidade genética envolvendo as duas espécies praga *D. saccharalis* e *D. flavipennella* em populações de canaviais do Nordeste do Brasil.

3. Objetivos

3.1 Geral

Avaliar o grau de divergência estrutural e barcode do ITS 2 nas espécies *Diatraea flavipennella* e *Diatraea saccharalis*.

3.2 Específicos

1. Avaliar o grau de divergência estrutural e características funcionais das sequências ITS2 entre as espécies *D. flavipennella* e *D. saccharalis* e entre elas e outras espécies de Lepidoptera.
2. Estabelecer uma metodologia rápida para diferenciação das duas espécies com base em ITS 2 utilizando DNA de qualquer estágio do desenvolvimento (ovo, lagarta e adulto).

4. Material e Métodos

4.1 Obtenção do material e extração de DNA

Um total de 25 ovos, 20 lagartas e 30 adultos pertencentes à espécie *Diatraea flavipennella* foram cedidos pelo Laboratório de Patologia de Insetos/UFRPE, Recife-PE e utilizados nesse estudo. Por sua vez, da espécie *D. saccharalis* foram utilizados 25 ovos, 25 lagartas e 40 adultos cedidos pela Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA), Carpina-PE. Todos os indivíduos foram obtidos de criações e identificados morfológicamente.

A metodologia de extração de DNA usada por indivíduo (ovo, lagarta e adulto) seguiu as descrições de Walsh (1991) com modificações. Os ovos foram utilizados inteiros; das lagartas foram utilizadas as vísceras e dos indivíduos adultos as cabeças para a extração de DNA. As referidas partes de cada indivíduo foram colocadas em um tubo plástico de 1,5 mL com 100 µL de Chelex® 100 (BioRad, Berkeley, California, USA) a 5% (m/v). Posteriormente, o material foi macerado com a ajuda de um pistilo até alcançar a homogeneização, seguido por incubação por 1 h em banho-maria a 54°C. Subseqüentemente, a mistura foi transferida para outro tubo plástico e foi mantida a 94°C por 30 min no termociclador Multigene OptiMax TC 9610 (LABNET™, Edison, New Jersey, USA). Em seguida a solução foi centrifugada a 13000 rpm por 6 minutos e o sobrenadante foi transferido para um tubo plástico de 1,5 mL, e estocado a -20°C.

4.2 Reação em Cadeia de Polimerase

Foram usados os primers NG02955 (5'-ATG AAC ATC GAC ATT TCG AAC GCA CA-3') e AB052895 (5'-TTC TTT TCC TCC GCT TAG TAA TAT GCT TAA-3')

descritos por Wan et al. (2011) para a amplificação do ITS 2. A reação de amplificação consiste de 12,5 µL do Mix Go Taq Colorless (Promega® Fitchburg, Wisconsin, USA), 8,5 µL de *Nuclease Free Water*, 1,5 µL de cada primer, e 1µL de DNA molde. O procedimento de amplificação foi realizada no termociclador Multigene OptiMax Thermal Cyclor TC 9610 (LABNET™, Edison, New Jersey, USA) com os seguintes parâmetros de ciclagem: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos; seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto, e extensão a 72°C por 1 minuto; a extensão final foi a 72°C por 7 minutos. Os produtos de amplificação foram analisados em eletroforese de gel de agarose a 3%, por 60 minutos a 120 volts. Os amplicons foram corados com Bluegreen (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil) e visualizados em transluminador UV.

4.3 Purificação dos amplicons, sequenciamento e análises

A purificação dos amplicons foi realizada com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega® Fitchburg, Wisconsin, USA), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, o sequenciamento do amplicon purificado foi realizado no sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems, Cleveland, Ohio, USA) na Plataforma de Sequenciamento do CCB - UFPE. As sequências foram avaliadas com o uso dos programas Pregap4 v 1.5 e Gap4 incorporados ao Pacote Staden (Staden 1996), utilizando valor de Phred igual a 30 como ponto de corte de qualidade. Foram realizadas buscas de similaridade no GenBank com o auxílio do algoritmo Blastn (Altschul 1990). Foram incluídas no alinhamento para a análise das regiões conservadas 62 espécies pertencentes a 14 diferentes famílias de Lepidópteros (Tabela 1). O alinhamento foi realizado pelo método Muscle (Edgar 2004). A árvore filogenética da família Crambidae foi gerada pelo método Máxima

Verossimilhança (MV) e usando o software MEGA v. 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Como grupo externo foram utilizadas quatro espécies do gênero *Zygaena* (Lepidoptera: Zygaenidae): *Z. tamara* (AJ844465.1), *Z. rubricollis* (AJ844463.1), *Z. seitzii* (AJ844464.1) e *Z. nocturna* (AJ844460.1).

Tabela 1 – Espécies de Lepidoptera que foram incluídas na análise dos domínios conservados.

Superfamília	Família	Espécie	Nº Genbank	
Bombycoidea	Lasiocampidae	<i>Dendrolimus sibiricus</i>	AM946753.1	
		<i>Dendrolimus superans</i>	AM946736.1	
		<i>Dendrolimus spectabilis</i>	AM946742.1	
	Saturniidae	<i>Actias selene</i>	GU073313.1	
		<i>Antheraea pernyi</i>	HM359008.1	
Gelechioidea	Gelechiidae	<i>Phthorimaea operculella</i>	GU073315.1	
			HQ880002.1	
			HQ879990.1	
Hesperioidea	Hesperiidae	<i>Tuta absoluta</i>	HQ698846.1	
		<i>Pyrgus armoricanus</i>	JF267329.1	
Noctuoidea	Lymantriidae	<i>Lymantria dispar</i>	DQ186972.1	
		<i>Lymantria xyliina</i>	GU568032.1	
			GU568031.1	
		<i>Perina nuda</i>	FJ041110.1	
			GQ478350.1	
	Noctuidae		<i>Spodoptera exigua</i>	JN863293.1
				JN863292.1
			<i>Spodoptera frugiperda</i>	GQ478352.1
			<i>Spodoptera litura</i>	FJ041111.1
			JN863294.1	
Papilionoidea	Lycaenidae	<i>Helicoverpa armigera</i>	EU294148	
		<i>Sesamia inferens</i>	KF268033.1	
		<i>Polyommatus icarus</i>	AY556732.2	
		<i>Polyommatus andronicus</i>	AY556731.2	
		<i>Polyommatus andronicus</i>	AY556731.2	
		<i>Polyommatus eroides</i>	AY556726.2	
		<i>Polyommatus eroides</i>	GQ166184.1	
		<i>Polyommatus menelaos</i>	AY556723.2	
		<i>Polyommatus amandus</i>	AY556661.2	
		<i>Polyommatus forsteri</i>	AY556598.2	
		<i>Polyommatus ripartii</i>	KC967274.1	
		<i>Polyommatus eros</i>	GQ166184.1	
		<i>Polyommatus junonia</i>	GQ166170.1	
<i>Agrodiaetus actinides</i>	AY556753.2			

		<i>Agrodiaetus paulae</i>	AY556564.2
		<i>Lysandra coridon</i>	AY556713.2
		<i>Neolysandra coelestina</i>	AY556657.2
		<i>Neolysandra fatima</i>	AY556682.2
		<i>Aricia artaxerxes</i>	AY556730.2
		<i>Aricia agestis</i>	JX678216.1
		<i>Aricia morronensis</i>	JX678213.1
		<i>Aricia cramera</i>	JX678212.1
		<i>Aricia vandarbani</i>	JX678211.1
		<i>Chilades trochylus</i>	GQ166186.1
		<i>Cyaniris semiargus</i>	AY556621.2
		<i>Lycaeides argyrognomon</i>	GQ166178.1
	Nymphalidae	<i>Erebia epiphron</i>	KC184899.1
		<i>Erebia serotina</i>	KC184898.1
		<i>Erebia pronoe glottis</i>	KC184896.1
	Papilionidae	<i>Iphiclides podalirius</i>	AY556551.1
	Pieridae	<i>Eurema blanda arsakia</i>	FJ041112.1
		<i>Leptidea reali</i>	JF512855.1
		<i>Leptidea duponcheli</i>	JF512853.1
		<i>Leptidea lactea</i>	JF512850.1
		<i>Leptidea juvernica</i>	JF512846.1
		<i>Leptidea morsei</i>	JF512839.1
Pyraloidea	Crambidae	<i>Chilo hyrax</i>	EF580106.1
		<i>Chilo suppressalis</i>	EF580105.1
		<i>Cnaphalocrocis medinalis</i>	HM755444.1
			HM755443.1
			HM755442.1
			HM755441.1
			HM755440.1
		<i>Maruca vitrata</i>	FJ041109.1
			GQ478351.1
		<i>Ostrinia nubilalis</i>	AF349036.1
	Pyralidae	<i>Dioryctria reniculelloides</i>	DQ792575.1
		<i>Dioryctria pseudotsugella</i>	DQ792573.1
Tineoidea	Gracillariidae	<i>Marmara gulosa</i>	AF284568.1
			AF284564.1
Zygaenoidea	Zygaenidae	<i>Zygaena tamara</i>	AJ844465.1
		<i>Zygaena seitzi</i>	AJ844464.1
		<i>Zygaena rubricollis</i>	AJ844463.1
		<i>Zygaena nocturna</i>	AJ844460.1
		<i>Zygaena manlia</i>	AJ844457.1
		<i>Zygaena haematina</i>	AJ844451.1

5. Resultados

5.1 Variação da sequência de ITS 2

As amplificações da região ITS 2 oriundas dos DNAs dos ovos, lagartas e adultos apresentaram para *D. flavipennella* bandas de aproximadamente 580 pb e para *D. saccharalis* as bandas se posicionaram um pouco acima dos 600 pb (aproximadamente 610 pb) (Figura 8).

