



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**SABRINA KELLY DOS SANTOS**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA E MOLECULAR DE**  
**POPULAÇÕES DE BICUDO DO ALGODOEIRO**

**CAMPINA GRANDE – PB**  
**2020**

**SABRINA KELLY DOS SANTOS**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA E MOLECULAR DE  
POPULAÇÕES DE BICUDO DO ALGODOEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias/Área de Concentração: Biotecnologia

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Liziane Maria de Lima**

**CAMPINA GRANDE**

**2020**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S237c Santos, Sabrina Kelly dos.  
Caracterização morfométrica e molecular de populações de bicudo do algodoeiro [manuscrito] / Sabrina Kelly dos Santos. - 2020.  
56 p. : il. colorido.  
Digitado.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2020.  
"Orientação : Profa. Dra. Liziane Maria de Lima, Embrapa Algodão."  
1. *Anthonomus grandis*. 2. ISSR. 3. Diversidade genética.  
4. Marcador morfométrico. I. Título

21. ed. CDD 633.51

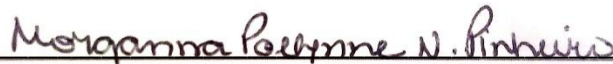
**SABRINA KELLY DOS SANTOS**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOMÉTRICA E MOLECULAR DE  
POPULAÇÕES DE BICUDO DO ALGODOEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias/Área de Concentração: Biotecnologia

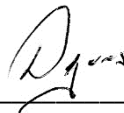
**Aprovada em: 28 de fevereiro de 2020**

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Morganna Pollynnne Nóbrega Pinheiro (D. Sc., Biotecnologia)  
Faculdade Maurício de Nassau  
Examinador



---

Dr. Carlos Alberto Domingues da Silva (D. Sc., Entomologia) – Embrapa Algodão  
Examinador



---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Liziane Maria de Lima (D. Sc., Biologia Molecular) – Embrapa Algodão  
Orientadora

Ao senhor meu Deus, a Nossa Senhora de Aparecida.  
À minha família, em especial ao meu esposo e a minha avó.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me abençoado e guiado meus passos.

À minha avó, Antônia Maria dos Santos, que me criou como filha e que sempre me apoiou.

Aos meus irmãos, Belmir Júnior e Bruno Sávio, por todo amor e amizade.

Ao meu esposo, meu amigo, companheiro, que tanto amo, Daniel da Silva Gomes, pela paciência, amor e dedicação.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Liziane Maria de Lima, pela orientação e paciência.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão: Marília Morais, Bárbara Belchior, Carliane Rebeca, Daniela Duarte, Aline Dayanna, Fátima Caetano, Allef Barbosa, Jean Pierre, Matheus Santos, Giliard Bruno, José Edson e Damião Queiroz pela companhia diária, ensinamentos e momentos de descontração em meio as dificuldades.

À Geisenilma Maria pela ajuda nas análises dos dados.

As técnicas do Laboratório de Biotecnologia Fábria Suely e Terezinha Duarte pela paciência e ajuda.

Aos companheiros da turma 2018 do Mestrado em Ciências Agrárias da UEPB: Auta Paulina, Raphael Jovino, Bruna Laís, Djailton, Jucelino, Jutahy Jorge, Rayanne, Samuel, Valdeir, Joan, Larissa, Luana, Vanderléia e Bruna Cavalcante.

As minhas amigas Maria Aline, Aline Mayara, Ivamberta Alves, Luana Santos e a minha linda afilhada, Layse Vitória.

À Embrapa Algodão, a CAPES, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias (PPGCA) da UEPB e a todos os professores.

À todos que contribuíram de alguma forma para essa conquista, meu muito OBRIGADA!

## RESUMO

SANTOS, SABRINA KELLY. Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, Fevereiro, 2020. **Caracterização morfométrica e molecular de populações de bicudo do algodoeiro.** Liziane Maria de Lima.

No território brasileiro, o algodoeiro é uma das principais culturas agrícolas, contudo, tem como obstáculo a presença do bicudo, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), a principal praga desta cultura, que ao atacar os botões florais e as maçãs, ocasiona a diminuição da produção. Os estudos morfométricos juntamente com o uso de marcadores moleculares podem auxiliar o entendimento da diversidade genética dentro e entre diferentes populações de espécies vegetais e animais, e conseqüentemente implementar um manejo integrado de pragas mais eficaz. O presente trabalho teve por objetivo avaliar morfometricamente e por meio de marcadores moleculares a dissimilaridade entre dez populações de bicudo. As populações de bicudo foram provenientes de diferentes localidades do Brasil. As medições morfométricas e os ensaios moleculares foram realizados nos Laboratórios de Entomologia e de Biotecnologia, respectivamente, ambos localizados na Embrapa Algodão, na cidade de Campina Grande, PB. Foram selecionados cinquenta bicudos de cada população, fotografados com câmera de 13 mega pixels acoplada a um microscópio estereoscópico, as imagens foram transferidas para um computador e as medições das estruturas físicas dos insetos foram realizadas no *Software Image J*. Para a caracterização molecular foi usado DNA genômico de quinze bicudos de cada população, previamente analisados quanto a morfometria. O DNA foi extraído pelo método CTAB e as reações de PCR foram conduzidas usando primers ISSR da Universidade da Columbia Britânica. Para análise dos dados morfométricos, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). Para os dados moleculares, as medidas de dissimilaridade foram obtidas pelo coeficiente de Nei e o agrupamento feito pelo método hierárquico UPGMA e de otimização de Tocher. Além disto, foi avaliado a correlação entre a distância genética e a distância geográfica em quilômetros (linha reta). Todos os dados foram analisados no *Software GENES*. A população de Chapadão do Sul apresentou médias superiores as demais populações em nove características, já a população de Campina Grande apresentou as menores em onze características avaliadas. A maior taxa de polimorfismo foi observada nas

populações de Ipiranga do Norte e Campina Grande, com porcentagem de 82% e 77%, respectivamente, e a menor taxa de polimorfismo foi encontrada na população de Primavera do Leste (30%). Pelo método de otimização de Tocher, três grupos foram formados e na análise de agrupamento UPGMA houve a formação de cinco grupos quando adotado o ponto de corte de 70%, o qual corresponde a distância genética de 0,320. A maior distância genética (0,525) coincidiu com a maior distância geográfica (2.289 km), entre as populações de Campina Grande e Ipiranga do Norte. Com base nas características morfométricas e na avaliação com marcadores ISSR, é possível inferir que há variabilidade genética entre e dentro das populações de bicudos de diferentes localidades do Brasil. Os resultados obtidos neste trabalho fornecem informações de diferentes populações de bicudo do algodoeiro, contribuindo assim, no desenvolvimento e/ou aprimoramento de um manejo mais eficiente dessa praga.

**Palavras-chave:** *Anthonomus grandis*. diversidade genética. ISSR. marcador morfométrico.



## ABSTRACT

SANTOS, SABRINA KELLY. Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão. February, 2020. **Morphometric and molecular characterization of cotton weevil populations.** Liziane Maria de Lima.

In Brazilian territory, cotton is one of the main agricultural crops, however, it has as an obstacle the presence of the weevil, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), the main pest of this crop, which when attacking flower buds and apples, causes a decrease in production. Morphometric studies together with the use of molecular markers can help to understand genetic diversity within and between different populations of plant and animal species and consequently implement more effective integrated pest management. The present work aimed to evaluate morphometrically and by means of molecular markers the dissimilarity among ten populations of boll weevil. The weevil populations came from different locations in Brazil. Morphometric measurements and molecular tests were performed at the Entomology and Biotechnology Laboratories, respectively, both located at Embrapa Cotton, in the city of Campina Grande, PB. Fifty weevils were separated from each population, photographed with a 13 mega pixel camera coupled to a stereoscopic microscopic, the images were transferred to a computer and measurements of the physical structures of the insects were performed using the Image J. Software. For molecular characterization, genomic DNA from fifteen weevil from each population was used, previously analyzed for morphometry. DNA was extracted by the CTAB method and PCR reactions were conducted using ISSR primers from the University of British Columbia. For analysis of morphometric data, the means were compared using the Scott-Knott test ( $P \leq 0.05$ ). For molecular data, the measures of dissimilarity were obtained by the Nei coefficient and the grouping done by the hierarchical method UPGMA and Tocher of optimization. In addition, the correlation between genetic distance and geographical distance in kilometers (straight line) was evaluated. All data were analyzed using the GENES Software. The population of Chapadão do Sul presented higher averages than the other populations in nine characteristics, whereas the population of Campina Grande presented the lowest in eleven evaluated characteristics. The highest rate of polymorphism was observed in the populations of Ipiranga do Norte and Campina Grande, with a percentage of 82% and

77%, respectively, and the lowest rate of polymorphism was found in the population of Primavera do Leste (30%). By Tocher of optimization method, three groups were formed and in the UPGMA cluster analysis, five groups were formed when the 70% cutoff point was adopted, which corresponds to the 0.320 genetic distance. Based on the morphometric characteristics and the evaluation with ISSR markers, it is possible to infer that there is genetic variability between and within the populations of weevil from different locations in Brazil. The results obtained in this work provide information on different populations of cotton weevils, thus contributing to the development and/or improvement of a more efficient management of this pest.

**Keywords:** *Anthonomus grandis*. genetic diversity. ISSR. morphometric marker.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Localidades brasileiras com plantação de algodão de onde foram coletados os bicudos.....26
- Tabela 2.** Sequência dos quinze oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pelo Laboratório de Biotecnologia da Universidade da Columbia Britânica (UCB)..... 30
- Tabela 3.** Resumo da análise de variância para as características morfométricas das dez populações de bicudo do algodoeiro. .... 34
- Tabela 4.** Teste de médias para as características morfométricas (mm) e a contribuição relativa dos caracteres para diversidade por meio da porcentagem dos componentes principais. Comprimento do protórax (CP); Largura da base do protórax (LBP); Largura máxima do protórax (LMP); Comprimento do élitro (CE); Largura da base do élitro (LBE); Largura máxima do élitro central (LMEC); Largura máxima do élitro final (LMEF) de dez populações de bicudo do algodoeiro; Largura do ápice do élitro (LAE); Comprimento do rostrum (CR); Largura do ápice do rostrum (LAR); Largura da base do rostrum (LBR); Comprimento total da cabeça (CTC); Comprimento total (CT). .... 35
- Tabela 5.** Classificação das populações quanto a coloração dos insetos..... 37
- Tabela 6.** Número de locus, porcentagem de bandas polimórficas (% Pol), heterozigosidade esperada (He) e coeficiente de correlação cofenética (CCC) dos iniciadores ISSR utilizados na caracterização das populações de bicudos do algodoeiro..... 38
- Tabela 7.** Agrupamento das populações de bicudo do algodoeiro pelo método de otimização de Tocher, a partir dos dados moleculares. .... 44
- Tabela 8.** Distâncias genéticas (Nei, 1972) obtidas por ISSR (acima da diagonal) e distâncias geográficas em km (abaixo da diagonal) entre dez populações brasileiras de *A. grandis*. População de: Barbalha (BAR), Rondonópolis (RO), Goiânia (GO), Chapadão do Sul (CS), Quixeramobim (QX), Ipiranga do Norte (IN), Campina grande (CG), Jataí (JÁ), Chapadão do Céu (CC), Primavera do Leste (PL). .... 46

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa do Brasil indicando os pontos de coleta de *A. grandis*. Barbalha (BAR), Quixeramobim (QX), Campina Grande (CG), Goiânia (GO), Jataí (JA), Chapadão do Céu (CC), Chapadão do Sul (CS), Ipiranga do Norte (IN), Rondonópolis (RO), Primavera do Leste (PL).....27
- Figura 2.** Medições realizadas nos insetos: comprimento do protórax (1), largura da base do protórax (2), largura máxima do protórax (3), comprimento de élitro (4), largura da base do élitro (5), largura máxima do élitro-central (6), largura máxima do élitro-final (7), largura do ápice do élitro (8), comprimento total da cabeça (9), comprimento total (10), comprimento do rostrum (11), largura do ápice do rostrum (12) e largura da base do rostrum (13). Fonte: adaptado de Jimenez et al. (2018). .....28
- Figura 3.** Uma amostra de bicudo do algodoeiro de cada população, na qual é possível identificar a diversidade fenotípica dos mesmos. Foto: Sabrina Santos.....36
- Figura 4.** Dendrograma da população de Barbalha obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população. ....39
- Figura 5.** Dendrograma da população de Rondonópolis obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população. ....39
- Figura 6.** Dendrograma da população de Goiânia obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população. ....40
- Figura 7.** Dendrograma da população de Chapadão do Sul obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população. ....40
- Figura 8.** Dendrograma da população de Quixeramobim obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população. ....40
- Figura 9.** Dendrograma da população de Ipiranga do Norte obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população. ....41

- Figura 10.** Dendrograma da população de Campina Grande obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população. ....41
- Figura 11.** Dendrograma da população de Jataí obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população. ....41
- Figura 12.** Dendrograma da população de Chapadão do Céu obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população. ....42
- Figura 13.** Dendrograma da população de Primavera do Leste obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população. ....42
- Figura 14.** Reprodutibilidade do padrão de bandas. A- primeiro gel de agarose com o oligonucleotídeo UBC 878 e o DNA da população de bicudos de Jataí, GO; B- segundo gel de agarose com o oligonucleotídeo UBC 878 e o DNA da população de bicudos de Jataí, GO. M- marcador 100 pb (Norgem Biotek).....43
- Figura 15.** Reprodutibilidade do padrão de bandas. A- primeiro gel de agarose com o oligonucleotídeo UBC 878 e o DNA da população de bicudos da população de Chapadão do Sul, MS; B- segundo gel de agarose com o oligonucleotídeo UBC 878 e o DNA da população de bicudos da população de Chapadão do Sul, MS. M- marcador 100 pb (Norgem Biotek). .43
- Figure 16.** Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. População Barbalha (1), Rondonópolis (2), Goiânia (3), Chapadão do Sul (4), Quixeramobim (5), Ipiranga do Norte (6), Campina Grande (7), Jataí (8), Chapadão do Céu (9) e Primavera do Leste (10). As letras indicam os cinco grupos formados entre as 10 populações analisadas..... 43
- Figura 17.** Teste de correlação de Mantel entre as matrizes de dissimilaridade dos dados morfométricos e moleculares..... 45

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP - <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>	LAR - Largura do ápice do rostrum
BAR - Barbalha	LBE - Largura da base do élitro
CA - Citosina e Adenina	LBP - Largura da base do protórax
CTC - Comprimento total da cabeça	LBR - Largura da base do rostrum
CC- Chapadão do Céu	LMEC - Largura máxima do élitro-central
CCC - Coeficiente de correlação cofenética	LMEF - Largura máxima do élitro-final
CE - Comprimento de élitro	LMP - Largura máxima do protórax
CG - Campina Grande	MgCl <sub>2</sub> - Cloreto de magnésio
CP - Comprimento do protórax	NaCl - Cloreto de sódio
CR - Comprimento do rostrum	PCR - <i>Polymerase chain reaction</i>
CS - Chapadão do Sul	PL - Primavera do Leste
CT - Comprimento total	Pol - Polimorfismo
CTBA - Brometo de cetiltrimetilamônio	PVP - Polifenolpirolidina
DNA - ácido desoxirribonucleico	QX - Quixeramobim
dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados	RAPD - <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> - Ácido desoxirribonucleico
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético	RFLP - <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
GA - Guanina e Adenina	RO - Rondonópolis
GO - Goiânia	rpm - rotação por minuto
He - Heterozigosidade esperada	SSR - <i>Simple Sequence Repeats</i>
IBA - Instituto Brasileiro do Algodão	TA - Timina e Adenina
IN - Ipiranga do Norte	Tris-HCl - Cloridrato de Tris
ISSR - <i>Inter Simple Sequence Repeats</i>	UPGMA - <i>Unweighted Pair Group Method</i>
JA - Jataí	
LAE - Largura do ápice do élitro	

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>2.1. Geral</b> .....	16
<b>2.2. Específicos</b> .....	16
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
<b>3.1. Origem e histórico da cultura do algodoeiro</b> .....	17
<b>3.2. Características do Gênero <i>Gossypium</i></b> .....	18
<b>3.3. Importância econômica e social da cultura do algodoeiro</b> .....	18
<b>3.4. Origem, histórico e classificação do bicudo do algodoeiro</b> .....	19
<b>3.5. Características gerais do <i>A. grandis</i></b> .....	20
<b>3.6. Morfometria de insetos</b> .....	22
<b>3.7. Marcador molecular</b> .....	23
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
<b>4.1. Localização do experimento</b> .....	26
<b>4.2. Populações de bicudo</b> .....	26
<b>4.3. Caracterização morfológica</b> .....	27
<b>4.4. Caracterização molecular</b> .....	29
4.4.1. Extração de DNA genômico.....	29
4.4.2. Reação de PCR-ISSR .....	29
4.4.3. Análises estatísticas .....	30
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	48
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	49

## 1. INTRODUÇÃO

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) é uma das principais espécies domesticadas pelo homem, produz a fibra, seu principal produto, e óleo, utilizado na alimentação humana e para produção de biodiesel (QUEIROZ et al., 2017). Trata-se de uma das *commodities* mais importantes para o Brasil, cuja produtividade aumentou em virtudes dos investimentos em pesquisas e tecnologias, proporcionando à cotonicultura autossuficiência no mercado interno e a retomada das exportações (FREIRE, 2015). Com a expansão da área cultivada com algodão no Brasil, que passou de 1.100,0 (mil ha) na safra de 2003/2004 para 1.618,2 (mil ha) na safra de 2018/2019 (CONAB, 2019), aumentaram também os problemas com pragas, havendo necessidade de aumentar os investimentos com insumos agrícolas, principalmente os inseticidas, o que eleva os custos de produção (FREIRE, 2015).

O algodoeiro é atacado por um complexo de pragas que apresentam elevada capacidade de reprodução e dispersão, e podem infestar todos os órgãos da planta (SANTOS, 2015). Os insetos-pragas podem ocasionar grandes prejuízos econômicos a lavoura de algodão, por causar perdas advindas do seu comportamento alimentar, acarretando a diminuição da produtividade. O gênero *Anthonomus* inclui várias espécies de importância agrícola, no entanto merece destaque o *A. grandis*, que ataca os botões florais e as maçãs do algodoeiro, reduzindo a produtividade e aumentando os custos da produção (SMITH-PARDO, 2015).

A presença do bicudo é identificada através de pequenas perfurações nos botões e maçãs durante a alimentação e oviposição das fêmeas (CAMPOS et al., 2019), além do mais, este inseto apresenta elevada capacidade de dispersão e por isto, é encontrado em diversas áreas de cultivo de algodão no Brasil. O Instituto Brasileiro do Algodão (IBA) tem auxiliado os produtores a combater o bicudo em praticamente todas as regiões produtoras de algodão no Brasil, sendo utilizado métodos culturais, químicos, entre outros (SANTOS, 2015).

A diversidade genética populacional de insetos-pragas pode ser compreendida através de características morfológicas, incluindo a morfometria geométrica e clássica (JIMENEZ et al., 2018) e/ou por marcadores moleculares, como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), DNA mitocondrial, microssatélites (SSR, *Simple Sequence Repeats*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), entre outros (KALIA et al., 2011).



Os estudos morfométricos utilizam técnicas biométricas que analisam características físicas dos seres vivos através de medidas de distâncias das estruturas biológicas (FORNEL et al., 2012), sendo utilizadas em estudos sobre variações da forma biológica e no entendimento comportamental populacional, na qual as análises morfológicas clássicas são baseadas em medidas como largura e comprimento. As medidas morfométricas são amplamente utilizadas juntamente com dados moleculares (OBER e CONNOLLY, 2015) permitindo assim a quantificação direta e análise da variação na forma biológica (HURTADO-BURILLO et al., 2016).

O marcador ISSR pertence à classe de multilocus, possui alta reprodutibilidade, boa cobertura do genoma e alto grau de variação genética, o que possibilita a estimativa da diversidade dentro de espécies (NG e TAN, 2015), assim, tornou-se um dos marcadores mais informativos e populares, sendo utilizados em diversas finalidades, como estudos de diversidade genética, mapeamento, melhoramento genético, sistemática e seleção assistida por marcadores (GHAFARI e HASNAOUI, 2013).

A caracterização da diversidade genética populacional de insetos-pragas pode auxiliar na elaboração de programas de controle mais eficientes, e o estabelecimento de técnicas que possibilitem o conhecimento de populações de insetos é de suma importância para auxiliar no manejo integrado de pragas (MIP). Com isto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar e avaliar por meio de descritores morfométricos e moleculares a dissimilaridade entre diferentes populações de bicudo do território brasileiro.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Analisar a variabilidade genética de populações de bicudo, oriundas de diferentes localidades brasileiras, por meio de marcadores morfométricos e moleculares.

### **2.2. Específicos**

- Caracterizar morfometricamente populações de bicudo de diferentes localidades por meio de medidas das estruturas físicas dos insetos.
- Analisar geneticamente a dissimilaridade entre diferentes populações de bicudo, por meio de marcadores ISSR, visando identificar a divergência entre eles.
- Avaliar a correlação entre os dados moleculares e morfométricos.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Origem e histórico da cultura do algodoeiro

Há indícios da existência de algodão cultivado séculos antes do nascimento de Cristo, por meio de vestígios do cultivo em regiões do Paquistão e do litoral norte do Peru, bem como através de artesanatos têxteis deixados pelos Incas, que vêm se reproduzindo até os dias atuais (AMIPA, 2018). A palavra algodão deriva de *al-quTum*, na língua árabe, já que foram os árabes que expandiram o cultivo desta planta pela Europa, através da comercialização, e a partir disto, vários outros vocábulos surgiram, como *cotton*, em inglês; *coton*, em francês; *cotone*, em italiano; *algodón* em espanhol e algodão em português (SÁ, 2016).

As escrituras antigas apontam que a Índia era a região central do algodão, e que Egito, Sudão e Ásia Menor utilizavam como produto substancial (AMIPA, 2018). No século XVIII, com o desenvolvimento de máquinas de fiação, a tecelagem passou a se expandir cada vez mais no mercado mundial de fios e tecidos, e em 1792, os Estados Unidos passaram a ser grandes produtores do algodão com a invenção do descaroçador, elaborado por Eli Whitney, sendo esta máquina capaz de separar mecanicamente as sementes das fibras (SÁ, 2016).

Mesmo antes da descoberta do Brasil, os índios já utilizavam o algodão no processo de plantar, colher, fiar, tecer e tingir, além de utilizá-lo na confecção de materiais usados em seu dia-a-dia, como redes e cobertores, na alimentação e de forma medicinal, onde as folhas serviam para curar feridas (NASCIMENTO, 2014). A produção comercial no Brasil teve início em 1760 no Nordeste brasileiro, sendo o Maranhão o maior produtor com plantios do algodão arbóreo de fibras longas, já o plantio do algodão herbáceo de fibra mais curta se concentrou, no estado de São Paulo, que por sua vez, se firmou como grande polo produtor até a safra 1978/1979, sendo superado pelo Paraná, na safra seguinte (AMPA, 2012).

No início do século XX, esta cultura proporcionou ao estado da Paraíba desenvolvimento econômico, cultural, política e social, principalmente na cidade de Campina, quando foi observado que a produção de algodão transportada pelos tropeiros, que eram comerciantes que em mulas faziam o transporte de alimentos entre regiões, poderia ficar em solo paraibano (OLIVEIRA, 2007). Assim, Campina Grande se tornou um grande centro de exportação, chegando a ser o segundo maior polo de exportação do mundo, ficando atrás apenas de Liverpool, na Inglaterra. Com isto, Campina Grande ficou conhecida como " Liverpool brasileira " e o algodão ficou conhecido como "ouro branco".

### 3.2. Características do Gênero *Gossypium*

O gênero *Gossypium* pertence à família Malvaceae e ordem Malvales, podendo ser dividido em cultivado e silvestre, na qual se destacam em relação ao cultivo o *G. hirsutum* L., *G. barbadense* L., *G. arboreum* L. e *G. herbaceum* L. (EGBUTA et al., 2017). A domesticação dessas quatro espécies ocorreu em diferentes regiões do mundo: *G. arboreum* na Índia e no Paquistão; *G. herbaceum* na Arábia e Síria; *G. barbadense* na América do Sul; e *G. hirsutum* na Mesoamérica (D'EECKENBRUGGE e LACAPE, 2014). Dentre essas, destaca-se *G. hirsutum*, que possui dois principais produtos: a fibra, com variadas aplicações industriais, e o óleo, utilizado na alimentação e produção de energia (HENRIQUE e LACABUENDÍA, 2010).

O *G. hirsutum*, também é conhecido como "algodão de terras altas, americano ou mexicano", sendo o mais cultivado dentre todas as espécies de algodão (LIU et al., 2013), já as outras espécies são raramente cultivadas fora das suas áreas de origem devido as dificuldades de se adaptarem a diferentes condições climáticas (WU et al., 2005). Essas espécies variam no que diz respeito a qualidade da fibra, que por sua vez, é definido pelo comprimento, maturidade, resistência e *micronaire* (EGBUTA et al., 2017).

### 3.3. Importância econômica e social da cultura do algodoeiro

A cotonicultura é uma das atividades de maior interesse econômico do mundo, já que a planta pode ser aproveitada de várias formas, seja no mercado têxtil, alimentar, farmacêutico, oleoquímico, entre outros (FREIRE, 2015). No Brasil, a estimativa da produção de algodão em caroço foi de 4.081,1 (mil t) (CONAB, 2019). Dentre as regiões brasileiras, a região Centro-Oeste apresentou a maior área plantada de algodão na safra 2018/2019, com 1.172,2 (mil ha) e produção de 2.094,4 (mil t), destacando-se o estado de Mato Grosso, com a área plantada de 1.092,8 (mil ha) e produção de 2.723,7 (mil t); já na região nordeste, a Bahia foi o estado que apresentou a maior área plantada com algodão (332 mil ha), com produção de 869,4 (mil t), enquanto que o estado da Paraíba apresentou uma área plantada de 0,7 (mil ha) e produção de 0,5 (mil t) (CONAB, 2019).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de algodão, ao lado de países como Índia, EUA, China e Paquistão (ABRAPA, 2019), e a estimativa da produção para a safra de 2019/2020 é de 4.093,5 (mil t) (CONAB, 2019), sendo, portanto, uma grande potência mundial na produção de fibras. Dessa forma, o escoamento dessa *commoditie* agrícola é de fundamental importância para o avanço socioeconômico do país (NASCIMENTO, 2014).

A cotonicultura brasileira se apresenta de duas formas, uma engloba o sistema de produção que ocorre nos cerrados, onde estão os grandes produtores que utilizam manejo extensivo e tecnificado, e a outra engloba o sistema de produção do semiárido, onde estão os médios e pequenos produtores, que não tem acesso fácil a tecnologias e ainda possuem problemas climatológicos e fitossanitários, o que acabam elevando o custo de produção (FREIRE, 2011). Os agricultores familiares do semiárido brasileiro têm utilizado cultivares de algodão com ciclo precoce, adaptadas as condições edafoclimáticas locais, com fibra colorida e com alto teor de óleo (VIDAL NETO e FREIRE, 2013).

### **3.4. Origem, histórico e classificação do bicudo do algodoeiro**

O bicudo do algodoeiro foi descrito por C. H. Boheman em 1843 como *Anthonomus grandis* a partir de um inseto adulto coletado por volta de 1835, sendo chamado de “Veracruz”, até então, com nenhum hospedeiro registrado (BASTOS e ALMEIDA, 2005). Alguns relatos indicam que sua origem é das zonas costeiras de Vera Cruz, no México, através de uma expedição patrocinada pelo entomologista francês Chevrolat (GABRIEL, 2016), mas rapidamente se disseminou para região Sul e Norte dos Estados Unidos (AZAMBUJA e DEGRANDE, 2014).

Este inseto foi encontrado na América do Sul, pela primeira vez, em 1949, na Venezuela, e em seguida, na Colômbia, no ano de 1950 (TOMQUELSKI e MARTINS, 2008). No Brasil sua presença foi confirmada pela primeira vez em 1983 (HABIB e FERNANDES, 1983), na região Sudeste, próximo ao aeroporto de Viracopos, Campinas-SP, onde havia um cultivo de algodão (DEGRANDE et al., 2004). Em quase 40 anos, este inseto se disseminou rapidamente para várias regiões do Brasil, devido as condições climatológicas favoráveis, se tornando a principal praga da cultura algodoeiro (PAULA et al., 2013). Ainda no ano de 1983, foi constatado a sua presença na região Nordeste, mais precisamente nas cidades de Campina Grande-PB (DEGRANDE et al., 2004; SILVA, 2012).

Estudos indicam que esta praga entrou no Brasil nessas duas cidades devido a ocorrência simultânea e a alta densidade das populações (DEGRANDE, 2006). De acordo com Bastos e Almeida (2005), dois anos após a chegada do bicudo, houve uma redução de 48% na área colhida de algodão no Brasil. Conforme Azambuja e Degrande (2014), os estados brasileiros nos quais foram detectados a presença do bicudo em lavouras de algodão são: Bahia, Ceará, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraná, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e São Paulo.

O bicudo pertence a ordem Coleoptera, família Curculionidae, subfamília Curculioninae, tribo Anthonomini e gênero *Anthonomus*, sendo essa família bastante diversa e complexa com mais de 800 espécies descritas em 43 gêneros (ALONSO-ZARAZAGA e LYAL, 1999). O gênero *Anthonomus* tem uma distribuição cosmopolita, com aproximadamente 500 espécies descritas, com a maior parte encontrada no México e na América Central (SMITH-PARDO, 2015).

Encontram-se descritas cerca de 35 famílias de plantas hospedeiras da tribo Anthonomini, incluindo espécies de importância agrícola (HERNÁNDEZ et al., 2013), dentre elas, o algodoeiro (GABRIEL, 2002a). Além de atacar a cultura do algodão, o bicudo também ataca outras espécies de plantas, que são chamadas de hospedeiros alternativos, já que são responsáveis pela sua sobrevivência no período de entressafra do algodão, como por exemplo *Hibiscus tiliaceus*, *H. rosa-sinensis*, *H. schizopetalus*, *Malvaviscus arboreus*, *Abutilon striatum* (GABRIEL, 2002a), *H. sabdariffa*, *Abelmoschus esculentus*, *H. syriacus* e *Tespesia populnea* (GABRIEL, 2002b). A associação do bicudo com outras espécies permitiu a expansão geográfica para além de seu centro de origem, bem como proporcionou que o inseto atingisse o status de praga da cultura do algodão (SHOWLER, 2009).

### 3.5. Características gerais do *A. grandis*

Os ovos do bicudo possuem coloração branca brilhante, medem cerca de 0,8 mm de comprimento por 0,5 mm de largura, elípticos e são depositados individualmente (TOMQUELSKI e MARTINS, 2008), após 3 a 4 dias da postura as larvas eclodem (GABRIEL, 2016).

As larvas são brancas, apresentam a cabeça marrom-clara e ficam encurvadas dentro dos botões florais, quando se desenvolvem apresentam entre 5 e 7 mm de comprimento (TOMQUELSKI e MARTINS, 2008), passam entre 7 e 12 dias se alimentando e em seguida se transformam em pupa (GABRIEL, 2016).