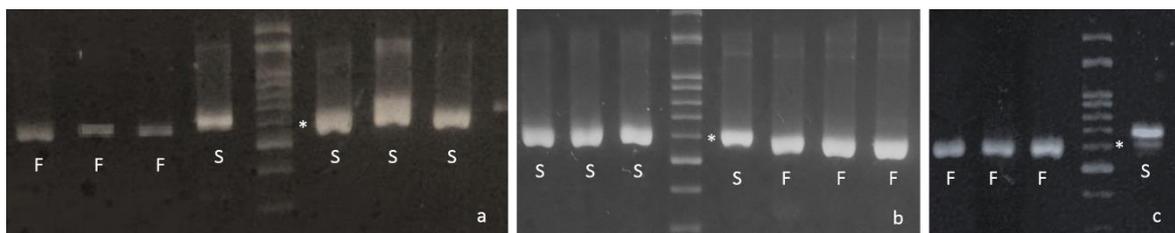


Figura 8 – Gel de agarose a 3% mostrando a diferença de tamanho entre os amplicons de ITS 2 de *Diatraea flavipennella* e *D. saccharalis* nos três estágios de desenvolvimento: ovo (a), lagarta (b) e adulto (c). F: *D. flavipennella*, e S: *D. saccharalis*. Asterisco indica banda de 600 pb.

5.2 Análise das sequências de ITS 2

Foram obtidas sete sequências de *D. saccharalis* (6 de lagarta e 1 de adulto) e cinco de *D. flavipennella* (3 de lagarta e 2 de adulto) com os primers da região espaçadora ITS 2 do DNA ribossomal, considerando valores de PHRED acima de 30. As sequências variaram de 575 pb até 613 pb. A partir da realização de um alinhamento com o banco de dados do Genbank foi possível observar que além do ITS2 as sequências incluem 101 pb do DNAr 5,8S e 60 pb do DNAr 28S. Depois de identificadas, as sequências parciais do DNAr obtidas juntamente com o ITS 2 foram removidas da análise.

O alinhamento das sequências de *D. flavipennella* e *D. saccharalis* revelou inserções e deleções que provocaram variações na extensão das sequências. O locu do ITS 2 apresenta 410 pb em *D. flavipennella* e 448 pb em *D. saccharalis*. A composição nucleotídica média total das sequências ITS 2 foi similar com 30,3% de timina; 22,3% de citosina; 20% de adenina; e 27,4% de guanina. O conteúdo médio de GC em *D. saccharalis* (51%) apresentou-se levemente maior que em *D. flavipennella* (48%). Não foram observadas variações entre indivíduos para a espécie *D. flavipennella*. Por outro lado, foi observada dentre os indivíduos de *D. saccharalis* um indel de três bases.

5.3 Segmentos conservados nas sequências de ITS 2 de *Diatraea*

Após o alinhamento das sequências foram encontrados quatro segmentos conservados no ITS 2 das duas espécies de *Diatraea*. No início da sequência, logo após o DNA ribossomal 5,8S, foi observada uma sequência de 31 pb em 5'-TT(T/C)TTCGAAACGGTGTGACCGTTCTCCTCC-3' com uma timina na terceira posição em *D. flavipennella* e uma citosina em *D. saccharalis*, além de um indel (guanina) na quarta posição em *D. saccharalis*. O segundo segmento é uma sequência de 21 pb idêntica nas duas espécies, 5'-GAGTCGGTTTAAATATATTAC-3'. O terceiro segmento é uma sequência de 42 pb, 5'-ACGCGTGTTCGTTCTCGATATAGAAAGCGACTCTTTGTGGATG-3' também idêntica nas duas espécies. A quarta sequência conservada é um segmento de 127 pb em *D. flavipennella* e 131/133 pb em *D. saccharalis* anterior ao gene do RNAr 28S (Figura 9). Nessa sequência foram vistos: indel TC na posição 10 da sequência em *D. saccharalis*; inserção do trinucleotídeo GCG na posição 41 em *D. saccharalis*; na posição 67 há uma guanina em *D. flavipennella* e uma timina em *D.*

saccharalis; na posição 77 há uma citosina em *D. flavipennella* e uma adenina em *D. saccharalis* e um indel de um trinucleotídeo (TCG) em *D. saccharalis* na posição 78 em duas das sete sequências.

```

D._flavipe GTTTGCAGA- -GAGTAGGCG GACTCGACGT CCGAAGAGGC ---GCGGCGG CGTCGTCGTC 60
D._flavipe .....- -.....
D._flavipe .....- -.....
D._flavipe .....- -.....
D._flavipe .....- -.....
D._sacchar .....T C..... GCG.....

D._flavipe GTAGACGTGT CTGCGTC--G TCGTCGTCGT CGTCGTCGCG CTGACGGATA TCGTGTCTGC 120
D._flavipe .....--.....
D._flavipe .....--.....
D._flavipe .....--.....
D._flavipe .....--.....
D._sacchar .....T... ..A--.....
D._sacchar .....T... ..A--.....
D._sacchar .....T... ..ATC.....
D._sacchar .....T... ..ATC.....
D._sacchar .....T... ..A--.....
D._sacchar .....T... ..A--.....
D._sacchar .....T... ..A--.....

D._flavipe CTCTAATTTT ATCG 134
D._flavipe .....
D._flavipe .....
D._flavipe .....
D._flavipe .....
D._sacchar .....

```

Figura 9 – Alinhamento mostrando o segmento 4 conservado em *Diatraea flavipennella* e *D. saccharalis*.

5.4 Identificação de segmentos conservados em *Diatraea* e outras espécies de Lepidoptera

Quando comparadas as sequências ITS 2 de *Diatraea* com as de outras espécies de Lepidoptera disponíveis no Genbank foi possível observar três

sequências conservadas dentro das 64 espécies analisadas. A sequência de 9 pb 5'-TGACCGTTC-3' presente em *Diatraea* apresentou uma troca de base do quinto nucleotídeo C por um G nas espécies de Crambidae: *Cnaphalocrocis medinalis*, *Chilo suppressalis*, *C. hyrax*, *Ostrinia nubilalis* e *Maruca vitrata*. Essa mesma configuração (5'-TGACGGTTC-3') foi observada nas espécies das famílias: Lasiocampidae, Zygaenidae, Lycaenidae, Hesperidae, Noctuidae, Pyralidae, Gelechiidae (*Tuta absoluta*), Pieridae (*Eurema blanda*), Saturniidae (*Antheraea pernyi*). Por sua vez, as espécies da família Lymantridae possuem uma timina no quarto nucleotídeo da sequência (5'-TGATCGTTC-3').

A segunda sequência possui 20 pb (5'-GTAGGCGGAC(T/A)CGACGTCCG-3') e é idêntica em 61 das 64 espécies de Lepidoptera analisadas. As espécies do gênero *Zygaena* e a espécie *Chilades trochylus* apresentaram na posição 11 desta sequência uma adenina ao invés de uma timina como foi observado nas outras espécies. *Ostrinia nubilalis* (Crambidae) não apresentou esta sequência ao longo do ITS 2.