As pupas possuem coloração branca e pode-se observar indícios dos olhos e rostrum do futuro adulto (TOMQUELSKI e MARTINS, 2008). Utilizam as estruturas da planta como habitat, permanecendo nesta fase entre 3 e 5 dias, para depois se transformarem em adultos (GABRIEL, 2016).

O adulto do *A. grandis* é um besouro que mede de 4 a 9 mm de comprimento, e sobre seus élitros é possível observar estrias ou sulcos longitudinais, bem como pequenos e finos pelos dourados. Sua coloração pode variar de pardo-acinzentado, preto a castanho, e esta

variação ocorre devido à idade, alimentação do inseto, entre outros fatores. O ciclo biológico deste inseto está relacionado com a temperatura, e trata-se de um inseto lento ao caminhar, que raramente voa. Possuem um rostrum (bico alongado) escuro e na extremidade apical estão as peças bucais, e mais ou menos no centro do rostrum encontram-se as antenas (TOMQUELSKI e MARTINS, 2008; SILVA, 2012; AZAMBUJA e DEGRANDE, 2015; GABRIEL, 2016).

O bicudo possui reprodução sexuada e desenvolvimento holometabólico, ou seja, com metamorfose completa. A fêmea deposita seus ovos nos botões florais, flores e maçãs, contudo, a oviposição e alimentação ocorrem geralmente em botões florais com tamanho entre 4 e 6 mm de diâmetro e têm como preferência alimentar maçãs com dois dias de idade (BUSOLI et al., 2004; AZAMBUJA e DEGRANDE, 2015; GABRIEL, 2016).

A maior parte dos danos causados ao algodoeiro ocorre no meio e em porções superiores do dossel da planta. Sua presença é identificada através de pequenas perfurações nos botões florais durante a alimentação e oviposição das fêmeas, e pela separação das brácteas dos botões florais, causando o amarelecimento e queda dessas estruturas, mas ele também pode atacar maçãs novas, já que possuem superfície tenra, o que facilita sua alimentação (SHOWLER et al., 2005; GABRIEL, 2016; CAMPOS et al., 2019).

Os orifícios causados pela alimentação e oviposição podem chegar até 1 mm de diâmetro e profundidade variável, porém aqueles formados com alimentação podem ser mais largos e profundos que os de oviposição, sendo este último coberto por uma cera. Entre 5 a 8 dias após a oviposição, este inseto induz a abscisão das estruturas reprodutivas da planta, e quando não ocorre a abscisão, as estruturas reprodutivas afetadas não abrem adequadamente, causando, portanto, diminuição da quantidade e qualidade de fibra (SHOWLER, 2007; TOMQUELSKI e MARTINS, 2008; GABRIEL, 2016).

As medidas de controle do bicudo incluem o controle cultural, químico, destruição dos restos culturais do algodão, controle biológico, método de controle alternativo, entre outros, no entanto, os inseticidas são utilizados de forma intensa para combater este inseto-praga (MIRANDA e RODRIGUES, 2015; SANTOS, 2015). No estado do Mato Grosso, onde se concentra a maior produção de algodão no Brasil, são realizadas em média 15 aplicações específicas direcionadas ao bicudo-do-algodoeiro por safra, mas existem lavouras onde são necessárias até 27 aplicações (KLFF GROUP, 2016).

### 3.6. Morfometria de insetos

A morfometria é um método utilizado para distinguir variações na forma do corpo com base em pontos de referência, sendo, portanto, uma técnica eficaz para capturar informações sobre a forma e variabilidade dos organismos (TRIPPVALDEZ et al., 2012). Esta técnica permite a análise estatística multivariada das estruturas biológicas, considerando várias características da estrutura corporal (LORENZ e SUESDEK, 2013).

O método morfométrico se tornou amplamente conhecido e utilizado nos anos 90 (BOOKSTEIN, 1991; ROHLF e MARCUS 1993), tornando-se uma importante ferramenta de pesquisa para a biologia evolutiva e para o desenvolvimento de áreas afins (ADAMS et al., 2013). Os marcadores genéticos morfológicos foram os primeiros utilizados em estudos de biodiversidade e filogenética, e apesar das várias técnicas moleculares existentes, a morfometria ainda continua sendo utilizada (WANEK e STURMBAUER, 2015; TURCHETTO-ZOLET e ZANELLA, 2017).

As medidas morfométricas são utilizadas amplamente em abordagens que integram sistemática com dados moleculares (CASTAÑÉ et al., 2013), e quando os parâmetros são selecionados de forma correta, podem ser utilizados no estabelecimento da relação de dados filogenéticos, principalmente quando a espécie não é fácil de distinguir devido à falta de caracteres de diagnóstico (PRZYBYCIEN e WACLAWIK, 2015), além disso, as análises morfométricas são utilizadas na taxonomia, co-evolução e estudos filogenéticos de vários grupos de insetos (SÁNCHEZ-RUIZ e SAN MARTÍN, 2000).

O estudo da morfometria auxilia no processo de descrição de insetos imaturos (SILVA et al., 2006), na diferenciação sexual (SEFFRIN et al., 2006), no estudo da influência da distância geográfica sobre a morfologia de uma espécie (PIRES et al., 2008), na descrição de novas espécies e na distinção populacional dentro das espécies. Já em coleóptero, esta técnica é amplamente aplicada em estudos de biodiversidade e filogenética, podendo ser aplicada juntamente com técnicas moleculares (WANEK e STURMBAUER, 2015), bem como na condução de revisões taxonômicas, comparáveis às filogenias criadas a partir do DNA (JIMENEZ et al., 2018).

Um dos métodos de abordagem morfométrica é a morfometria clássica ou tradicional, que utiliza medidas lineares como comprimentos, larguras ou ângulos, calculadas ou tomadas a partir de estruturas ou partes de organismos (ROHLF e MARCUS, 1993). As ferramentas morfométricas apresentam a vantagem de apresentar resultados que possuem alto poder



estatístico e facilidade de visualização dos resultados, ajudando na sua interpretação (ZELDITCH et al., 2004).

Com o desenvolvimento dos métodos estatísticos e da morfometria houve o aprimoramento das ferramentas, tornando-as eficazes para estudos relacionados à variação da forma em populações animais (VISCOSI e CARDINI, 2011). As medidas morfométricas podem incluir comprimento do protórax, largura da base e máxima do protórax, comprimento do élitro, do pedicelo, do flagelo, do rostrum, largura do ápice e da base do rostrum (JIMENEZ et al., 2018), e formas das asas (LIMA JÚNIOR et al., 2014).

Variações das características morfológicas estão associados a diversos fatores, incluindo áreas geográficas, disponibilidade de recursos, qualidade nutricional, concorrência e temperatura (LAPARIE et al., 2010). Estas variações proporcionam o aumento da capacidade de sobrevivência, fecundidade, aptidão, densidade populacional e variedade de espécies (WHITMAN e AGRAWAL, 2009), e como consequência, o polimorfismo é evidente em insetos, em resposta a mudanças ambientais.

### **3.7. Marcador molecular**

É conhecido como marcador molecular todo fenótipo molecular proveniente de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA, que corresponde a uma região codificante ou não do genoma (FERREIRA e GRATAPAGLIA, 1998). Nos vegetais a maior parte das sequências é constituída por timina e adenina ou guanina e adenina, e nos animais por guanina e adenina, mas principalmente por citocina e adenina (JARNE e LAGODA, 1996). Os marcadores moleculares são ferramentas importante para estudos de genética populacional, biologia evolutiva, taxonomia e biologia da conservação, proporcionando a análise da diversidade e diferenciação genética de populações naturais (VAN OOSTERHOUT et al., 2004).

O desenvolvimento e uso de marcadores moleculares para a detecção e exploração do polimorfismo do DNA é um dos avanços mais significativos no campo da genética molecular (TURCHETTO-ZOLE e ZANELLA, 2017). De acordo com Jimenez et al., (2018), no âmbito genético, as diferenças na sequência de nucleotídeos podem ser estudadas com intuito de avaliar as relações evolutivas e a diversidade das espécies. A caracterização da diversidade genética de populações de insetos-pragas e dos fatores que favorecem essa diversidade é relevante para que possa ser elaborado programas de controles mais eficazes (MARTINS et al., 2007).

No final da década de 70 ocorreram os primeiros estudos com marcadores moleculares em populações de *A. grandis*, empregando isoenzimas (BANCROFT e JONES, 1977; TERRANOVA et al., 1991). Bartlett (1981) examinou 12 loci de enzimas e concluiu que *A. grandis thurberiae* Pierce, *A. grandis* Boheman e o bicudo do Arizona constituíam três conjuntos genéticos distintos com fluxo gênico restrito entre eles. Scataglini et al. (2000), utilizaram o RAPD para analisar diferentes populações de bicudo da América do Sul. Roehrdanz (2001) realizou estudos sobre a sistemática molecular em bicudos coletados nos Estados Unidos, utilizando RFLP e DNA mitocondrial (DNAMt) como marcador molecular, já Martins et al. (2007), utilizaram o marcador molecular RAPD para caracterizar a diversidade genética de populações de *A. grandis* de cinco estados brasileiros.

Estudos de diversidade genética em *A. grandis* são escassos e restritos às populações da América do Norte e Central (MARTINS et al., 2007), no entanto, a descoberta do DNA mitocondrial como marcador molecular, juntamente com o desenvolvimento da PCR (Reação em Cadeia da DNA Polimerase), proporcionou avanços nos estudos da biologia molecular e de genética de populações (ZHANG e HEWTIT, 1996).

Os marcadores de DNA podem ser classificados de acordo com o tipo de herança alélica em dominantes e codominantes, mas também podem ser divididos em três categorias principais: os baseados em hibridização, os baseados em PCR e os baseados em sequenciamento (TURCHETTO-ZOLE e ZANELLA, 2017). Os marcadores dominantes são aqueles onde indivíduos homozigotos e heterozigotos não podem ser distinguidos, por exemplo, AFLP (MARTÍNEZ-ORTEGA et al., 2004), RAPD e o ISSR (NG e TAN, 2015), já os marcadores codominantes identificam os indivíduos homozigotos e heterozigotos, como os marcadores microssatélites (TURCHETTO-ZOLE e ZANELLA, 2017). Para a maioria dos estudos de variabilidade genética, um bom marcador genético é aquele que apresenta a capacidade de gerar dados multilocus a partir do genoma em estudo (ANNE, 2006).

A PCR é um ensaio enzimático simples, rápido, que permite a amplificação de um fragmento de DNA específico a partir de um complexo de DNA (GARIBYAN e AVASHIA, 2013), permitindo assim, a caracterização genética de diversos vegetais e animais. O uso de marcadores amplificados por PCR proporciona algumas vantagens, como a facilidade de execução, uso de pouco material biológico e automação em larga escala (MITCHELLI-OLDS, 1995). O produto da reação é analisado através de eletroforese em gel de agarose, que separa os produtos com base no tamanho e na carga, sendo o método mais fácil de visualização.

Entre os marcadores baseados em PCR, há o RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), o ISSR (*Inter-simple sequence repeats*), o SSR (*Simple Sequence Repeats*), o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (TURCHETTO-ZOLE e ZANELLA, 2017), entre outros. O ISSR é um dos marcadores mais utilizados (BARAKAT et al., 2010), sendo uma técnica baseada em microssatélite, em que a amplificação é realizada com um único *primer* consistindo de várias repetições, além disto, se destaca por apresentar alto grau de polimorfismo e reprodução, não exigir um conhecimento prévio do genoma (TURCHETTO-ZOLE e ZANELLA, 2017) e apresentar baixo custo comparado ao uso de AFLP (NG e TAN, 2015).

A reprodutibilidade deste marcador ocorre pelo fato de serem utilizados *primers* mais longos para amplificação por PCR, quando comparado com RAPD, bem como a utilização de temperatura de anelamento mais altas na PCR (TURCHETTO-ZOLE e ZANELLA, 2017). Os mesmos autores afirmam que não são necessárias etapas demoradas e caras, além disto, este marcador, atualmente, é bastante utilizado em estudos de diversidade genética. Devido as estas características, o marcador ISSR tem sido bastante utilizado em vários estudos, principalmente naqueles sobre diversidade genética (WANG et al., 2012; SHAFIEI-ASTANI et al., 2015).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Localização do experimento

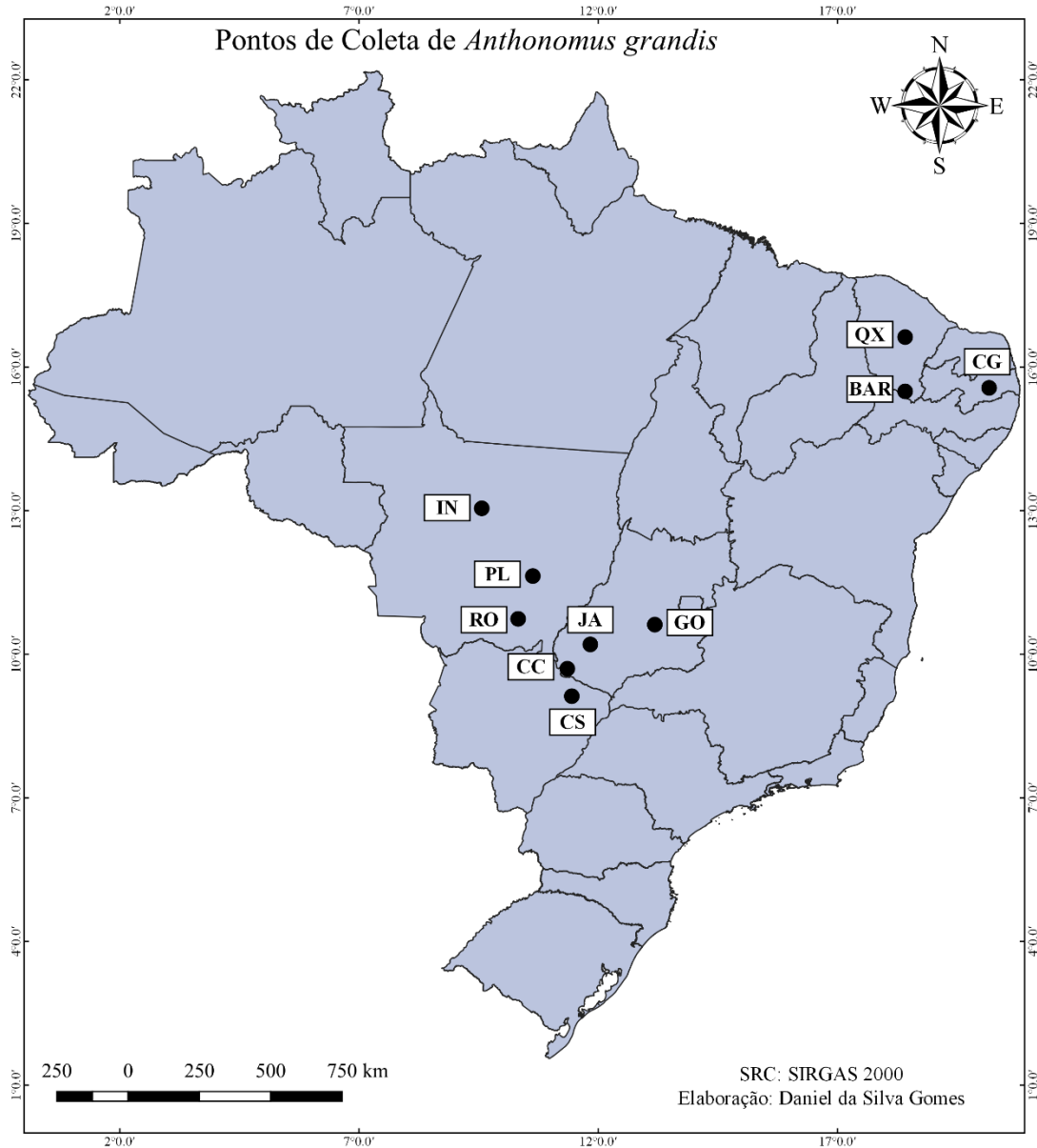
As medições morfométricas e os ensaios moleculares foram realizados nos Laboratórios de Entomologia e de Biotecnologia da Embrapa Algodão, respectivamente, situada na cidade de Campina Grande, PB, Brasil.