O terceiro segmento possui 12 pb e em *Diatraea* (Crambidae) possui a seguinte sequência: 5'-CGTGTCTGCCTC-3'. Sequências idênticas a esta foram encontradas nas espécies: *Dyorictria* spp (Pyralidae), *Erebia* spp (Nymphalidae), *Iphiclides podalirius* (Papilionidae), *Leptidea reali* (Pieridae), *Marmara gulosa* (Gracilariidae), *Zygaena* spp (Zygaenidae), *Cnaphalocrocis medinalis* e *Maruca vitrata* (Crambidae). Nas espécies do gênero *Chilo*, gênero próximo de *Diatraea*, *C. hyrax* e *C. suppressalis* apresentaram uma citosina na terceira posição da sequência. Assim como as espécies do gênero *Chilo*, outras espécies incluídas nesta análise também apresentaram uma citosina na terceira posição do segmento, foram elas: *Spodoptera exigua*, *S. litura*, *Sesamia inferens* e *Helicoverpa armigera*,

todas de Noctuidae; *Eurema blanda*, Pieridae; *Lymantria dispar*, *L. xyliana* e *Perina nuda*, Lymantridae; as espécies do gênero *Polyommatus* spp, do gênero *Aricia* spp, *Agrodiaetus* spp, *Lysandra coridon*, *Neolysandra* spp, *Cyaniris semiargus*, *Chilades trochylus* e todas de Lycaenidae. Duas espécies da família Saturniidae apresentaram uma adenina na terceira posição do segmento, *Antherea pernyi* e *Actias selene*.

5.5 Filogenia do ITS 2 em Crambidae

A árvore filogenética incluindo as espécies: *Diatraea saccharalis*, *D. flavipennella*, *Chilo hyrax*, *C. supressalis*, *Cnaphalocrocis medinalis* e *Maruca vitrata*, todas da família Crambidae foi construída usando quatro espécies do gênero *Zygaena* (Lepidoptera: Zygaenidae): *Z. tamara*, *Z. rubricollis*, *Z. seitzi* e *Z. nocturna* como grupos externos (Figura 10).

A topologia apresentada pela árvore gerada através do método de MV agrupou as espécies em dois grupos monofiléticos com suporte do valor de bootstrap de 98 para o ramo referente à subfamília Crambinae, estando representado pelas espécies *Diatraea flavipennella*, *D. saccharalis*, *Chilo hyrax* e *C. supressalis*; o segundo grupo com valor de bootstrap de 76 referente à subfamília Spilomelinae, representado pelas espécies: *Cnaphalocrocis medinalis* e *Maruca vitrata*.

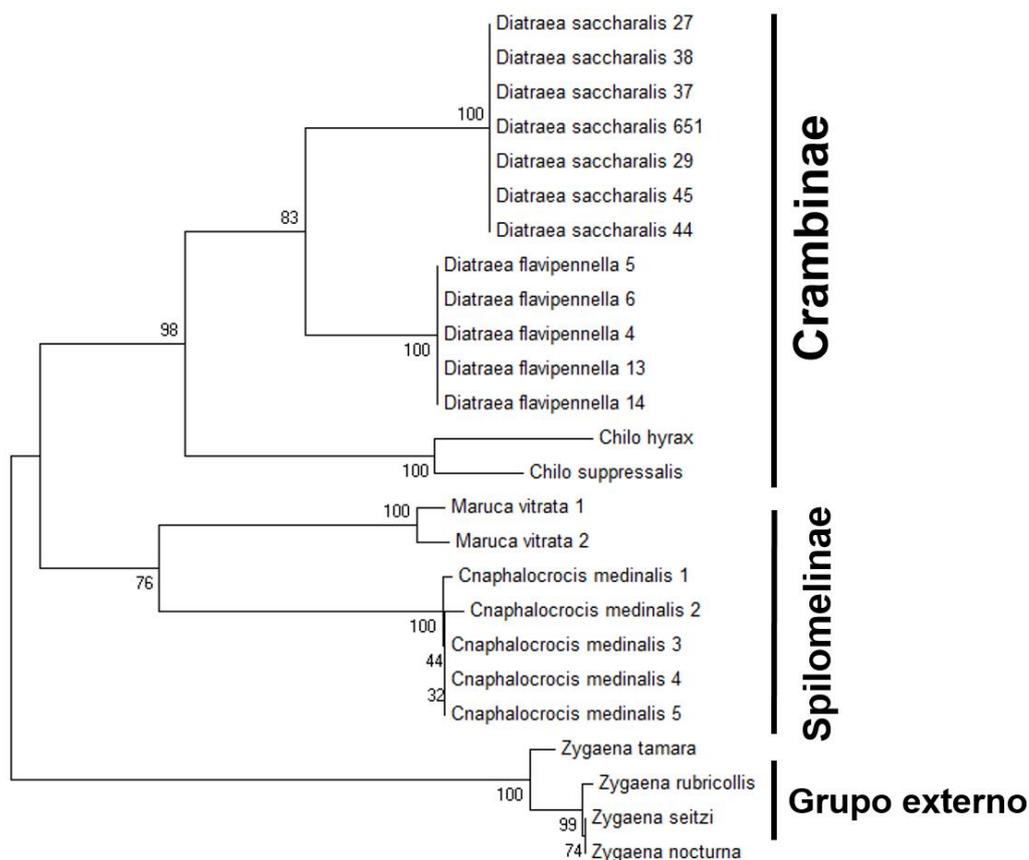


Figura 10 – Máxima verossimilhança baseada em ITS 2 de espécies da família Crambidae. A numeração dos nós correspondem aos valores de bootstrap.

5.6 Sequências Microssatélites

Observamos nas sequências de *D. saccharalis* e *D. flavipennella* a presença de microssatélites (Tabela 2). As sequências microssatélites comuns às duas espécies foram AT, com três repetições em *D. saccharalis* e *D. flavipennella* e quatro repetições apenas em *D. flavipennella*; GT, uma com seis repetições em *D. saccharalis* e com três em *D. flavipennella*; AG, duas sequências com três repetições em *D. saccharalis* e uma em *D. flavipennella*; GCG, aparece com quatro repetições em *D. saccharalis* e uma em *D. flavipennella*; GCG, aparece com quatro repetições em *D. saccharalis* e com três em *D. flavipennella*; CGT, aparece com três repetições em *D. saccharalis* e *D. flavipennella*, entretanto *D. flavipennella* tem uma sequência adicional com sete repetições. Em contrapartida foram encontrados

um dinucleotídeo (AC, com três repetições) e dois trinucleotídeos (GAC, com três repetições e TCG, com seis repetições) que apenas estavam presentes nas sequências ITS 2 de *D. saccharalis*. Dentre as sequências comuns às duas espécies, foi observado que os dinucleotídeos AT e AG e os trinucleotídeos GCG e CGT estavam localizados em regiões conservadas da sequência ITS 2.

Tabela 2 - Sequências microssatélites encontradas em *Diatraea flavipennella* e *D. saccharalis*. Os dados do posicionamento das sequências dizem respeito as sequências sem gaps.

SSR	Posição		Repetição	
	<i>D. flaviepnella</i>	<i>D. saccharalis</i>	<i>D. flaviepnella</i>	<i>D. saccharalis</i>
Motivo				
AT	59, 200, 238 e 257	61	3 e 4	3
AG	290	271 e 290	3	3
GT	70	243	3	6
AC	-	124	-	3
CGT	332 e 352	368	3 e 7	3
GCG	322	355	3	4
GAC	-	78	-	3
TCG	-	392	-	6

6. Discussão

Um barcode ideal deve possuir variação suficiente entre as sequências para discriminar as espécies; entretanto também é necessário ser suficientemente conservado para que tenha menos variabilidade dentro de uma espécie do que entre espécies (Yao *et al.*, 2010). Os fragmentos amplificados de ITS 2 visualizados em gel de agarose mostraram tamanhos distintos em cada uma das espécies incluídas no trabalho. Esta região espaçadora do DNA ribossomal tem sido usada com sucesso para identificar diferentes espécies de lepidópteros e de insetos de outras ordens apenas comparando o tamanho das sequências sem a necessidade de um sequenciamento (Barr *et al.*, 2009; Farris *et al.*, 2010; Wan *et al.*, 2011; Sayed *et al.*, 2013; Zomuanpuii *et al.*, 2013). Um marcador molecular que permita ao pesquisador, ou ao profissional que trabalha diariamente no combate à *Diatraea* ou a outras pragas, identificar espécies de forma rápida e a um baixo custo é bastante atraente uma vez que, em alguns casos, apenas são encontradas partes da lagarta por conta dos cortes feitos na cana-de-açúcar ou apenas ovos, que são de difícil identificação. Dessa forma, o ITS 2 se mostra importante ferramenta barcode para a identificação dessas duas espécies.

Além da eficiência em separar espécies intimamente relacionadas, outros fatores fazem do ITS 2 um bom marcador a ser utilizado. A sequência do ITS 2 é relativamente curta preenchendo alguns dos pré-requisitos para utilização da PCR (mesmo a partir de DNA degradado) e do sequenciamento e as variações intraespecíficas, tanto em plantas quanto em animais são menores que as divergências interespecíficas (Meyer e Paulay, 2005; Marinho *et al.*, 2011). Recentemente foi descoberto que, além da variabilidade da sequência primária do ITS 2, a estrutura secundária também varia de espécie para espécie, e que a

análise conjunta desses dois parâmetros aumenta o alcance do sinal filogenético podendo relacionar táxons mais altos (Joseph *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 2010).

Diatraea saccharalis e *D. flavipennella* apresentaram a região ITS 2 com 448 e 410 pb, respectivamente, comprovando a diferença observada no gel. A variação no comprimento observada entre as espécies pode ter sido ocasionada por inserções efetuadas por vários fatores incluindo o número relativo e o tamanho das repetições microssatélites, taxa de crossing-over desigual, conversão gênica e deriva genética (Levinson e Gutman, 1987). Quanto mais alterações levem à variação no tamanho da sequência de ITS 2 maior será o efeito na conservação das estruturas secundárias (Kuracha *et al.*, 2006).

Dentro das espécies pertencentes à família Crambidae até então analisadas pudemos observar que o tamanho médio da região ITS 2 no grupo é de 445 pb, representada pelas espécies, *Chilo hyrax* (488 pb), *C. suppressalis* (484 pb), *Cnaphalocrocis medinalis* (447 pb) e *Maruca vitrata* (451 pb), enquanto que ITS 2 em *O. nubilalis* apresenta 390 pb (Margam *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2011). O comprimento da região ITS 2 é específico de cada espécie da família Crambidae e isso também acontece em outras famílias de lepidópteros como: Tortricidae, Noctuidae, Geometridae e Lycaenidae (Barr *et al.*, 2009; Wiemers *et al.*, 2010; Wan *et al.*, 2011; Kvie *et al.*, 2012). Dentro da região ITS 2 das duas espécies de *Diatraea* foram encontradas oito diferentes sequências microssatélites. Dentre essas, cinco (AT, GT, AG, GCG e CGT) foram comuns para as duas espécies e em alguns casos apenas modificando o número de repetições. O dinucleotídeo AC e os trinucleotídeos GAC e TCG foram apenas encontrados em *D. saccharalis*, portanto a inserção destas sequências em *D. saccharalis* ou a deleção delas em *D. flavipennella*, pode ter contribuído para a diferença no comprimento total das

sequências observadas. Apesar de poucos indivíduos analisados não houve diferença intraespecífica no tamanho da sequência em *D. flavipennella* e em *D. saccharalis* dois indivíduos apresentaram um acréscimo de três nucleotídeos. Essa homogeneização do tamanho das sequências pode ser atribuída à endogamia existente em colônias de criação. Também não foram relatadas diferenças intraespecíficas significativas no tamanho das sequências do ITS 2 de espécies dos gêneros de Lepidópteros: *Cnaphalocrocis*, *Maruca*, *Chilo*, *Ostrinia*, *Spodoptera*, *Polyommatus* e em espécies das famílias Geometridae, Lasiocampidae, Pieridae, Tortricidae e Zygaenidae (Niehuis *et al.*, 2006; Mikkola e Stahls, 2008; Barr *et al.*, 2009; Wiemers *et al.*, 2010; Dinca *et al.*, 2011; Margam *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2011; Kvie *et al.*, 2012). Em outros grupos, como por exemplo Díptera, as 10 espécies de mosquitos do gênero *Anopheles* estudadas, provenientes de zonas geográficas diferentes, também não mostraram diferenças intraespecífica na composição nucleotídica e nem no tamanho da sequência (Zumuanpui *et al.*, 2013).

O conteúdo de GC variou pouco entre as duas espécies deste trabalho, mas quando comparamos o valor encontrado nelas com de outras espécies da família Crambidae, podemos observar que nesta família as espécies possuem percentagens de conteúdo de GC muito próximos, como em *C. medinalis* (47,8%) e *M. vitrata* (45,1%), porém *Chilo suppressalis* e *C. hyrax*, que são consideradas de um gênero muito próximo de *Diatraea* apresentaram 57,2 e 55,2% de GC, valores mais altos dos que foram observados até agora nas outras espécies de Crambidae (Margam *et al.*, 2011; Wan *et al.*, 2011). Quando observamos espécies de outras famílias vemos um aumento significativo do conteúdo de GC, como em Tortricidae (61%) e Noctuidae (58,6%), porém esse aumento acontece tanto em grupos mais

basais quanto mais derivados (Barr *et al.*, 2009; Wan *et al.*, 2011). A percentagem de GC para Lepidoptera é considerada relativamente alta e isto pode influenciar na energia da estrutura secundária (Banerjee *et al.*, 2007a).

Foi realizada uma pequena filogenia da família Crambidae com base nas sequências de ITS 2 que estavam disponíveis no Genbank. Foi observado que a árvore gerada corrobora a obtida com dados morfológicos (Solis & Mitter, 1992) propondo Crambidae como uma família de origem monofilética. Os gêneros incluídos nesta análise foram agrupados em dois grupos, um deles referente à subfamília Crambinae, onde *Chilo* foi colocado como grupo irmão de *Diatraea*, reforçando a atual classificação de que são dois taxóns diferentes e confirmando dados anteriores disponíveis na literatura que afirmam que *Chilo* e *Diatraea* estão separados por questões práticas e o que os diferencia é a ausência de ocelos em *Diatraea*, enquanto que em *Chilo* eles são vestigiais ou ausentes (Bleszynski, 1969). Este mesmo agrupamento também foi observado quando foi realizada análise filogenética de 8 genes mitocondriais concatenados (COI, ATP6, COIII, ND1, ND3, ND5, CYTB E 16S) através do método de MV e Inferência Bayesiana (Rocha *et al.*, 2013). O outro grupo formado foi representado por *Maruca vitrata* e *Cnaphalocrocis medinalis*, formando o clado da subfamília Spilomelinae. Ambos os ramos formados são de origem monofilética segundo a árvore gerada com o ITS 2.

Apesar de variável, regiões com diversos graus de conservação são encontradas no ITS quando comparadas sequências entre espécies, gêneros, famílias e até ordens diferentes dentro do subfilo Hexapoda. Alguns autores também sugerem em seus trabalhos, com base na análise da estrutura secundária do ITS 2, que algumas regiões dentro dessas sequências são conservadas dentre os eucariotos (Coleman, 2007).

O alinhamento das sequências de ITS 2 das espécies *D. flavipennella* e *D. saccharalis* revelou quatro segmentos conservados que correspondem a 53,6% da sequência em *D. flavipennella* e 49,1% em *D. saccharalis*. Essas regiões de sequências conservadas estão intercaladas por regiões variáveis. Mesmo sendo altamente conservadas essas regiões apresentam entre as duas espécies algumas diferenças que as caracterizam, como pequenos indels e substituições de bases. A explicação para esta aparente alternância entre regiões conservadas e regiões variáveis foi apresentada por Mai e Coleman (1997). As regiões muito conservadas contribuem profundamente para o pareamento das hélices da estrutura secundária onde a transcrição do RNA se inicia e essa estrutura secundária guia o processo.

Dentro da ordem Lepidoptera, existem três motivos conservados de 9, 20 e 12 pb que sofreram poucas modificações, como pequenos indels, substituições ou mesmo motivos que permaneceram inalterados na maioria das espécies analisadas. O nível de convergência de algumas sequências de ITS 2 entre espécies de diferentes famílias dentro de Lepidoptera talvez seja devido a alguma pressão evolutiva para manter a estrutura secundária do RNA envolvida no processamento pós-transcricional do RNAr (Shinohara *et al.*, 1999).

Em eucariotos o ITS 2 tem tipicamente quatro hélices. As hélices I e IV são as mais variáveis (específicas no nível de espécie e subespécie) e as hélices II e III contêm as regiões mais conservadas da sequência primária. Dentro de um gênero, os pareamentos basais das hélices I, II e IV são conservados, e a porção mais distal da hélice III é a mais conservada (Coleman, 2007). Duas sequências de sete (TAGCATA) e oito (ATCGTCGT) pares de base presentes em *Diatraea saccharalis* e uma sequência de sete pares de base (TCGTCGT) presente em *D. flavipennella* e em outros 21 gêneros de Lepidoptera são idênticas às sequências

encontradas a 5' da região conservada da hélice III em besouros, *Drosophila*, *Musca* e outros gêneros de dípteros. O processamento do RNAr ainda não é conhecido totalmente em termos bioquímicos, mas está claro que essas sequências, conservadas nos mais diversos níveis taxonômicos, os padrões de dobramento e a estrutura secundária do RNA transcrito inicial têm um papel importante em guiar o processamento do RNA (Van Nues *et al.*, 1995; Hung *et al.*, 1999; Joseph *et al.*, 1999).