### 4.2. Populações de bicudo

As populações de bicudo foram provenientes de diferentes localidades do Brasil, onde há plantação de algodão. Na tabela 1 estão descritas as cidades em que houve coleta de bicudo com as respectivas coordenadas geográficas, e na figura 1 encontra-se o mapa do Brasil indicando os pontos de coleta das populações.

**Tabela 1.** Localidades brasileiras com plantação de algodão de onde foram coletados os bicudos.

<b>Cidade</b>	<b>Estado</b>	<b>Latitude</b>	<b>Longitude</b>
Barbalha	Ceará	7°17'54.99"S	39°18'8.76"O
Quixeramobim	Ceará	5°11'31.15"S	39°17'36.24"O
Campina Grande	Paraíba	7°13'46.52"S	35°52'54.75"O
Goiânia	Goiás	16°41'15.26"S	49°15'53.03"O
Jataí	Goiás	17°53'3.03"S	51°43'39.80"O
Chapadão do Céu	Goiás	18°23'41.64"S	52°39'55.27"O
Chapadão do Sul	Mato Grosso do Sul	18°47'39.60"S	52°37'9.09"O
Ipiranga do Norte	Mato Grosso	12°14'27.76"S	56° 9'8.87"O
Rondonópolis	Mato Grosso	16°27'55.71"S	54°38'19.40"O
Primavera do Leste	Mato Grosso	15°33'37.87"S	54°17'42.20"O



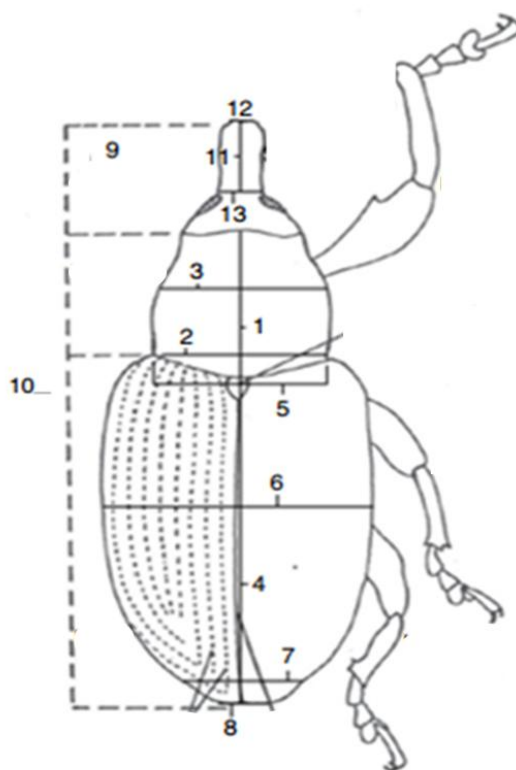
**Figura 1.** Mapa do Brasil indicando os pontos de coleta de *A. grandis*. Barbalha (BAR), Quixeramobim (QX), Campina Grande (CG), Goiânia (GO), Jataí (JA), Chapadão do Céu (CC), Chapadão do Sul (CS), Ipiranga do Norte (IN), Rondonópolis (RO), Primavera do Leste (PL).

#### 4.3. Caracterização morfométrica

Os insetos foram coletados manualmente de botões florais, conservados em álcool 70% e transportados até o local de análise. Estruturas foram montadas, para facilitar as medições morfométricas, com placas de isopor de 20 mm cobertas com papel milimetrado. Com o auxílio de uma pinça anatômica de dissecação, cinquenta bicudos foram selecionados aleatoriamente de cada população e fixados com alfinetes entomológicos sobre essas placas, e

posteriormente foram colocadas em estufa por 24 horas a 50°C para secagem e preservação dos insetos.

Após a secagem, os insetos foram observados em microscópio estereoscópico e fotografados por uma câmera digital *Opton* com 13 megapixels de resolução de imagem acoplada ao microscópio. As imagens foram transferidas para um computador com o *Software Image J* e a partir dele foram feitas as medições dos insetos: comprimento do protórax (CP), largura da base do protórax (LBP), largura máxima do protórax (LMP), comprimento de élitro (CE), largura da base do élitro (LBE), largura máxima do élitro-central (LMEC), largura máxima do élitro-final (LMEF), largura do ápice do élitro (LAE), comprimento total da cabeça (CTC), comprimento total (CT), comprimento do rostrum (CR), largura do ápice do rostrum (LAR), largura da base do rostrum (LBR) (JIMENEZ et al., 2018) (Figura 2). Além disso, a coloração de cada inseto foi registrada, sendo classificado como castanho, pardo-acinzentado e preto.



**Figura 2.** Medições realizadas nos insetos: comprimento do protórax (1), largura da base do protórax (2), largura máxima do protórax (3), comprimento de élitro (4), largura da base do élitro (5), largura máxima do élitro-central (6), largura máxima do élitro-final (7), largura do ápice do élitro (8), comprimento total da cabeça (9), comprimento total (10), comprimento do rostrum (11), largura do ápice do rostrum (12) e largura da base do rostrum (13). Fonte: adaptado de Jimenez et al. (2018).

#### 4.4. Caracterização molecular

##### 4.4.1. Extração de DNA genômico

Para a caracterização molecular, foi utilizado DNA genômico de quinze bicudos de cada população, escolhidos aleatoriamente dentre os cinquenta que haviam sido analisados morfometricamente. A extração ocorreu pelo método CTAB (FERREIRA e GATTAPAGLIA, 1998), com modificações nas etapas de centrifugação, na qual houve a diminuição do número de rotações por minuto e aumento do tempo, ao invés de ser utilizado 13200 rpm por 5/10 minutos, foi utilizado 12000 rpm por 10/15 minutos.

Após as análises morfométricas, os bicudos, foram armazenados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Cada animal foi individualmente macerado em um cadinho com auxílio de pistilo e adicionado 1 mL de tampão de extração (CTAB 2%; NaCl 1,4 M; EDTA 0,2 M; Tris HCl 0,1 M, pH 8,0; PVP 2%) e 10  $\mu\text{L}$  de proteinase K, em seguida o extrato foi aquecido a  $65^{\circ}\text{C}$  em banho-maria por 1 hora, com homogeneização a cada 10 minutos.

Depois de resfriado a temperatura ambiente foi adicionado em cada amostra 520  $\mu\text{L}$  de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1 v/v), em seguida houve homogeneização levemente por 1 minuto e os tubos foram submetidos à centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 1,5 mL, com os cuidados necessários para evitar contaminação entre as fases, e em seguida foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de acetato de amônio (7,5 mol/L) e 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol 100% (gelado), sendo homogeneizados levemente 20 vezes e deixado por 20 minutos descansando em temperatura ambiente.

As amostras foram submetidas à centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos, em seguida foi descartado o sobrenadante e o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol 70% (gelado), centrifugado por 10 minutos e depois descartado o sobrenadante. O precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 50  $\mu\text{L}$  de TE com RNase.

##### 4.4.2. Reação de PCR-ISSR

As reações de PCR foram conduzidas utilizando-se 30  $\eta\text{g}$  de DNA genômico, 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão da reação (10X), 1,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50  $\text{mMol.L}^{-1}$ ), 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (5  $\text{U.}\mu\text{L}^{-1}$ ) (*Ludwig Biotec*), 0,8  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10  $\mu\text{Mol.L}^{-1}$ ) e 2,0  $\mu\text{L}$  de oligonucleotídeo (10  $\text{mMol.L}^{-1}$ ) (Tabela 2), completando-se para o volume final para 25  $\mu\text{L}$  com água ultrapura autoclavada. A seleção dos oligonucleotídeos comerciais ISSR desenvolvidos pelo

Laboratório de Biotecnologia da Universidade da Columbia Britânica, ocorreu por meio de testes preliminares de amplificação com quarenta e dois oligonucleotídeos, e de acordo com os resultados foram selecionados quinze para este trabalho.

As reações foram conduzidas em termociclador *Amplitherm Thermal Cyclers*, com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C/5 min.; 40 ciclos de 95°C/1 min., 45°C/1 min., e 72°C/2 min. Uma extensão final foi adicionada à 72°C/5 min. Ao término das reações, as amostras foram mantidas a 4°C para posterior uso.

Aos produtos das reações foram adicionados 2,5 µL de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25% e sacarose 40%) e 2,5 µL de SYBR<sup>®</sup>*Gold (Invitrogen)*, posteriormente separados em eletroforese de gel de agarose (1,5%), usando o marcador LowRanger (100 pb, *Norgen Biotec*) como padrão e fotodocumentados no aparelho *UltraLum Eletronic UV Transilluminator* e *Kodak GEL Logic 200 Imaging System*.

**Tabela 2.** Sequência dos quinze oligonucleotídeos ISSR desenvolvidos pelo Laboratório de Biotecnologia da Universidade da Columbia Britânica (UCB).

Oligo	Sequência (5'→3')	Oligo	Sequência (5'→3')
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	846	CAC ACA CAC ACA CAC ART
816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT
817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	868	GAA GAA GAA GAA GAA GAA
818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	878	GGA TGG ATG GAT GGA T
825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	884	HBH AGA GAG AGA GAG AG
826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	888	BDB CAC ACA CAC ACA CA
827	ACA CAC ACA CAC ACA CG		

#### 4.4.3. Análises estatísticas

Para análise dos dados morfométricos, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $p \leq 0,05$ ) e foi realizada a análise de componentes principais. Para análise dos dados moleculares, as avaliações dos *amplicons* em gel de agarose cada banda foi considerada uma variável qualitativa, atribuindo-se o valor 1 na presença e 0 na ausência. Assim sendo, quando duas populações diferiram no mínimo em uma banda, foram consideradas diferentes. De posse desses dados foi construída uma matriz de 0 e 1 e a estimativa de similaridade genética (S<sub>gij</sub>) entre cada par de populações foi calculada pelo coeficiente de Nei (1972). Foi feito a análise de variância molecular (AMOVA), e o agrupamento pelo método hierárquico UPGMA e de otimização de Tocher (CRUZ e CARNEIRO, 2003).



Além disto, foi avaliado a correlação entre a distância genética (Nei, 1972) e a distância geográfica em quilômetros (linha reta) e foi feito uma correlação entre as matrizes de dissimilaridade pelo teste de Mantel e a significância pelo teste t. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico GENES versão 2018.5.3 (CRUZ, 2016).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise de variância constatou-se que houve significância para todas as características morfométricas avaliadas (Tabela 3). Os coeficientes de variação de todas as características se mantiveram dentro do que é considerado aceitável, ou seja, valores até 20%, o que indica homogeneidade dos dados (SANTOS et al., 2003). No agrupamento das médias das populações realizado pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, observa-se diferenças significativas entre elas, havendo a formação de diferentes grupos, evidenciando a variabilidade para todas as características morfométricas avaliadas (Tabela 4).

A média do comprimento total do bicudo do algodoeiro (7,72 mm) foi maior que a média de tamanho citada por Gabriel (2016), de 7 mm, porém, o valor encontrado neste trabalho foi próximo ao relatado por Almeida et al. (1997), que obtiveram uma média de 7,6 mm. A média da largura máxima do élitro central foi de 2,61 mm, valor este, superior ao relatado por Gabriel (2016), de 2,3 mm. A característica comprimento do protórax, no teste de média, revelou maior variabilidade entre as populações, formando sete grupos diferentes, e na análise dos componentes principais, conforme os critérios de Singh (1981), foi a terceira característica que mais contribuiu com a diversidade (9,66%). As outras características que mais contribuíram para a diversidade foram LAE (11,40%) e LAR (10,79%), e as características que menos contribuíram foram LBR (5,28%), LMEC (5,30%), LBP (5,34%), podendo estas três últimas serem descartadas em estudos posteriores.

Os dois primeiros componentes principais explicaram 90,12% da variação total. Esse resultado pode ser considerado bom, visto que, segundo Cruz e Regazzi (2001), variações totais acima de 80% obtidos com três primeiros componentes principais permitem a análise de grupos de genótipos utilizando gráficos de dispersão. A análise dos componentes principais, é uma análise multivariada que transforma de forma linear um conjunto original de variáveis, que inicialmente são correlacionadas entre si, em um conjunto menor de variáveis não correlacionadas que contém a maior parte da informação do conjunto original (HONGYU et al., 2016).

A população de Chapadão do Sul apresentou maiores médias em relação as demais populações em nove características, sendo elas: LBP, LMP, CE, LBE, LMEC, CR, LBR, CTC e CT. A cidade Chapadão do Sul se destaca como sendo um grande polo produtor de algodão do sul-mato-grossense, através do plantio direto e do uso de alta tecnologia, havendo, portanto, o cultivo em larga escala e a formação de um ambiente homogêneo, o que facilita a proliferação e desenvolvimento do inseto durante o ciclo da cultura. A latitude da cidade de

Chapadão do Sul foi a mais alta dentre as populações estudadas, e este fator pode ter influenciado no tamanho corporal dos insetos. De acordo com Tseng e Soleimani Pari (2019) as variações do tamanho do corpo de insetos podem sofrer influência da latitude, na qual, latitudes maiores tendem a ter insetos de tamanho maior, já latitudes menores tendem a ter insetos de tamanho menor.

A população de Campina Grande apresentou as menores médias em onze características avaliadas, provavelmente devido ao local de coleta dos insetos ter sido um local de experimentação, onde havia limitação de recursos alimentares. Conforme Blanckenhorn et al. (2011) insetos que possuem recursos alimentares limitados, apresentam menores tamanhos corporais, como forma de estratégia de adaptação ao local. Além disso, a cidade de Campina Grande, juntamente com as cidades de Quixeramobim e Barbalha possuíram as menores latitudes dentre as populações estudadas, e apresentaram as menores médias morfométricas em algumas características avaliadas, confirmando, portanto, que a latitude influencia diretamente no tamanho corporal dos insetos.

**Tabela 3.** Resumo da análise de variância para as características morfométricas das dez populações de bicudo do algodoeiro.

FV	GL	Quadrados médios												
		CP	LBP	LMP	CE	LBE	LMEC	LMEF	LAE	CR	LAR	LBR	CTC	CT
<b>Tratamento</b>	9	6,59**	1,09**	2,48**	4,50**	1,09**	1,68**	0,86**	0,24**	0,92**	0,05**	0,01**	1,10**	13,05**
<b>Resíduo</b>	490	0,018	0,023	0,020	0,129	0,030	0,057	0,075	0,006	0,056	0,001	0,001	0,083	0,389
<b>Média</b>		1,45	1,85	1,54	4,06	2,06	2,61	1,80	0,49	1,96	0,23	0,31	2,40	7,72
<b>CV(%)</b>		9,44	8,29	9,17	8,85	8,44	9,20	15,22	16,69	12,13	16,99	11,29	12,01	8,07

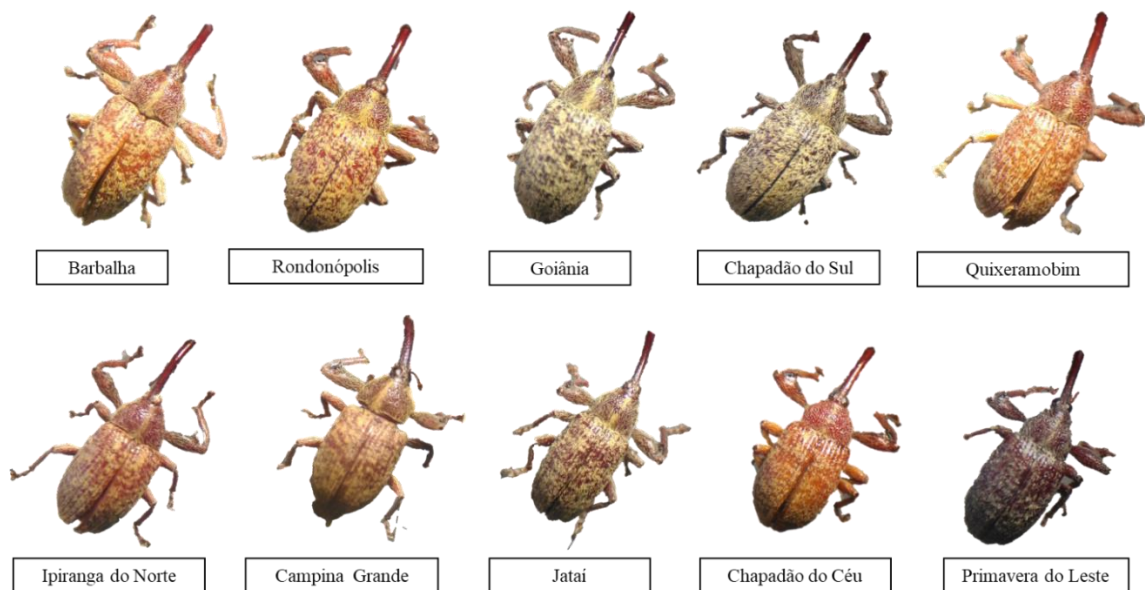
\*\*Significativo pelo teste de F ( $p \leq 0,01$ ). Fonte de variação (FV); Grau de liberdade (GL); Comprimento do protórax (CP); Largura da base do protórax (LBP); Largura máxima do protórax (LMP); Comprimento do élitro (CE); Largura da base do élitro (LBE); Largura máxima do élitro central (LMEC); Largura máxima do élitro final (LMEF); Largura do ápice do élitro (LAE); Comprimento do rostrum (CR); Largura do ápice do rostrum (LAR); Largura da base do rostrum (LBR); Comprimento total da cabeça (CTC); Comprimento total (CT).

**Tabela 4.** Teste de médias para as características morfométricas (mm) e a contribuição relativa dos caracteres para diversidade por meio da porcentagem dos componentes principais. Comprimento do protórax (CP); Largura da base do protórax (LBP); Largura máxima do protórax (LMP); Comprimento do élitro (CE); Largura da base do élitro (LBE); Largura máxima do élitro central (LMEC); Largura máxima do élitro final (LMEF) de dez populações de bicudo do algodoeiro; Largura do ápice do élitro (LAE); Comprimento do rostrum (CR); Largura do ápice do rostrum (LAR); Largura da base do rostrum (LBR); Comprimento total da cabeça (CTC); Comprimento total (CT).

População	CP	LBP	LMP	CE	LBE	LMEC	LMEF	LAE	CR	LAR	LBR	CTC	CT
<b>Barbalha</b>	1,302 e	1,918 b	1,677 b	4,081 c	2,055 c	2,628 c	1,760 c	0,405 d	1,945 b	0,191 c	0,321 c	2,450 b	7,712 d
<b>Quixeramobim</b>	1,241 f	1,841 c	1,665 b	3,804 d	1,964 d	2,557 c	1,715 c	0,406 d	1,797 c	0,201 c	0,311 d	2,229 c	7,275 e
<b>Campina Grande</b>	1,085 g	1,606 f	1,349 d	3,580 e	1,801 e	2,227 e	1,672 c	0,441 c	1,710 d	0,203 c	0,284 e	2,128 d	6,864 f
<b>Goiânia</b>	1,127 g	1,768 d	1,588 c	3,717 d	1,906 d	2,429 d	1,769 c	0,559 a	1,858 c	0,249 b	0,311 d	2,265 c	7,168 e
<b>Jataí</b>	1,857 c	1,716 e	1,238 e	4,023 c	2,039 c	2,597 c	1,753 c	0,578 a	1,988 b	0,275 a	0,308 d	2,409 b	7,650 d
<b>Chapadão do Céu</b>	1,960 b	1,777 d	1,283 e	4,268 b	2,143 b	2,690 c	1,957 b	0,569 a	2,085 a	0,273 a	0,312 d	2,510 a	8,019 c
<b>Chapadão do Sul</b>	1,368 d	2,140 a	1,880 a	4,543 a	2,286 a	2,891 a	1,918 b	0,464 c	2,087 a	0,258 b	0,347 a	2,539 a	8,520 a
<b>Ipiranga do Norte</b>	1,265 f	1,967 b	1,722 b	4,180 c	2,102 b	2,651 c	1,646 c	0,422 d	1,988 b	0,203 c	0,338 b	2,555 a	8,019 c
<b>Rondonópolis</b>	1,233 f	1,923 b	1,717 b	4,021 c	2,095 b	2,640 c	1,781 c	0,507 b	1,968 b	0,247 b	0,324 c	2,451 b	7,744 d
<b>Primavera do Leste</b>	2,058 a	1,860 c	1,348 d	4,381 b	2,247 a	2,791 b	2,054 a	0,550 a	2,101 a	0,265 a	0,326 c	2,530 a	8,259 b
<b>Componentes Principais (%)</b>	9,66	5,34	8,36	6,74	6,42	5,30	7,18	11,40	8,46	10,79	5,28	8,40	6,60

Populações seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

Fenotipicamente, os bicudos apresentaram diferenças no que diz respeito a coloração (Figura 3). Esta característica pode sofrer alterações conforme os hábitos alimentares, idade (TOMQUELSKI e MARTINS, 2008), fatores climáticos (HOCHKIRCH et al., 2008), estratégia de predação, termorregulação, escolha de microhabitat, estratégias reprodutivas (CIVANTOS et al., 2005), entre outros. Dos cinquenta insetos avaliados de cada população, todos da população de Barbalha e Rondonópolis apresentaram coloração castanho; a população de Chapadão do Sul foi constituída apenas por insetos de coloração pardo-acinzentado; as populações de Campina Grande e Primavera do Leste apresentaram os três tipos de coloração; já os insetos das populações de Goiânia, Quixeramobim, Ipiranga do Norte, Jataí e Chapadão do Céu apresentaram as colorações castanho e pardo-acinzentado (Tabela 5).



**Figura 3.** Uma amostra de bicudo do algodoeiro de cada população, na qual é possível identificar a diversidade fenotípica dos mesmos. Foto: Sabrina Santos.

**Tabela 5.** Classificação das populações quanto a coloração dos insetos.

População	Coloração		
	Castanho	Pardo-acinzentado	Preto
Barbalha	100%	-	-
Quixeramobim	86%	14%	-
Campina Grande	34%	52%	14%
Goiânia	94%	6%	-
Jataí	54%	46%	-
Chapadão do Céu	82%	18%	-
Chapadão do Sul	-	100%	-
Ipiranga do Norte	38%	62%	-
Rondonópolis	100%	-	-
Primavera do Leste	8%	72%	16%

Na estimativa realizada por marcadores moleculares, os maiores números de locus foram encontrados nas populações de Ipiranga do Norte (150) e Campina Grande (120) e o menor número de locus foi encontrado na população de Barbalha (66) (Tabela 6). A maior taxa de polimorfismo foi observada nas populações de Ipiranga do Norte e Campina Grande, com porcentagem de 82% e 77%, respectivamente, e a menor taxa de polimorfismo foi encontrada na população de Primavera do Leste (30%). Souza et al. (2008) analisou a diversidade genética em diferentes populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*, utilizando ISSR como marcador molecular, e obteve uma porcentagem de polimorfismo que variou de 74,51%, nas populações de Rio Branco e Paracatu, a 92,16% na população de Alta Floresta. Huala et al. (2018) ao analisar a diversidade genética de diferentes populações de *Aegorhinus superciliosus*, utilizando o marcador molecular ISSR, obtiveram uma porcentagem de polimorfismo de 100% em todos os oligonucleotídeos avaliados.

A heteroziguidade, que é uma das formas de representar o grau de diversidade de uma população, variou de 0,048 a 0,214. Ressalta-se que quanto maior o valor, maior a diversidade da população. Em trabalho realizado por Souza et al. (2008), os valores da heteroziguidade esperada em diferentes populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*, ao utilizar marcador molecular ISSR variaram de 0,271, na população de Paracatu, a 0,328, na população de Cruz das Almas. Quando se compara os dados obtidos neste trabalho com os da literatura, observa-se uma baixa heteroziguidade nas populações investigadas, que ocorreu provavelmente devido o bicudo não ser um inseto nativo do Brasil, introduzido a pouco tempo, cerca de 37 anos, quando comparado com a sua existência de quase dois séculos em outros países, como México e Estados Unidos. Martins et al. (2007), afirmam que valores baixos de heteroziguidade são esperados em populações de insetos invasores que foram recém-introduzidos no local. Conforme Kim e Sappington (2004), é comum encontrar

espécies introduzidas com baixos níveis de diversidade genética, pois a diversidade encontrada em áreas que foram recém-colonizadas são compostas por uma pequena parcela da diversidade genética existente nos centros de origem, devido ao efeito fundador.

O coeficiente de correlação cofenética (CCC) de cada população variou de 0,63 (população de Chapadão do Céu) a 0,83 (população de Barbalha). O CCC é uma medida de correlação entre os dados da matriz de dissimilaridade e os dados apresentados no dendograma, ou seja, verifica a significância do agrupamento (ORLANDIM et al., 2015). De acordo com Bussab et al. (1990), quanto mais próximos os valores à unidade, menor será a distorção provocada ao realizar o agrupamento entre os indivíduos. Foi realizada a partição da variação genética em dois níveis: dentro de populações e entre populações, por meio da AMOVA, na qual a variação genética dentro da população foi de 42,41% e a variação genética entre populações foi de 57,58%. Os valores de variação genética foram significativos ( $p < 0,001$ ) para as duas fontes de variação, com probabilidades calculadas por 1.000 permutações ao acaso, com o valor de diferenciação genética das populações ( $F_{ST}$ ) de 0,5759.

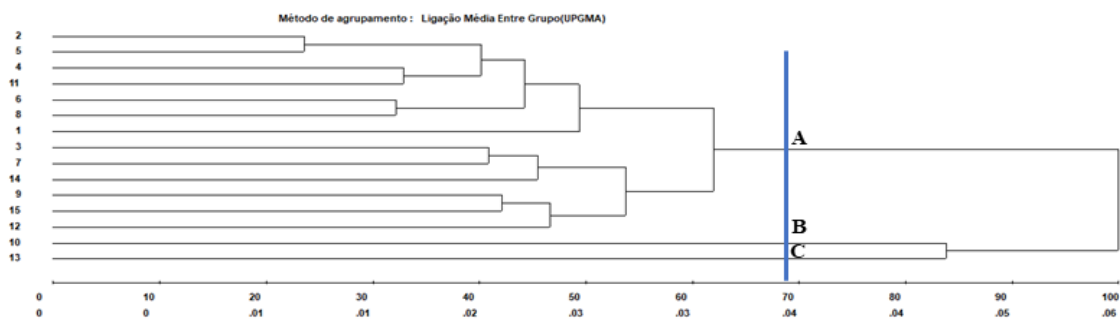
**Tabela 6.** Número de locus, porcentagem de bandas polimórficas (% Pol), heterozigidade esperada (He) e coeficiente de correlação cofenética (CCC) dos iniciadores ISSR utilizados na caracterização das populações de bicudos do algodoeiro.

População	Nº locus	% Pol	He	CCC
Barbalha	66	35%	0,055	0,83
Quixeramobim	79	56%	0,096	0,71
Campina Grande	120	77%	0,198	0,78
Goiânia	99	53%	0,104	0,65
Jataí	105	63%	0,145	0,81
Chapadão do Céu	76	43%	0,059	0,63
Chapadão do Sul	88	41%	0,081	0,65
Ipiranga do Norte	150	82%	0,214	0,76
Rondonópolis	95	51%	0,098	0,64
Primavera do Leste	77	30%	0,048	0,73

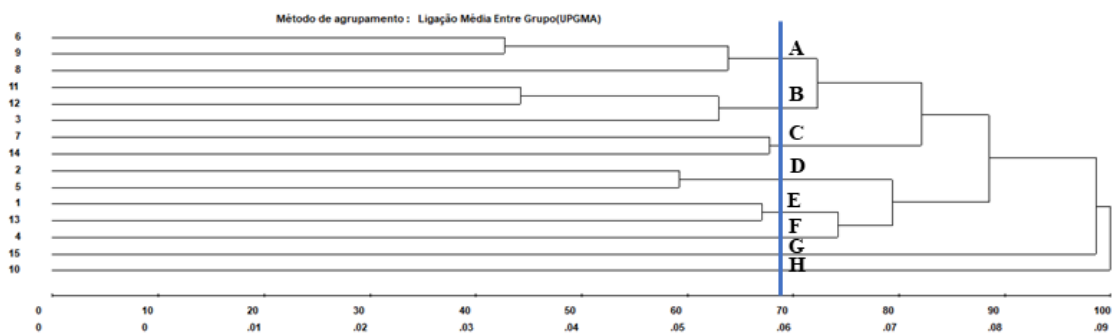
A partir das análises dos dendogramas é possível observar a variabilidade genética dentro de cada população (Figuras 4 a 13). Utilizando o método de Mojena (1977), com  $k = 1,25$ , adotou-se o ponto de corte de 70%, e observou-se a formação de: três grupos na população de Barbalha (Figura 4); oito grupos nas populações de Rondonópolis (Figura 5) e Quixeramobim (Figura 8); sete grupos nas populações de Goiânia (Figura 6), Ipiranga do Norte (Figura 9), Campina Grande (Figura 10) e Chapadão do Céu (Figura 12); dez grupos na população de Chapadão do Sul (Figura 7); quatro grupos na população de Jataí (Figura 11); e



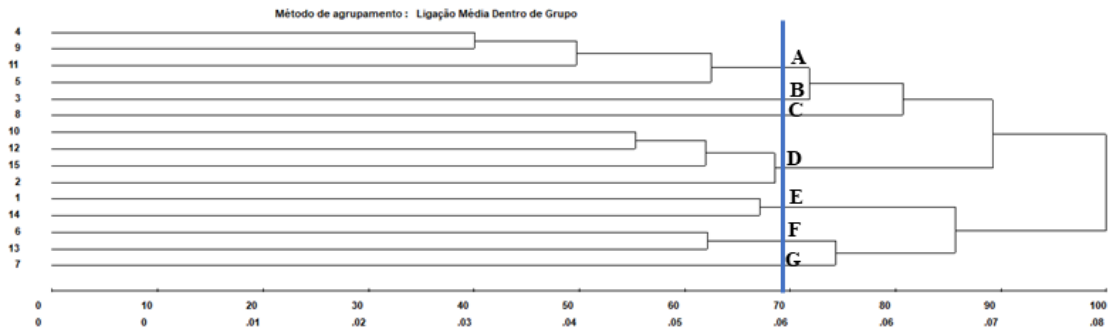
seis grupos na população de Primavera do Leste (Figura 13). O bicudo além de possuir o ciclo de vida curto, com média de cinco gerações por safra, possui também reprodução sexuada, desta forma, uma grande quantidade de indivíduos geneticamente diferentes são gerados em um pequeno espaço de tempo, ocasionando, portanto, variabilidade genética dentro das populações. De acordo com Reece et al. (2014) a junção dos fatores reprodução sexuada e ciclo de vida curto pode influenciar a variabilidade e o polimorfismo dentro das populações, já que uma maior quantidade de combinações gênicas ocorre quando os organismos se reproduzem de forma sexuada e tem ciclos de vida curto.