As estruturas secundárias do ITS 2 vem sendo usadas como ferramenta auxiliar na filogenia de DNA não codificante, uma vez que o alinhamento de sub-regiões onde as sequências diferem consideravelmente apresenta certa dificuldade (Coleman *et al.*, 2007). Essas estruturas secundárias já vem sendo aplicadas em filogenia em Lepidoptera, como no grupo das borboletas azuis do gênero *Polyommatus* (Wiemers *et al.*, 2009).

A ocorrência de microssatélites em ITS 2 de espécies de corais eventualmente aumenta a dificuldade de alinhamento de regiões homólogas e conseqüentemente isso influencia nas reconstruções filogenéticas (Chen *et al.*, 2004). A mesma situação ocorreu quando tentou-se reconstruir relações filogenéticas entre espécies de lepidópteros de famílias e superfamílias diferentes. Porém, esses SSRs podem ter um efeito benéfico no processamento e na estrutura secundária do ITS 2. Essas sequências podem guiar e determinar a montagem estrutural do RNA e proporcionar uma maior estabilidade para a molécula, além de estabilizar os genes que o flanqueiam (Kunin *et al.*, 2007; Joukhadar e Jighly, 2012; Zumuanpui *et al.*, 2013). Essas características funcionais importantes justificam o fato de que a maioria das sequências microssatélites estão localizadas em regiões conservadas dentro do ITS 2 de *Diatraea*.

Recentemente foram desenvolvidos primers para 12 locus polimórficos de microssatélites para estudos populacionais em *Diatraea saccharalis* (Pavinato et al., 2013), mostrando o quanto os microssatélites podem ser também uma boa ferramenta de estudo para este grupo. Caracterização de microssatélites também vêm sendo realizadas em outras famílias de Lepidoptera como Noctuidae e Papilionidae (Meglecz et al., 2004; Zhang, 2004).

7. Conclusões

- A região ITS 2 demonstrou ser eficiente na diferenciação das espécies *D. flavipennella* e *D. saccharalis* na visualização dos amplicons em gel de agarose.
- Diferenças de composição nucleotídica das sequências e composição de microssatélites foram observadas nas regiões ITS 2 de *D. flavipennella* e *D. saccharalis*.
- Segmentos genômicos do ITS 2 conservados em diferentes grupos taxonômicos também estavam presentes em *Diatraea flavipennella* e *D. saccharalis* e corroborando sua possível atuação nos primeiros passos do processamento do RNAr.

8. Referências Bibliográficas

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Alves SB (1998) Fungos Entomopatogênicos In S.B. Alves (ed.), Controle microbiano de insetos. Piracicaba, FEALQ, pp. 289-381.
- Alves SB, Lopes RB, Vieira SA & Tamai MA (2008) Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: Alves SB & Lopes RB (eds.), Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba, FEALQ, pp 69-110.
- Araújo LF, Bento LE, Romano JGJ, Horvathy AN, Silva AG, Cruz I, Rattes, JF (2010) Incidência de *Spodoptera frugiperda*, *Diatraea saccharalis* e *Doru luteipes* no Milho Convencional e Transgênico *Bt* Cultivados na Safrinha. XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 460 – 467.
- Banerjee AK, Arora N, Murty US, (2007) Stability of ITS2 secondary structure in Anopheles: what lies beneath? *Int. J. Integr. Biol.* 1(3): 232–238.
- Barr NB, Ledezma LA, Vasquez JD, Epstein M, Kerr PH, Kinnee S, Sage O, Gilligan M (2009) Molecular Identification of the Light Brown Apple Moth (Lepidoptera: Tortricidae) in California using a polymerase chain reaction assay of the internal transcribed spacer 2 Locus. *Journal of Economic Entomology*, 102(6): 2333-2342.
- Batista CV, Francisco O (2010) Estudo da ocorrência de *Diatraea saccharalis* Fabricius 1974 (Lepidoptera: Pyralidae) em uma usina do grupo cosan. Anais do IX Congresso de Iniciação Científica da FIO.
- Bleszynski S (1969). The taxonomy of crambinae moth borers of sugarcane. In: Williams JR, Metcalf JR, Mungomery RW e Mathes R (eds) Pest of sugarcane. Elsevier, New York, pp 11-59.
- Bortoli SA, Dória HOS, Albergaria NMMS, Botti MV (2005) Aspectos biológicos e dano de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera: Pyralidae) em sorgo cultivado sob diferentes doses de nitrogênio e potássio. *Ciênc. Agrotec*, 29(2): 267-273.
- Bravo JP, Felipes J, Zanatta DB, Silva JLC, Fernandez MA (2008) Sequence and analysis of the mitochondrial DNA control region in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 51, p. 671.
- Chen AC, Chang C, Wei NV, Chen CH, Lein Y, Lin H, Dai C, Wallace CC (2004) Secondary Structure and Phylogenetic Utility of the Ribosomal Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) in Scleractinian Corals. *Zoological Studies*43(4): 759-771.
- Coleman AW (2007) Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucleic Acids Research*, Vol. 35, No. 10. 3322–3329.
- Cortés AMP, Zarbin PHG, Takiya DM, Bento JMS, Guidolin AS, Consoli FL (2010) Geographic variation of sex pheromone and mitochondrial DNA in *Diatraea saccharalis*(Fab., 1794) (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Insect Physiology* 56: 1624–1630.
- Cueva MC, Ayquipa GA, Mescua VB (1980) Estudios sobre *Apanteles flavipes* (Cameron) introducido para controlar *Diatraea saccharalis* en el Peru. *Revista Peruana Entomologia* 23, 73–76.

- Demetrio PA, Zonetti PC, Munhoz REF (2008) Avaliação de clones de cana-de-açúcar promissores RBs quanto à resistência à Broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*) na região Noroeste do Paraná. Iniciação científica Cesumar, v. 10, n.01, p. 13-16.
- Dinca V, Lukhtanov V, Talavera G, Vila R (2011) Unexpected layers of cryptic diversity in wood white Leptidea butterflies. Nat Commun 2, 324.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput, *Nucleic Acids Research*, 32(5): 1792-97.
- Farris RE, Ruiz-Arce R, Ciomperlik M, Vasquez JD, Deleón R (2010) Development of a ribosomal DNA ITS2 marker for the identification of the thrips, *Scirtothrips dorsalis*. 15pp. Journal of Insect Science 10:26
- Freitas MRT, Fonseca APP, Silva ED, Mendonça AL, Silva CE, Mendonça AL, Nascimento RR, Sant'ana AEG (2006) The predominance of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) in sugar cane fields in the State of Alagoas, Brazil. Florida Entomologist 89(4): 539-540.
- Freitas MRT, Silva EL, Mendonça AL, Silva CE, Mendonça AL, Fonseca APP, Nascimento RR, Santos JS, Sant'ana AEG (2007) The biology of *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera: Crambidae) reared under laboratory conditions. Florida Entomologist 90(2): 309-313.
- Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Batista GC, Berti Filho E, Parra JRP, Zuchhi RA, Alves SB, Vendramim JD (1988) Manual de Entomologia Agrícola. São Paulo: Ceres, 674p.
- Gallo D, Nakano O, Silveira Neto S, Carvalho RPL, Batista GC, Berti Filho E, Parra JRP, Zuchhi RA, Alves SB, Vendramim JD (2002) Entomologia Agrícola. São Paulo: Ceres, 920p.
- Hall DG, Nuessly GS e Gilbert RA (1991) Sugar cane borer in Florida. University of Florida, IFAS Extension. ENY-666: 1-3.
- Heideman C, Munhoz REF, Pattaro Júnior JR, Fernandez MA (2010) Genetic diversity analysis with RAPD linked to sex identification in the sugar cane borer *Diatraea saccharalis*. Genet. Mol. Res. 9 (4): 2343-2348.
- Hindenach BR, Stafford WD (1984) Nucleotide sequence of the 18S -26S rRNA intergene region of the sea urchin. Nucleic Acids Research, 12(3): 1737 – 1747.
- Holloway JD, Kibby G, Peggie D (2001) The families of Malesian moths and butterflies. Fauna Melesiana Handbook 3. Leiden, Brill.
- Hung, G-C., Chilton, N.B., Beveridge, I. and Gasser, R.B. (1999) Secondary structure model for the ITS-2 precursor rRNA of strongloid nematodes of equids: implications for phylogenetic inference. Int. J. Parasitol., 29, 1949–1964
- Joseph, N., Krauskopf, E., Vera, M.I. and Michot, B. (1999) Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast. Nucleic Acids Res., 27, 4533–4540.
- Joukhadar R e Jighly A (2012) Microsatellites grant more stable flanking genes. BMC Research Notes, 5:556.
- Kristensen NP (1998) Lepidoptera, moths and butterflies. Volume 1: Evolution, systematics, and biogeography. Handbook of zoology, Volume IV: Arthropoda: Insecta, Part 35. Berlin, Walter de Gruyter.
- Kristensen NP, Scoble MJ, Karsholt O (2007) Lepidoptera phylogeny and systematics: the state of inventorying moth and butterfly diversity. Zootaxa 1668: 699–747.