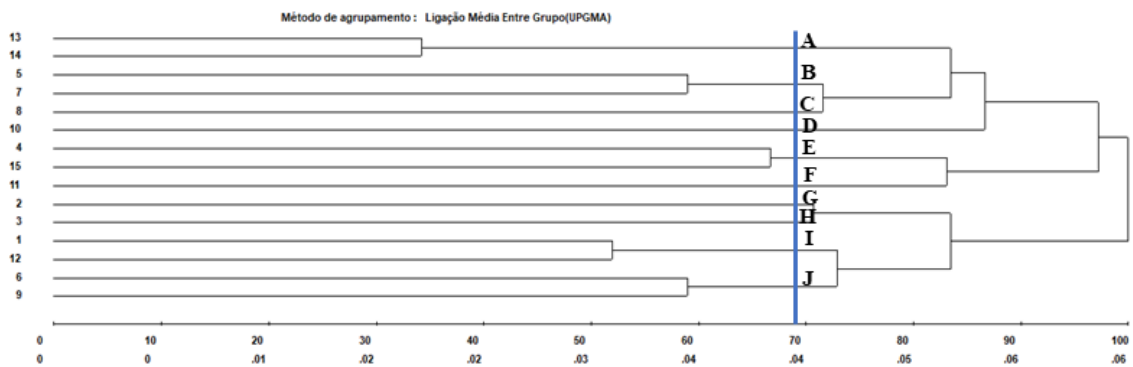
**Figura 4.** Dendrograma da população de Barbalha obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população.



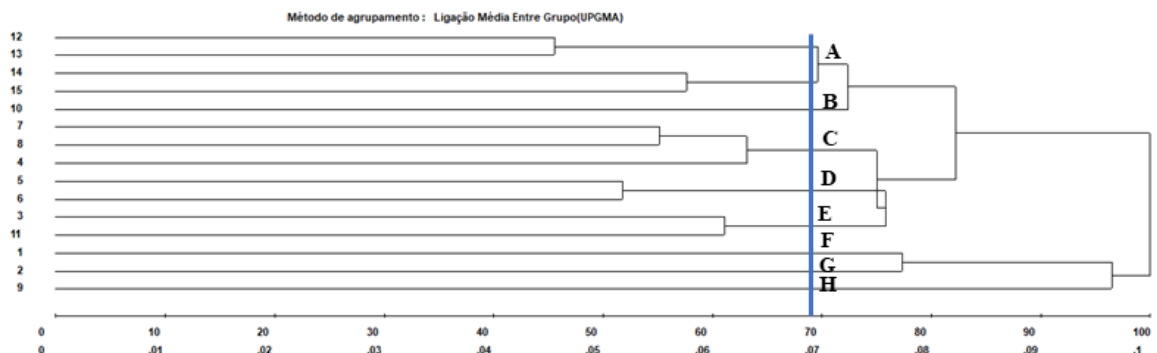
**Figura 5.** Dendrograma da população de Rondonópolis obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população.



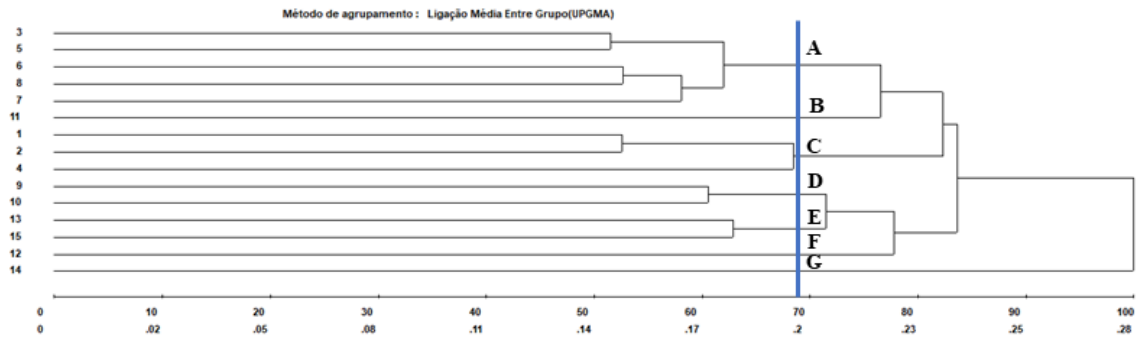
**Figura 6.** Dendrograma da população de Goiânia obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população.



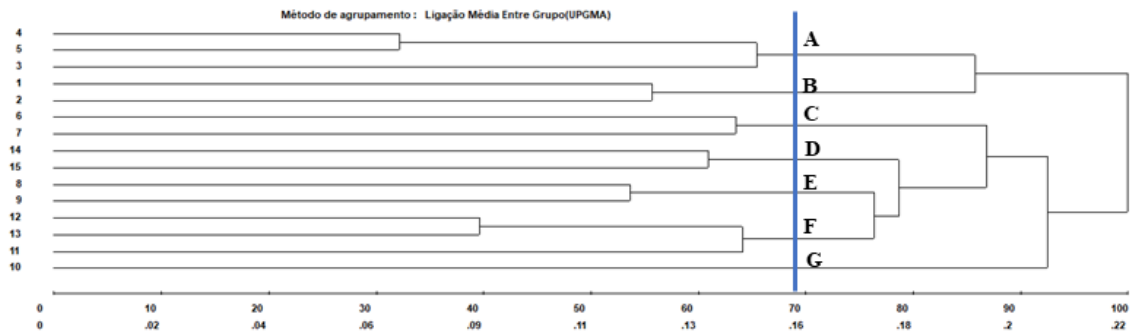
**Figura 7.** Dendrograma da população de Chapadão do Sul obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população.



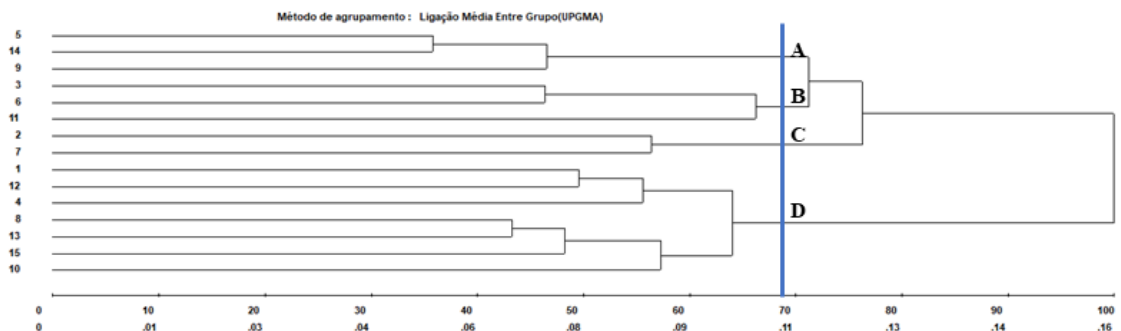
**Figura 8.** Dendrograma da população de Quixeramobim obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população.



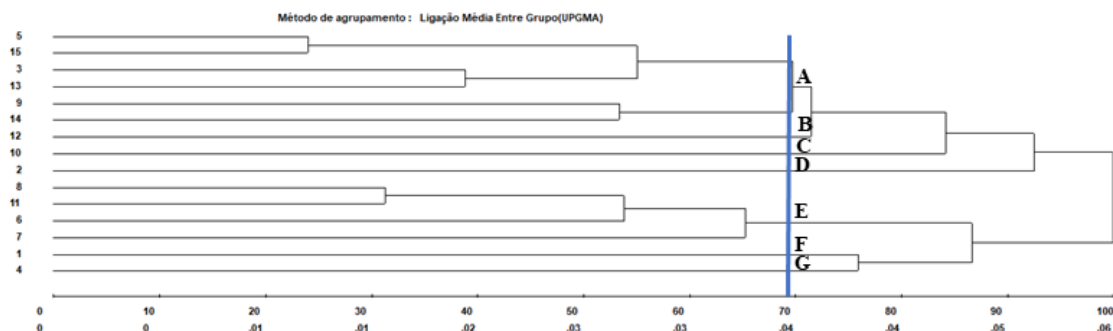
**Figura 9.** Dendrograma da população de Ipiranga do Norte obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população.



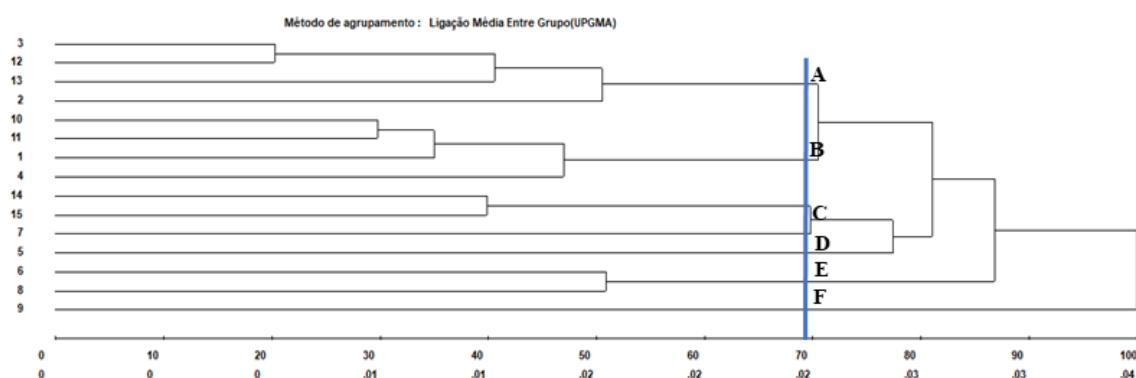
**Figura 10.** Dendrograma da população de Campina Grande obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população.



**Figura 11.** Dendrograma da população de Jataí obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população.

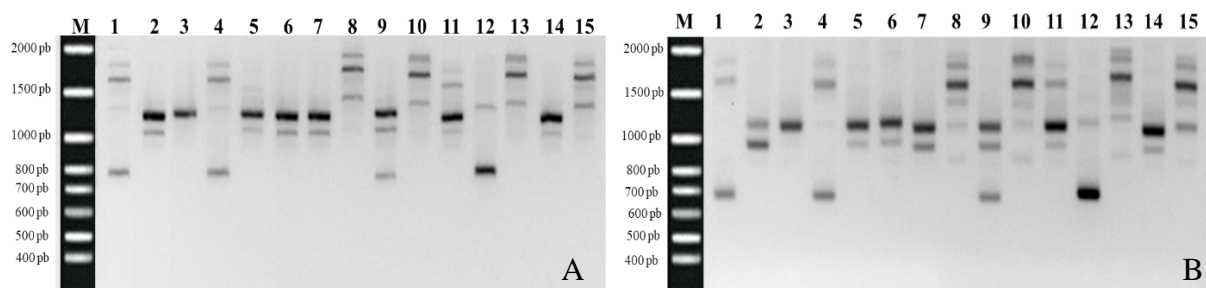


**Figura 12.** Dendrograma da população de Chapadão do Céu obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população.

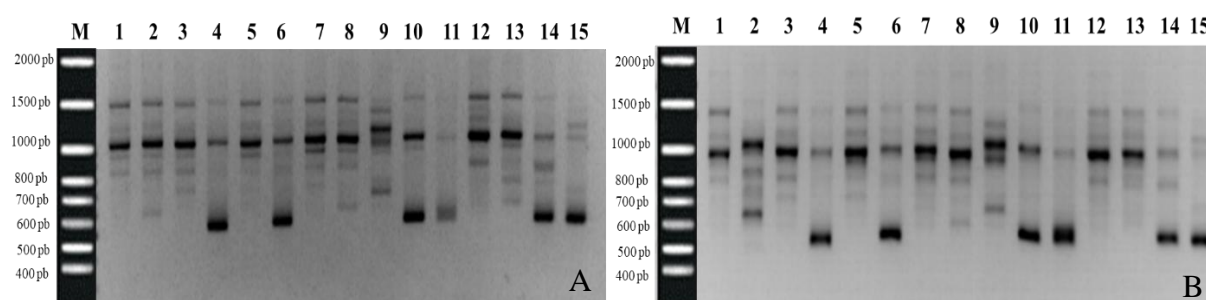


**Figura 13.** Dendrograma da população de Primavera do Leste obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. As letras indicam os grupos formados dentro da população.

Uma das principais características do marcador ISSR é a alta reprodutibilidade (NG e TAN, 2015). As figuras a seguir mostram a variabilidade genética dentro das populações de Jataí (Figura 14) e Chapadão do Sul (Figura 15), bem como a reprodutibilidade dos géis, ao ser utilizado o oligonucleotídeo UBC 878.



**Figura 14.** Reprodutibilidade do padrão de bandas. A- primeiro gel de agarose com o oligonucleotídeo UBC 878 e o DNA da população de bicudos de Jataí, GO; B- segundo gel de agarose com o oligonucleotídeo UBC 878 e o DNA da população de bicudos de Jataí, GO. M- marcador 100 pb (Norgem Biotek).



**Figura 15.** Reprodutibilidade do padrão de bandas. A- primeiro gel de agarose com o oligonucleotídeo UBC 878 e o DNA da população de bicudos da população de Chapadão do Sul, MS; B- segundo gel de agarose com o oligonucleotídeo UBC 878 e o DNA da população de bicudos da população de Chapadão do Sul, MS. M- marcador 100 pb (Norgem Biotek).

A partir dos *amplicons* obtidos nas análises de PCR-ISSR foram procedidos agrupamentos do conjunto de populações através das metodologias de Tocher e UPGMA. Pelo método de otimização de Tocher, três grupos foram formados (Tabela 7). O grupo um foi constituído por oito populações: populações do estado do Ceará (Barbalha e Quixeramobim), populações do estado de Goiás (Chapadão do Céu, Goiânia e Jataí), pela única população representante do estado de Mato Grosso do Sul (Chapadão do Sul) e pelas populações do Mato Grosso (Primavera do Leste e Rondonópolis); os mais divergentes foram os grupos dois e três, ambos constituído apenas por uma população, Campina Grande e Ipiranga do Norte, respectivamente.

**Tabela 7.** Agrupamento das populações de bicudo do algodoeiro pelo método de otimização de Tocher, a partir dos dados moleculares.

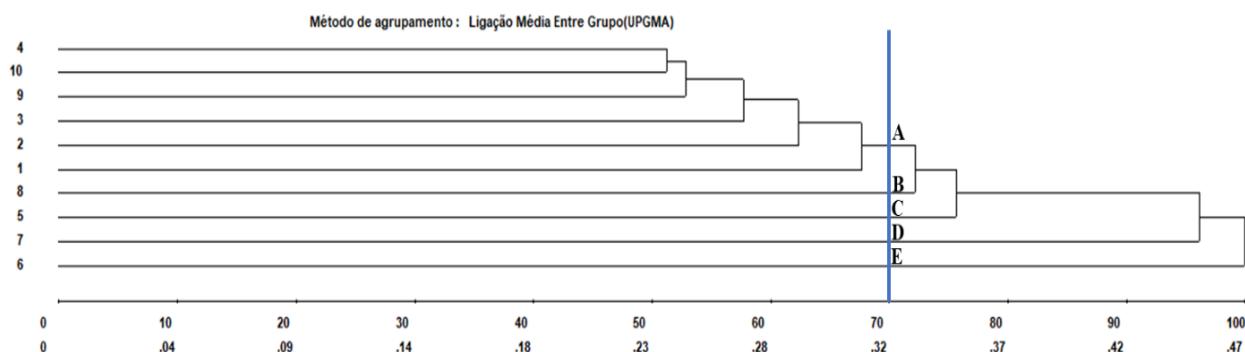
Grupo	População
1	Chapadão do Sul, Primavera do Leste, Chapadão do Céu, Goiânia, Barbalha, Rondonópolis, Jataí, Quixeramobim
2	Campina Grande
3	Ipiranga do Norte

No método de agrupamento hierárquico UPGMA, houve a formação de cinco grupos quando adotado o ponto de corte de 70%, seguindo os critérios de Mojena (1977), com  $k = 1,25$ , o qual correspondeu a distância genética de 0,32 (Figura 16). O grupo A agregou as populações de Chapadão do Sul, Primavera do Leste, Chapadão do Céu, Goiânia, Rondonópolis e Barbalha, já os grupos B, C, D e E agruparam isoladamente as populações de Jataí, Quixeramobim, Campina Grande e Ipiranga do Norte, respectivamente. O grupo A incluiu cinco populações pertencentes a região Centro-Oeste e uma população do Nordeste. Estas se destacam quanto a produção de algodão, havendo assim, o predomínio de um ambiente homogêneo, e os resultados obtidos indicam que as mesmas possuem um ancestral comum.

A inclusão das populações de Quixeramobim, Campina Grande e Ipiranga do Norte em grupos diferentes, provavelmente ocorreu devido as mesmas se localizarem em pontos geograficamente mais distantes, quando comparado com as demais populações, indicando que possuem parentais diferentes. Já a população de Jataí, que apesar de pertencer ao estado de Goiás, formou um grupo isolado, indicando que a introdução do *A grandis* nesta localidade ocorreu a partir de um grupo genético distinto. No trabalho realizado por Souza et al. (2008) com diversidade genética de populações de *Z. subfasciatus*, utilizando ISSR como marcador molecular, também houve a formação de 3 grupos, na qual o primeiro agregou a população amostrada no Acre, Paraná, Mato Grosso do Sul, Goiás, Bahia e Espírito Santo, o segundo agregou três populações de Minas Gerais e uma do Sul da Bahia, e o terceiro agregou apenas a população de Alta Floresta.

As estimativas médias das distâncias genéticas entre as populações obtidas a partir do coeficiente de Nei variaram de 0,04 a 0,47, refletindo na diversidade genética entre as dez populações avaliadas. O coeficiente de correlação cofenética foi de 0,94, indicando uma boa representatividade das matrizes de dissimilaridade na forma de dendograma. De acordo com

Cruz e Carneiro (2003), o coeficiente de correlação cofenética pode ser utilizado para analisar a consistência do padrão de agrupamento.



**Figure 16.** Dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA, construído a partir do complemento aritmético do Coeficiente de Nei. População Barbalha (1), Rondonópolis (2), Goiânia (3), Chapadão do Sul (4), Quixeramobim (5), Ipiranga do Norte (6), Campina Grande (7), Jataí (8), Chapadão do Céu (9) e Primavera do Leste (10). As letras indicam os cinco grupos formados entre as 10 populações analisadas.

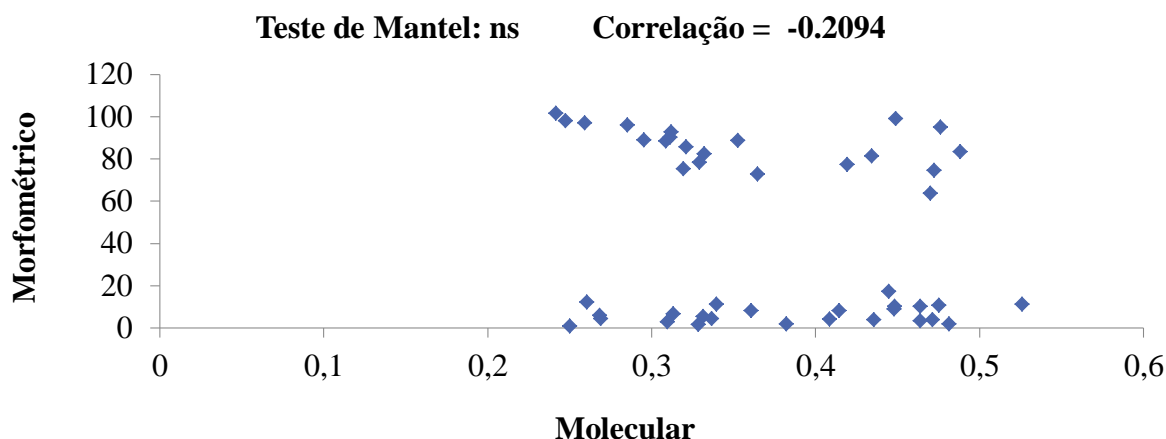
A distância genética entre as populações variou de 0,241 a 0,525. A maior distância genética (0,525) coincidiu com a maior distância geográfica em km (2.289), que foi entre as populações de Campina Grande e Ipiranga do Norte (Tabela 8). A menor distância genética foi obtida entre as populações de Primavera do Leste e Chapadão do Sul, ambas cidades são grandes centros produtores de algodão. Esses resultados se correlacionam com os dados apresentados no método de otimização de Tocher e no dendrograma obtido pelo método de agrupamento hierárquico. No trabalho realizado por Huala et al. (2018) sobre diversidade genética de diferentes populações de *Aegorhinus superciliosus*, utilizando o marcador molecular ISSR, a maior distância genética também coincidiu com a maior distância geográfica, que foi entre as populações de Máfil e Frutillar.

**Tabela 8.** Distâncias genéticas (Nei, 1972) obtidas por ISSR (acima da diagonal) e distâncias geográficas em km (abaixo da diagonal) entre dez populações brasileiras de *A. grandis*. População de: Barbalha (BAR), Rondonópolis (RO), Goiânia (GO), Chapadão do Sul (CS), Quixeramobim (QX), Ipiranga do Norte (IN), Campina grande (CG), Jataí (JÁ), Chapadão do Céu (CC), Primavera do Leste (PL).

População	BAR	RO	GO	CS	QX	IN	CG	JA	CC	PL
BAR	-	0.331	0.339	0.268	0.328	0.481	0.463	0.364	0.332	0.320
RO	1.952	-	0.309	0.268	0.408	0.471	0.447	0.328	0.311	0.285
GO	1.501	573	-	0.260	0.360	0.448	0.414	0.319	0.295	0.259
CS	1.924	335	427	-	0.313	0.435	0.444	0.308	0.247	0.241
QX	235	2.089	1.676	2.090	-	0.463	0.475	0.419	0.352	0.311
IN	1.926	498	892	821	2.009	-	0.525	0.488	0.476	0.448
CG	376	2.280	1.793	2.219	439	2.289	-	0.469	0.472	0.434
JÁ	1.787	346	295	138	1.953	788	2.085	-	0.382	0.336
CC	1.899	299	409	45	2.064	779	2.199	115	-	0.250
PL	1.872	108	553	402	2.002	420	2.207	377	360	-

Por meio do teste de correlação entre as matrizes, foram avaliados os dados morfométricos e moleculares. O teste de Mantel revelou correlação negativa (-0,2093) e não significativa, ou seja, à medida que o valor de uma matriz aumentou, o valor da outra matriz diminuiu, indicando uma correlação inversa (Figura 17). Portanto, pode-se inferir que as variações das características morfométricas encontradas nos insetos das diferentes populações podem ter sido influenciadas pelas condições climáticas e latitude de cada localidade, bem como pela alimentação e idade dos mesmos. Esses dados sobre diferentes populações de *A. grandis* no Brasil são importantes para auxiliar no desenvolvimento de medidas de controle mais eficaz.





**Figura 17.** Teste de correlação de Mantel entre as matrizes de dissimilaridade dos dados morfométricos e moleculares.

Diante dos resultados obtidos constata-se que há variabilidade genética entre as diferentes populações brasileiras de *A. grandis*, porém é baixa quando comparado com populações de bicudo do México e Estados Unidos. As populações da região Centro-Oeste tendem a ter menor variabilidade genética devido a homogeneidade ambiental e ao grande número de aplicação de inseticidas (MARTINS, 2007), no entanto, as mudanças na sequência do DNA (mutação) causadas por fatores exógenos, o fluxo gênico, que é a migração de genes de uma população para outra (VEASEY et al., 2011), o isolamento geográfico (MANRIQUE-POYATO et al., 2013), o ciclo de vida, o tipo de reprodução (REECE et al., 2014) e a dispersão (SOUZA et al., 2008) são fatores que podem influenciar a variabilidade genética de insetos.

Os resultados deste trabalho sugerem a implantação de programas de controle específicos, sendo este um aspecto relevante no auxílio da erradicação do bicudo. Se este inseto-praga não for controlado de forma correta, as regiões em que há maior incidência poderão servir como fonte de variabilidade de bicudo, podendo assim, interferir em locais que estão em processo de erradicação, além de proporcionar a chegada deste inseto em locais onde o mesmo ainda não foi detectado.

## 6. CONCLUSÕES

- Há variabilidade genética entre e dentro das populações de bicudos das diferentes localidades do Brasil, com base nas características morfométricas e moleculares analisadas;
- As populações de Campina Grande (PB) e Ipiranga do Norte (MT) apresentaram a maior distância genética; enquanto as populações de Primavera do Leste (MS) e Chapadão do Sul (MT) apresentaram a menor distância genética.
- Houve uma correlação negativa entre as matrizes de dissimilaridade dos dados moleculares e morfométricos, portanto, à medida que o valor de uma matriz aumentou, o valor da outra matriz diminuiu, indicando que as variações das características morfométricas podem ter sido influenciadas por condições edafoclimáticas de cada localidade e pela alimentação e idade dos mesmos.
- Os resultados obtidos neste trabalho fornecem informações das diferentes populações de bicudo do algodoeiro analisadas, o que pode ajudar no desenvolvimento e/ou aprimoramento de um manejo integrado de pragas mais eficiente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAPA – Associação Brasileira de Produtores de Algodão. **Consumo mundial**. Disponível em: <<http://www.abrapa.com.br/Paginas/dados/algodao-no-mundo.aspx>>. Acesso em: 18 novembro 2019.
- ADAMS, D.C.; ROHLF, F.J.; SLICE, D.E. A field comes of age: Geometric morphometrics in the 21st century. **Hystrix**, v. 24, n. 1 p. 7–14, 2013.
- ALMEIDA, R.P.; SOARES, J.J.; SOUTO, S.R.M.; OLIVEIRA, J.B. Resposta de plantas de algodão ao ataque do bicudo *Anthonomus grandis*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 16., 1997, Salvador, BA. **Anais...** Salvador: SEB/Embrapa-CNPMPF, 1997. p.205.
- ALONSO-ZARAZAGA, M.A.; LYAL, C.H.C. **A world catalogue of families and genera of Curculionoidea (Insecta: Coleoptera) (Excepting Scolytidae and Platypodidae)**. Entomopraxis: Barcelona, 1999.
- AMIPA – Associação Mineira de Produtores de Algodão. **Sobre o Algodão**. 2018. Disponível em: <<http://www.amipa.com.br/sobre-o-algodao/historia>>. Acesso em: 18 novembro 2019.
- AMPA – Associação Matogrossense dos Produtores de Algodão. **História do Algodão**. 2012. Disponível em: <[http://www.ampa.com.br/site/qs\\_historia.php](http://www.ampa.com.br/site/qs_historia.php)>. Acesso em: 18 novembro 2019.
- ANNE, C. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. **Genética**, v. 127, n. 1-3, p. 101-120, 2006.
- AZAMBUJA, R.; DEGRANDE, P.E. Biologia e ecologia do bicudo-do-algodoeiro no Brasil. In: BELOT, J. L. **O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* BOH., 1843) nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle**. 2 ed, Cuiabá: IMAmt, 2015, p. 45-57.
- AZAMBUJA, R.; DEGRANDE, P.E. Trinta anos do bicudo-do-algodoeiro no Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 4, p. 377-410, 2014.
- BANCROFT, H.R.; JONES, B.R. Genotypes of esterase II determined from frass of *Anthonomus grandis* Boh. (Coleoptera, Curculionidae). **Biochemical Genetics**. v. 15, p. 1175-1180, 1977.
- BARAKAT, M.N.; EL-SHAFEI, A.M.; AL-DOSS, A. Molecular mapping of QTLs for resistance to northern corn leaf blight in maize. **International journal of food, agriculture and environment**, v. 8, n. 2, p. 547-552, 2010.
- BARTLETT, A.C. (1981). Isozyme polymorphisms in boll weevil and Thurberia weevil from Arizona. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 74, n. 4, p. 359-362, 1981.
- BASTOS, C.S.; ALMEIDA, R.P. Influência negativa do manejo no algodão. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, n. 74, p. 10-12, 2005.

BLANCKENHORN, W.U.; HOECK, P.E.; REIM, C.; TEUSCHL, Y. A cost of being large: genetically large yellow dung flies lose out in intra-specific food competition. **Evolutionary Ecology** v. 25, n. 4, p. 875–884, 2011.

BOOKSTEIN, F.L. **Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.

BUSOLI, A. C.; PEREIRA, F. F.; GÓMEZ LOPEZ, V. A.; SOARES, J. J.; MELO, R. S.; ALMEIDA, C. A. Preferência alimentar do bicudo-do-algodoeiro por frutos de diferentes cultivares e idades. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.39, n.2, p.101-104, 2004.

BUSSAB, W.O.; MIAZAKI, E.S.; ANDRADE, D.F. **Introdução à análise de agrupamento**. São Paulo: Associação Brasileira de Estatística, 1990.

CAMPOS, K.L.; ARAÚJO, T.A.; SHOWLER, A.T.; LUZ, C.E.A.; SILVA, W.B.; FIGUEIREDO, TORRES, J.B.C.S.; BASTOS, C.S. Integration of Cotton Plant Resistance With Selected Organic Boll Weevil, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) Control Tactics. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 5, p. 1-15, 2019.

CASTAÑÉ, C.; AGUSTÍ, N.; ARNÓ, J.; GABARRA, R.; RIUDAVETS, J.; COMAS, J.; ALOMAR, O. Taxonomic identification of *Macrolophus pygmaeus* and *Macrolophus melanotoma* based on morphometry and molecular markers. **Bulletin of entomological research**, v. 103, n. 2, p. 204-215, 2013.

CIVANTOS, E.; FORSMAN, A.; AHNESJÖ, J. Developmental instability and immune function in colour polymorphic pygmy grasshoppers. *Evolutionary Ecology*, v. 19, n. 1, p. 1–14, 2005.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Algodão – Análise mensal**. 2019. Disponível em: <file:///D:/Downloads/AlgodaoZ-ZAnaliseZMensualZ-ZNovembro-2019.pdf>. Acesso em: 18 novembro 2019.

CRUZ, C.D. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. **Acta Scientiarum**. v.38, n.4, p.547-552, 2016.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2003.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A. J. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. Viçosa: UFV, 2001.

D’ECKENBRUGGE, G.C.; LACAPE, J.M. Distribution and differentiation of wild, feral, and cultivated populations of perennial upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) in Mesoamerica and the Caribbean. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107458, 2014.

DEGRANDE, P.E.; SANTOS, W.J.; SILVA, A.F.C.P. Programa nacional contra o bicudo. **Cultivar Grandes Culturas**. n. 68, p. 08-10, 2004.

DEGRANDE, P.E. Ameaça do bicudo exige organização e empenho de todos. **Visão Agrícola**, v. 1, n. 6, p. 55-58, 2006.

EGBUTA, M.A.; MCINTOSH, S.; WATERS, D.L.E.; VANCOV, T. LIU, L. Biological importance of cotton by-products relative to chemical constituents of the cotton plant. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 93, 2017.