- Kunin V, Sorek R, Hugenholtz P (2007) Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biology*, 8:R61.
- Kuracha M, Rayavarapu B, Kumar S, Rao P (2005) *Comparison Of Secondary Structure Of The Ribosomal Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) Of Eight Lepidopteran Species From Diverse Geographical Locations*. *The Internet Journal of Genomics and Proteomics*, v2(1).
- Kvie KS, Hogner S, Aarvik L, Liffeld JT, Johnsen A (2012) Deep sympatric mtDNA divergence in the autumnal moth (*Epirrita autumnata*). *Ecology and Evolution*, 3(1): 126–144.
- Lange CL, Scott KD, Graham GC, Sallam MN e Allsopp PG (2004) Sugarcane moth borers (Lepidoptera: Noctuidae and Pyraloidea): phylogenetics constructed using COII and 16S mitochondrial partial gene sequences. *Bulletin of Entomological Research* 94, 457–464.
- Levinson G, Gutman GA (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol*, 4(3):203-21.
- Li W, Zhang X, Fan Z, Yue B, Huang F, King E, Ran J (2010) Structural Characteristics and Phylogenetic Analysis of the Mitochondrial Genome of the Sugarcane Borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *DNA and Cell Biology* 00(00): 1-6.
- Mackern JA, Szalanski AL (2007) Molecular diagnostics of economically important clearwing moths (Lepidoptera: Sesiidae). *Florida Entomologist* 90(3): 475 – 479.
- Mahendran B, Ghosh SK, Kundu SC (2006) Molecular Phylogeny of Silk Producing Insects Based on Internal Transcribed Spacer DNA1. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 39(5): 522-529.
- Mai JC, Coleman AW (1997) The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants. *J. Mol. Evol.*, 44, 258–271.
- Marçon PCRG, Taylor DB, Mason CE, Hellmich RL, Slegfried BD (1999) Genetic similarity among pheromone and voltinism races of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Molecular Biology*, 8(2): 213-221.
- Margam VM, Coates BS, Ba MN, Sun W, Binso-Dabire CL, Baoua I, Ishiyaku MF, Shukle JT, Hellmich RL, Covas FG, Ramasamy S, Pittendrigh JABR, Murdock LL (2011) Geographic distribution of phylogenetically-distinct legume pod borer, *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Pyraloidea: Crambidae).
- Marinho MAT, Junqueira ACM, Azeredo-Espin AML (2011) Evaluation of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) as a molecular marker for phylogenetic inference using sequence and secondary structure information in blow flies (Diptera: Calliphoridae). *Genetica* 139(9):1189–1207
- Martíns C, Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Mazzuchelli J, Oliveira SG (2010) Cytogenetic Mapping and Contribution to the Knowledge of Animal Genomes. In Urbano KV (Ed) *Advances in genetics research*. Hauppauge: Nova Science Publishers, pp 289–318.
- Matejusová I, Gelnar M, Mcbeath AJA, Collins CM, Cunningham CO (2001) Molecular markers for gyrodactylids (Gyrodactylidae: Monogenea) from five fish families (Teleostei). *Int. J. Parasitol*, 31:738–745.
- Meglecz E, Petenian F, Danchin E, D'acier AC, Raplus J, Faure E (2004) High similarity between flanking regions of different microsatellites detected within each of two species of Lepidoptera: *Parnassius apollo* and *Euphydryas aurinia*. *Molecular Ecology*, 13: 1693–1700.

- Mena EFG (2010) Toxicidade de inseticidas a *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera:Crambidae) e *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae). Dissertação (Mestrado em Entomologia Esalq) - Universidade de São Paulo, Orientador: Celso Omoto.
- Mendonça AF (1996) Pragas da cana-de-açúcar. Insetos & Cia, Maceió, 200pp.
- Meyer CP, Paulay G (2005) DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. PLoS Biol 3: 2229–2238.
- Mikkola K, Ståhls G (2008) Morphological and molecular taxonomy of *Dendrolimus sibiricus* Chetverikov stat.rev. and allied lappet moths (Lepidoptera, Lasiocampidae), with description of a new species. Entomol. Fennica 19: 65-85.
- Minet J (1982) Les Pyraloidea et leurs principales divisions systematiques. Bulletin de la Société Entomologique de France 86: 262-280.
- Niehuis O, Yen SH, Naumann CM, Misof B (2006) Higher phylogeny of zygaenid moths (Insecta: Lepidoptera) inferred from nuclear and mitochondrial sequence data and the evolution of larval cuticular cavities for chemical defence. Mol Phylogenet Evol, 39(3):812-29.
- Park J, Kim G, Park H, Nam B, An W, Cha J, Lee T, Lee J (2001) Phylogenetic Analysis of Caterpillar Fungi by Comparing ITS 1-5.8S-ITS 2 Ribosomal DNA Sequences. Mycobiology, 29(3): 121-121.
- Pavinato VAC, Silva-Brandão KL, Monteiro M, Zucchi MI, Pinheiro JB, Dias FLF, Omoto C (2013) Development and characterization of microsatellite loci for genetic studies of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Genet. Mol. Res. 12 (2): 1631-1635.
- Pinto AS (2006) Controle de pragas da cana-de-açúcar. Biocontrol, Sertãozinho, 64p.
- Rocha PKL (2013) Qual região do DNA mitocondrial reflete a história evolutiva da ordem Lepidoptera. Dissertação de Mestrado, UFPE, Recife, 90p.
- Sayed SM, Montaser MM, Elsayed G, Amer SAM (2013) Preliminary molecular identification of a predatory bug, *Orius albidipennis*, collected from ornamental plants. Journal of Insect Science 13:11. Available online:
- Schaffer M, Nielsen ES, Horak M (1996) Pyralidae in Nielsen, E.S., Edwards, E.D. & Ransi, T.V.(Eds) Checklist of the Lepidoptera of Australia. Monograph on Australian Lepidoptera, Collingwood, CSIRO 4: 164–199.
- Schlötterer C, Hauser M, Haeseler A, Tautz D (1994) Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila*. mol. biol. evol. 11(3):513-522.
- Shinohara ML, LoBuglio KF, Rogers SO. Comparison of ribosomal DNA ITS regions among geographic isolates of *Cenococcum geophilum*. Curr Genet. 1999 Jun;35(5):527-35.
- Silva CCM (2013) Associação de *Cotesia flavipes* (Cam.) com *metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill no controle da broca da cana-de-açúcar *Diatraea flavipennella* (Box) (Lepidoptera: Crambidae)
- Solis MA (2006) key to selected pyraloidea (lepidoptera) larvae intercepted at u. s. ports of entry: revision of pyraloidea in “keys to some frequently intercepted lepidopterous larvae” by Weisman 1986. Department of Agriculture, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, D.C.
- Solis MA e Maes KVN (2002) Preliminary phylogenetic analysis of the subfamilies of Crambidae (Pyraloidea: Lepidoptera). Belgian Journal of Entomology 4: 53-95.

- Solis MA, Mitter C (1992) Review and phylogenetic analysis of the Pyralidae (sensu stricto) (Lepidoptera: Pyralidae) and placement of the Epipaschiinae. *Syst Ent.* 17, 79-90.
- Staden R (1996) The staden sequence analysis package. *Mol Biotechnol* 5:1596-1599.
- Tamura k, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA 5: Molecular evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731 – 2739.
- Van Nues RW, Rientjes JMJ, Morre SA, Mollee E, Planta RJ, Venema J, Raue HA (1995) Evolutionarily conserved structural elements are critical for processing of internal transcribed spacer 2 from *Saccharomyces cerevisiae* precursor ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.*, 250, 24–36
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10:506–513.
- Wan X, Li J, Kim MJ, Kang TH, Jin BR, Kim I (2011a) Population genetic structure of the migratory rice leaf roller, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae), inferred from the mitochondrial A+T-rich region and nuclear ITS2 sequences. *Genetics and Molecular Research* 10 (1): 273-294.
- Wan X, Li J, Kim MJ, Park HC, Kim S, Kim I (2011b) DNA Sequence Variation of the Tobacco Cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae), Determined by Mitochondrial A+T-rich Region and Nuclear ITS2 Sequences. *Biochem Genet*, 49:760–787.
- Wiemers M, Keller A, Wolf M (2009) ITS2 secondary structure improves phylogeny estimation in a radiation of blue butterflies of the subgenus *Agrodiaetus* (Lepidoptera: Lycaenidae: *Polyommatus*). *BMC Evolutionary Biology*, 9(300): 1 – 27.
- Wiemers M, Stradomsky BV, Vodolazhsky DI (2010) A molecular phylogeny of *Polyommatus* str. and *Plebiculabased* on mitochondrial COI and nuclear ITS2 sequences (Lepidoptera: Lycaenidae). *Eur. J. Entomol*, 107: 325–336.
- Yao H, Song J, Liu C, Luo K, Han J, et al. (2010) Use of ITS2 Region as the Universal DNA Barcode for Plants and Animals. *PLoS ONE* 5(10): e13102
- Zhang D (2004) Lepidopteran microsatellite DNA: redundant but promising. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 19(10): 507 – 509.
- Zomuanpuii R, Ringngheti L, Brindha S, Gurusubramanian G, Senthil Kumar N (2013) ITS2 characterization and Anopheles species identification of the subgenus *Cellia*. *Acta Trop*, 125(3):309-19.

Fonte da Internet:

Animal Diversity Web

<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/> (8 de novembro de 2013)

Capinera JL (2001) Sugarcane Borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae)

<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/files/IN/IN37400.pdf> (05 de março de 2013).

9. Anexos

Anexo 1 – Alinhamento da sequência ITS 2 das espécies *D. flavipennella* e *D. sacchralis*. As áreas cinzas do alinhamento representam os segmentos genômicos conservados entre as duas espécies de *Diatraea*. Os quadros vermelhos representam os segmentos genômicos conservados entre as demais espécies de Lepidoptera incluídas no trabalho. Os quadros azuis localizam as sequências microssatélites.

```

D._flavipe TTT-TTCGAA ACGGTG TGA CCGTTC CCT CCGACGT--T CCGTCGGT G AGTCGGTTTA AATATAT TAC ACGTGTGCT 80
D._flavipe .....
D._flavipe .....
D._flavipe .....
D._flavipe .....
D._sacchar ..CG..A... ..AT.A.AA. ....
|
D._flavipe CGA----- -----CCTT CATTCAAGT CGTT---GAC GCACGATAAT CTCGCGTATA CGTGAAAAGC 160
D._flavipe .....
D._flavipe .....
D._flavipe .....
D._flavipe .....
D._sacchar T..CGACGA CAACGAACGA ATGAAC.G.. .G..... .GTC. A..C.--- T..... .T....CA.
D._sacchar T..CGACGA CAACGAACGA ATGAAC.G.. .G..... .GTC... A...C.--- T..... .T....CA.
D._sacchar T..CGACGA CAACGAACGA ATGAAC.G.. .G..... .GTC... A...C.--- T..... .T....CA.
D._sacchar T..CGACGA CAACGAACGA ATGAAC.G.. .G..... .GTC... A...C.--- T..... .T....CA.
D._sacchar T..CGACGA CAACGAACGA ATGAAC.G.. .G..... .GTC... A...C.--- T..... .T....CA.
D._sacchar T..CGACGA CAACGAACGA ATGAAC.G.. .G..... .GTC... A...C.--- T..... .T....CA.
D._sacchar T..CGACGA CAACGAACGA ATGAAC.G.. .G..... .GTC... A...C.--- T..... .T....CA.
D._sacchar T..CGACGA CAACGAACGA ATGAAC.G.. .G..... .GTC... A...C.--- T..... .T....CA.

```

D._flavipe GTGACGCGTG TCGTTCCTGA TATAGAAAGC GACTCTTTGT GGATGCAAAA CTCTACTGGA GAGCGCGATA TATATCTGT 240
D._flavipe
D._flavipe
D._flavipe
D._flavipe
D._sacchar ..T..... .G...G AC.T..CGCG CTC.C.TCAC
D._sacchar ..T..... .G...G AC.T..CGCG CTC.C.TCAC
D._sacchaa ..T..... .G...G AC.T..CGCG CTC.C.TCAC
D._sacchra ..T..... .G...G AC.T..CGCG CTC.C.TCAC

D._flavipe TTCGAGTGAC TGACGATACG TGTCGATATA TATTATTAT TTTAA-----TAT ATATAGCGAG 320
D._flavipe
D._flavipe
D._flavipe
D._flavipe
D._sacchar C.----- .TG..G.GTT ..G.G.G.G .G.GTG.CC. .C...ACTCT ACTAGAGAGC GCTATGC... G..G..A.C.
D._sacchar C.----- .TG..G.GTT ..G.G.G.G .G.GTG.CC. .C...ACTCT ACTAGAGAGC GCTATGC... G..G..A.C.
D._sacchaa C.----- .TG..G.GTT ..G.G.G.G .G.GTG.CC. .C...ACTCT ACTAGAGAGC GCTATGC... G..G..A.C.
D._sacchra C.----- .TG..G.GTT ..G.G.G.G .G.GTG.CC. .C...ACTCT ACTAGAGAGC GCTATGC... G..G..A.C.
D._sacchra C.----- .TG..G.GTT ..G.G.G.G .G.GTG.CC. .C...ACTCT ACTAGAGAGC GCTATGC... G..G..A.C.
D._sacchra C.----- .TG..G.GTT ..G.G.G.G .G.GTG.CC. .C...ACTCT ACTAGAGAGC GCTATGC... G..G..A.C.
D._sacchra C.----- .TG..G.GTT ..G.G.G.G .G.GTG.CC. .C...ACTCT ACTAGAGAGC GCTATGC... G..G..A.C.

D._flavipe TTTACAGTTA CAC----GTT TGCAGA--GAGTAGGCGGAC TCGACGTCCG AAGAGGC---GCGGCGGCGT CGTCGTCGTA 400
D._flavipe
D._flavipe
D._flavipe
D._flavipe
D._saccharA...G ...ACGT.....TC.....GCG.....
D._saccharA...G ...ACGT.....TC.....GCG.....
D._sacchaaA...G ...ACGT.....TC.....GCG.....
D._sacchraA...G ...ACGT.....TC.....GCG.....
D._sacchraA...G ...ACGT.....TC.....GCG.....
D._sacchraA...G ...ACGT.....TC.....GCG.....
D._sacchraA...G ...ACGT.....TC.....GCG.....

D._flavipe GACGTGTCTG CGTC--GTCG TCGTCGTCGT CGTGCAGCTG ACGGATATCG TGCTGCCTC TAATTTATC G 471
D._flavipe
D._flavipe
D._flavipe
D._flavipe
D._sacchar ...T..... A-----
D._sacchar ...T..... A-----
D._sacchaa ...T..... ATC-----
D._sacchra ...T..... ATC-----
D._sacchra ...T..... A-----
D._sacchra ...T..... A-----
D._sacchra ...T..... A-----

Anexo 2

Protocolo para Extração de DNA pelo método Chelex® e Identificação das espécies *Diatraea flavipennella* e *D. sacchralis* usando o marcador molecular ITS 2.

Materiais usados para extração:

1. Tubos plásticos de 1,5 mL
2. Tubos plásticos de 0,2 mL
3. Amostra biológica
4. Pistilos
5. H₂O miliQ
6. Chelex® 100 (BioRad, Berkeley, California, USA) a 5%
7. Papel toalha
8. Rack para tubos
9. Centrífuga
10. Termociclador
11. Banho-maria
12. Pipetas
13. Ponteiras

Materiais usados para PCR:

1. Primers ITS 2
2. Tampão da Taq Polimerase
3. Taq Polimerase
4. dNTPs
5. DNA genômico
6. H₂O miliQ
7. MgCl₂
8. Termociclador
9. Pipetas
10. Ponteiras
11. Tubos de 0,2 mL
12. Os itens: 2, 3, 4 e 7 podem ser substituídos pelo Mix Go Taq Colorless (Promega® Fitchburg, Wisconsin, USA)

Preparação da solução de Chelex® 100 a 5%

10 ml de solução de Chelex® 100 a 5%:

Pesar 0,5 g de Chelex® 100 e diluir em 10 ml de água miliQ.

1.0 Se o material for de:

1.1 Ovo

1.1.1 Colocar o ovo inteiro com a ajuda de uma agulha de seringa de insulina em um tubo de 1,5 mL com 100 µL de Chelex® 100 5%.

1.2 Lagarta

1.2.1 Com a ajuda de uma tesoura fazer um corte na porção posterior do abdômen da lagarta e pressionando uma pinça da região cefálica até a região do corte até expor todas as vísceras. Colocar as vísceras em um tubo de 1,5 mL com 100 µL de Chelex® 100 5%.

1.3 Adulto

1.3.1 Com a ajuda de uma tesoura cortar a cápsula cefálica e colocá-la em um tubo de 1,5 mL com 100 µL de Chelex® 100 a 5%.

2.0 Macerar o material no interior do tubo até atingir a homogeneização.

3.0 Encubar o material em banho-maria a 54°C durante 1h.

4.0 Transferir as misturas de extração para um tubo de PCR e acondicioná-las no termociclador a 94°C durante 30 minutos.

5.0 Centrifugar a mistura a 13.000 rpm por 6 minutos.

6.0 Transferir o sobrenadante para um tubo de 1,5 mL e estocar a -20°C.

7.0 Reação de PCR ITS 2:

7.1 Parâmetros de ciclagem para o termociclador:

Desnaturação inicial		35 ciclos			Extensão final
Temperatura	95 °C	95°C	60°C	72°C	72°C
Tempo	3 min	30 seg	1 min	1 min	7 min

7.2 Mistura de reação:

7.2.1 Utilizando master mix

Soluções	Volume inicial/Concentração inicial
Mix Go Taq (Promega)	12,5 µL
H ₂ O mili Q	8,5 µL
Primer F	1,5 µL / 10 pmol
Primer R	1,5 µL / 10 pmol
DNA genômico	1,0 µL / 100 a 150 ng
Volume total	25 µL

7.2.2 Sem master mix

Reagentes	Concentração inicial	Volume (25 µL)
Primer F	10 mM	1,0 µL
Primer R	10 mM	1,0 µL
Tampão da Taq Polimerase	20 mM	2,5 µL
Taq Polimerase	5U/ µL	0,25 µL
dNTPs	8 mM	2,0 µL
DNA genômico	100 a 150 ng	1,0 µL
H ₂ O miliQ	-	16,5 µL
MgCl ₂	-	0,75 µL

8.0 Visualização em Gel de Agarose

Aplicar as amostras dos amplicons em gel de agarose a 3% e deixar as amostras correrem durante 1h. Usar DNA ladder para comparação do tamanho das bandas. Em seguida realizar a visualização em transluminador UV.

9.0 Identificação das espécies de *Diatraea*:

9.1 Bandas no gel acima de 600 pb: *Diatraea saccharalis*.

9.2 Bandas no gel entre 500 e 600 pb: *Diatraea flavipennella*.

10. Curriculum vitae (Lattes)

Marcos da Silveira Regueira Neto

Curriculum Vitae

Formação acadêmica/titulação

- 2012** Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Genética evolutiva e mapeamento cromossômico em duas espécies praga da cana-de-açúcar (Lepidoptera: Crambidae)
Orientador: Vilma Loreto da Silva
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco
- 2007 - 2011** Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Análise comparativa da localização de sítios de DNAr e Histona H3 em quatro espécies de Romaleidae (Orthoptera)
Orientador: Vilma Loreto da Silva
Bolsista do(a): Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação
- 2006 - 2007** Ensino Profissional de nível técnico .
SENAI - Departamento Regional de Pernambuco, SENAI/DR/PE, Recife, Brasil
-

Formação complementar

- 2013 - 2013** Extensão universitária em II Curso de Sequenciamento.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Citogenética Molecular Animal.
Universidade de Pernambuco, UPE, Recife, Brasil
- 2009 - 2009** Curso de curta duração em Técnicas Moleculares.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2009 - 2009** Biomarcadores do Câncer.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2008 - 2008** A Versatilidade das Lectinas: Purificação....
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Atualização em Fisiologia Endócrina.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2012 - Atual Vínculo: Aluno de Mestrado , Enquadramento funcional: Pesquisador, Regime: Dedicção exclusiva

Atividades

03/2010 - 11/2010 Graduação, Bacharelado em Ciências Biológicas

Disciplinas ministradas:

Monitor da disciplina de Citogenética para o curso de Bacharelado em Ciências Biológicas

04/2008 - 06/2009 Graduação, Biomedicina

Disciplinas ministradas:

Monitor do Departamento de Histologia e Embriologia, monitorando a disciplina de Histologia Geral

Projetos

Projetos de pesquisa
2010 - 2011 Análise comparativa da localização de sítios de DNAr e Histona H3 nos gafanhotos *Chromacris nuptialis* e *Xestotrachelus robustus* (Romaleidae)

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Marcos da Silveira Regueira Neto (Responsável); ;

2009 - 2010 Análise comparativa da localização de sítios de DNAr e Histona H3 em duas espécies de Romaleidae (Orthoptera).

Descrição: Análise comparativa dos sítios de DNAr e Histona H3. Para tal, é feita a extração de DNA dos espécimes para construção de sondas através do método de PCR. Essa sonda será hibridizada nos cromossomos do espécime (FISH) para posterior observação do número e localização dessas sequências.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Marcos da Silveira Regueira Neto; Vilma Loreto da Silva (Responsável)

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Projeto de extensão
2009 - Atual Ensino da genética: arte e diversão em prol do conhecimento

Descrição: Estimular nos alunos do ensino médio o interesse sobre temas voltados pra genética através de ferramentas que possam ser utilizadas em sala de aula. O projeto abrange escolas públicas e particulares do Recife.

Situação: Em andamento Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Graduação (5); Mestrado acadêmico (1); Doutorado (1);

Integrantes: Marcos da Silveira Regueira Neto; Vilma Loreto da Silva (Responsável)

Financiador(es): Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Prêmios e títulos

2011 Menção honrosa pela participação no Prêmio Sanae Kasahara com o trabalho

intitulado: Chromosomal location of ribosomal genes (18S and 5S) and histone H3 in two species of Romaleidae (Orthoptera), Comissão Organizadora da 2ª Reunião Brasileira de Citogenética - Sociedade Brasileira de Genética

2007 3º Lugar na Olimpíada do Conhecimento do SENAI PE em Química Industrial, SENAI

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **REGUERA NETO, MARCOS S**, DE SOUZA, MARIA JOSÉ, LORETO, VILMA
Chromosomal evolution of rDNA and H3 histone genes in representative Romaleidae grasshoppers from northeast Brazil. *Molecular Cytogenetics.* , v.6, p.41 - , 2013.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **REGUEIRA NETO, M. S.**, BARROS, R. P., Balbino, V. Q., LORETO, V.
ITS 2 as a suitable molecular marker for differentiation of two sugarcane moth borer species: *Diatraea saccharalis* and *Diatraea flavipennella* (Lepidoptera, Crambidae) In: Congresso Brasileiro de Genética, 2013, Águas de Lindóia.

Anais do Congresso Brasileiro de Genética. Editora SBG, 2013.

2. **REGUEIRA NETO, M. S.**, Maria José, LORETO, V.
Chromosomal mapping of ribosomal genes 18S and 5S in two species of Romaleidae grasshoppers In: 58º Congresso Brasileiro de Genética, 2012, Foz do Iguaçu.

58º Congresso Brasileiro de Genética. , 2012.

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **REGUEIRA NETO, M. S.**, LORETO, VILMA, CALIXTO, M. S.
III Curso de Práticas em Citogenética Animal, 2013. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

2. **REGUEIRA NETO, M. S.**, CALIXTO, M. S., LORETO, V.
II Curso de Inverno: Práticas em Citogenética Animal, 2012. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

3. **REGUEIRA NETO, M. S.**, CALIXTO, M. S., LORETO, V.
II Curso de Inverno: Práticas em Citogenética Animal, 2012. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Educação e Popularização de C&T

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras e olimpíadas

1. **REGUEIRA NETO, M. S.**, CALIXTO, M. S., LORETO, V.
II Curso de Inverno: Práticas em Citogenética Animal, 2012. (Outro, Organização de evento)

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **59 Congresso Brasileiro de Genética**, 2013. (Congresso) ITS 2 AS A SUITABLE MOLECULAR MARKER FOR DIFFERENTIATION OF TWO SUGARCANE MOTH BORER SPECIES: DIATRAEA SACCHARALIS AND D. FLAVIPENNELLA (LEPIDOPTERA, CRAMBIDAE).

Organização de evento

1. REGUEIRA NETO, M. S., CALIXTO, M. S., LORETO, V.
II Curso de Inverno: Práticas em Citogenética Animal, 2012. (Outro, Organização de evento)

2. REGUEIRA NETO, M. S., CALIXTO, M. S., Balbino, V. Q.
II Jornada de Pós-Graduação em Genética, 2012. (Congresso, Organização de evento)

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico.....	1
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	11

Produção técnica

Curso de curta duração ministrado (extensão).....	4
---	---

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	5
Participações em eventos (simpósio).....	1
Organização de evento (congresso).....	4
Organização de evento (outro).....	1