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

FORNEL, R.; CORDEIRO-ESTRELA, P. Morfometria geométrica e a quantificação da forma dos organismos. In: MARINHO, J.R.; HEPP, L.U.; FORNEL, R. (org.). **Temas Em Biologia: Edição Comemorativa aos 20 anos do Curso de Ciências Biológicas e aos 5 anos do PPG-Ecologia a URI Campus de Erechim**, 1. ed. Erechim: EDIFAPES, 2012, p. 101–120.

FREIRE, E.C. **Algodão no cerrado do Brasil**. Brasília: ABRAPA, 2011.

FREIRE, E.C. **Algodão no cerrado do Brasil**. Brasília: ABRAPA, 2015.

GABRIEL, D. Longevidade do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* Boh., criado em hospedeiras alternativas no laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 3, p. 123-126, 2002a.

GABRIEL, D. Avaliação de malváceas cultivadas como hospedeiras alternativas para a reprodução do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* Boh. 1843, no laboratório. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 69, n. 3, p. 69-76, 2002b

GABRIEL, D. **O bicudo do algodoeiro**. Documento Técnico – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios/Instituto Biológico, n 25, p. 1-20, 2016.

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. N. Research techniques made simple: polymerase chain reaction (PCR). **The Journal of investigative dermatology**, v. 133, n. 3, p. 1-4, 2013.

GHAFFARI, S.; HASNAOUI, N. Microsatellite Amplifications in Plants: Optimizations Produce of Major PCR Components. In: Kantartzi, S (ed). **Microsatellites**. Totowa: Humana Press, 2013. p. 139-146.

HABIB, M.E.M.; FERNADES, W.D. *Anthonomus grandis* Boheman (Curculionidae) já está na lavoura algodoeira do Brasil. **Revista de Agricultura**, v. 58, p. 74, 1983.

HENRIQUE, F.H.; LACA-BUENDÍA, J.P. Comportamento morfológico e agrônômico de genótipos de algodoeiro no município de Uberaba-MG. **FAZU em revista**, v. 1, n. 7, p. 32-36, 2010.

HERNÁNDEZ, M.S.; JONES, R.W.; CASTILLO, P.R. A key to the Mexican and Central America genera of Anthonomini (Curculionidae, Curculioninae). **ZooKeys**, v. 1, n. 260, p. 31-47, 2013.

HOCHKIRCH, A.; DEPPERMAN, J.; GRÖNING, J. Phenotypic plasticity in insects: the effects of substrate color on the coloration of two ground- hopper species. **Evolution e Development**, v. 10, n. 3, p. 350-359, 2008.

- HONGYU, K.; SANDANIELO, V.L.M.; OLIVEIRA JUNIOR, G.J. Análise de componentes principais: resumo teórico, aplicação e interpretação. **Engineering and Science**, v. 5, n. 1, p. 83-90, 2016.
- HUALA, L.; PAREDES, M.; SALAZAR, L.; ELGUETA, M.; REBOLLEDO, R. Genetic variability in *Aegorhinus superciliosus* (Coleoptera: Curculionidae) populations in Chilean *Maytenus boaria* (Celastrales: Celastraceae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 44, n. 7, p. 260-265, 2018.
- HURTADO-BURILLO, M.; JARA, L.; JESÚS MAY-ITZÁ, W.; QUEZADA-EUÁN, J.J.G.; RUIZ, C.; DE LA RÚA, P. A geometric morphometric and microsatellite analyses of *Scaptotrigona mexicana* and *S. pectoralis* (Apidae: Meliponini) sheds light on the biodiversity of Mesoamerican stingless bees. **Journal of insect conservation**, v. 20, n. 5, p. 753-763, 2016.
- JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in ecology & evolution**. v. 11, n. 10, p. 424-429, 1996.
- JIMENEZ, L. H.; RANZ, R.R.; LÓPEZ, R.C.; ELGUETA, M.; MARCO P.H. Morphometric and molecular differences among *Calvertius tuberosus* (Coleoptera: Curculionidae) populations associated with Andean and coastal populations of *Araucaria araucana* in the La Araucanía Region, Chile. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 62, n. 2, p. 119-124, 2018.
- KALIA, R.K.; RAI, M.K.; KALIA, S.; SINGH, R.; DHAWAN, A.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. **Euphytica**. v. 177, n. 3, p. 309-304, 2011.
- KIM, K.S.; SAPPINGTON, T.W. Boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) (Coleoptera: Curculionidae) dispersal in the Southern United States: evidence from mitochondrial DNA variation. **Environmental Entomology**, v.33, p.457-470, 2004
- KLFF GROUP. **Aumento de pragas e doenças eleva custo de produção**. Valinhos, Kleffmann Group, 12 ed, 2016.
- LAPARIE, M.; LÉBOUVIER, M.; LALOUETTE, L.; RENAULT, D. Variation of morphometric traits in populations of an invasive carabid predator (*Merizodus soledadinus*) within a sub-Antarctic island. **Biological invasions**, v. 12, n. 10, p. 3405-3417, 2010.
- LIMA JÚNIOR, C.A.L.; CARVALHO, C.A.L.; NUNES, L.A.; FRANCOY, T.M. Population divergence of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera: Meliponina) in two restricted areas in Bahia, Brazil. **Sociobiology**, v. 59, n. 1, p. 107-122, 2014.
- LIU, C.; YUAN, D.; ZHANG, X.; LIN, Z. Isolation, characterization and mapping of genes differentially expressed during fibre development between *Gossypium hirsutum* and *G. barbadense* by cDNA-SRAP. **J. Genet.** v. 92, n. 2, p. 175-181, 2013.
- LORENZ, C.; SUESDEK, L. Evaluation of chemical preparation on insect wing shape for geometric morphometrics. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 89, n.5, p v. 928-931, 2013.

- MANRIQUE-POYATO, M.I.; LÓPEZ-LEÓN, M.D.; GÓMEZ, R.; PERFECTTI, F.; CAMACHO, J.P.M. Population Genetic Structure of the Grasshopper *Eyprepocnemis plorans* in the South and East of the Iberian Peninsula. **PLoS One** v. 8, n. 3, p. 1–8, 2013.
- MARTÍNEZ-ORTEGA, M.M.; DELGADO, L.; ALBACH, D.C.; ELENA-ROSSELLÓ, J.A.; RICO, E. Species boundaries and phylogeographic patterns in cryptic taxa inferred from AFLP markers: *Veronica subgen. Pentasepalae* (Scrophulariaceae) in the Western Mediterranean. **Systematic Botany**, v. 29, n. 4, p. 965-986, 2004.
- MARTINS, W.F.S.; AYRES, C.F.J.; LUCENA, W. A. Genetic diversity of Brazilian natural populations of *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), the major cottonpest in the New World. **Genet Mol Res**, v. 6, n. 1, p. 23-32, 2007.
- MIRANDA, J.E.; RODRIGUES, S.M.M. História do bicudo no Brasil. In: BELOT, J. L. **O bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* BOH., 1843) nos cerrados brasileiros: Biologia e medidas de controle**. 2. ed. Cuiabá:IMAmt, 2015. p. 15.
- MITCHELL-OLDS, T. The Molecular basis of quantitative genetic variation in natural populations. **Tree**, v. 10, n. 8, p. 324-328, 1995.
- MOJENA R. Hierarchical grouping method and stopping rules: an evaluation. **Computer Journal**, v. 20, p. 359-363, 1977.
- NASCIMENTO, B. **Comparação do frete rodoviário de soja e de algodão no Mato Grosso**. Piracicaba: Esalqlog, 2014.
- NEI, M. Genetic distances between populations. **The American Naturalist**, v. 106, n. 949, p. 283-292, 1972.
- NG, W. L.; TAN, S. G. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right. **ASM Sci J**, v. 9, n. 1, p. 30-39, 2015.
- OBER K.; CONNOLLY C.T. Geometric morphometric and phylogenetic analyses of Arizona Sky Island populations of *Scaphinotus petersi* Roeschke (Coleoptera: Carabidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 175, n. 1, p. 107-118, 2015.
- OLIVEIRA J C M. **Campina Grande a cidade se consolida no século XX**. João Pessoa, 2007. 41f. Monografia - Curso de Geografia, Universidade Federal da Paraíba.
- ORLANDIN, E.; PIOVESAN, M.; FAVRETTO, M.A.; D'AGOSTINI, F.M. Mamíferos de médio e grande porte atropelados no Oeste de Santa Catarina, Brasil. **Biota Amazônia**, v. 5, n. 4, p. 125-130, 2015.
- PAULA, D.P.; CLAUDINO, D.; TIMBO, R.V.; MIRANDA, J. E.; BEMQUERER, M.P.; RIBEIRO, A.C.; SUJII, E.R.; FONTES, E.M.; PIRES, C.S. Reproductive dormancy in boll-weevil from populations of the Midwest of Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v.106, n.1, p.86-89, 2013.

PIRES, E.M.; GUEDES, R.N. C.; SERRÃO, J.E.; FERREIRA, P.S.F. Seasonal and interpopulational morphometry variation of *Platyscytus decempunctatus* (Carvalho, 1945) (Heteroptera: Miridae). **Biota Neotropica**, v. 8, n. 2, p. 39-46, 2008.

PRZYBYCIEN, M.; WACLAWIK, B. Morphometric measurements of *Bryodaemon* (Coleoptera: Curculionidae): contribution to phylogeny. **Baltic Journal Coleopterology**. v. 15, n. 1, p. 129–136, 2015.

QUEIROZ, D.R.; FARIAS, F.J.C.; VASCONCELOS, J.J.C.; CARVALHO, L.P.; NEDER, D.G.; SOUZA, L.S.S.; FARIAS, F.C.; TEODORO, P.E. Diallel analysis for agronomic traits in upland cotton in semi-arid zones in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3 p. 1-8, 2017.

REECE, J.B.; URRY, L.A.; CAIN, M.L.; WASSERMAN S.A.; MINORSKY, P.V.; JACKSON, R.B. **Campbell biology**. Boston: Pearson, 2014.

ROEHRDANZ, R.L. Genetic differentiation of southeastern boll weevil and Thurberia weevil Populations of *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) using mitochondrial DNA. **Genetics**, v. 94, n. 6, p. 928-935, 2001.

ROHLF, F.J.; MARCUS, L.F. A revolution in morphometrics. **Trends in ecology & evolution**, v. 8, n. 4, p. 129-132, 1993.

SÁ, A.S. **História do Algodão - Brasil - Mato Grosso**. 2016. Disponível em: <<http://mundosegundohistoria.blogspot.com/2016/04/historia-do-algodao.html>>. Acesso em 06 setembro 2018.

SÁNCHEZ-RUIZ, M.; SANMARTÍN, I. Separation of *Aspidiotus* species using morphometric analysis. **European Journal of Entomology**. v. 97, n. 1, p. 85-94, 2000.

SANTOS, J.W.; ALMEIDA, F.A.C.; BELTRÃO, N.E.M.; GHEYI, H.R. **Estatística experimental aplicada**. Campina Grande: Marcone. 2003.

SANTOS, W.J. Manejo das Pragas do Algodão, com destaque para o cerrado brasileiro. In: FREIRE, E. C. **Algodão no cerrado do Brasil**. 3 ed. ABRAPA: Gráfica e Editora Positiva, 2015, p. 267-364.

SCATAGLINI, M.A.; CONFALONIERI, V.A.; LANTERI, A.A. Dispersal of the cotton boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) in South America: evidence of RAPD analysis. **Genetica**, v. 108, n. 2, p. 127-136, 2000.

SEFFRIN, R.C.A.; COSTA, E.C.; COUTO, M.R.M.; LOPES, S.J. Medidas morfométricas de fêmeas e machos de *Oncideres dejeani* Thompson, 1868 (Coleoptera: Cerambycidae). **Ciência Rural**. v. 36 n. 4, p. 1313-1316, 2006.

SHAFIEI-ASTANI, B.; ONG, A.H.K.; VALDIANI, A.; TAN, S.G.; YONG, C.S.Y.; AHMADY, F.; ALITHEEN, N.B.; NG, W.L.; KAUR, T. Molecular genetic variation and structure of Southeast Asian crocodile (*Tomistoma schlegelii*): Comparative potentials of SSRs versus ISSRs. **Gene**, v. 571, n. 1, p. 107-116, 2015.



SHOWLER, A.T.; GREENBERG, S.M.; SCOTT JÚNIOR, A.W.; ROBINSON, J.R.C. Effects of planting dates on boll weevils (Coleoptera: Curculionidae) and cotton fruit in the subtropics. **Journal of economic entomology**, v. 98, n. 3, p. 796-804, 2005.

SHOWLER, A.T. Subtropical boll weevil ecology. **American Entomologist**, v. 53, n. 4, p. 240-249, 2007.

SHOWLER, A.T. Roles of host plants in boll weevil range expansion beyond tropical mesoamerica. **American Entomologist**, v. 55, n. 4, p. 234-242, 2009.

SILVA, C.A.D.; PIRES, E.M.; LACERDA, M.C.; PREZOTO, F.; ZANUNCIO, J.C.; SERRÃO, J.E. Immature stages and nest characteristics of *Apoica pallens* (Hymenoptera: Vespidae). **Sociobiology**, v. 48, n. 3, p. 365-374, 2006.

SILVA, C.A. Supressão do bicudo em algodoeiro. **Cultivar Grandes Culturas**, n. 154, p. 8-9, 2012.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. **Indian Journal of Genetic and Plant Breeding**, v.41, n.2, p.237-245, 1981.

SMITH-PARDO, A.H. Species of the beetle genus *Anthonomus* Germar, 1817 (Curculionidae: Curculioninae: Anthonomini) of quarantine importance intercepted at U.S. ports of entry. **Boletín del Museo entomológico**, v. 7, n. 1, p. 7-18, 2015.

SOUZA, G.A.D.; CARVALHO, M.R.D.O.; MARTINS, E.R.; GUEDES, R.N.C.; OLIVEIRA, L.O.D. Diversidade genética estimada com marcadores ISSR em populações brasileiras de *Zabrotes subfasciatus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 7 p. 843-849, 2008.

TERRANOVA, A.C.; JONES, R.G.; BARTLETT, A.C. (1991). An allozyme study of the laboratory boll weevil and its influence on some southeastern populations. **Southwestern Entomologist**, v. 16, n. 1, p. 1-11, 1991.

TOMQUELSKI, G.V.; MARTINS, G.M. Bicudo em algodão. **Cultivar Grandes Culturas**, n. 111, p. 42-45, 2008.

TRIPPVALDEZ, M.A.; GARCÍA- DE- LEÓN, F.J.; ESPINOSA- PÉREZ, H.; RUIZ-CAMPOS, G. Population structure of sablefish *Anoplopoma fimbria* using genetic variability and geometric morphometric analysis. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 28, n. 4, p. 516-523, 2012.

TSENG, M.; SOLEIMANI PARI, S. Body size explains interspecific variation in size–latitude relationships in geographically widespread beetle species. **Ecological entomology**, v. 44, n.1, p. 151-156, 2019.

TURCHETTO-ZOLE, A.C.; ZANELLA, C.M. Marcadores genéticos baseados em DNA. In TURCHETTO-ZOLE, A.C.; TURCHETTO, C.; ZANELLA, C.M.; PASSAIA, G. **Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações**. 1 ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2017. 181 p.

- VAN OOSTERHOUT C.; VAN HEUVEN, M.K.; BRAKEFIELD, P.M. (2004). On the neutrality of molecular genetic markers: pedigree analysis of genetic variation in fragmented populations. **Molecular Ecology**. v. 13, n. 5, p. 1025-1034, 2004.
- VEASEY, E.A.; PIOTTO, A.F.; NASCIMENTO, W.F.; RODRIGUES, J.R.; MEZETTE, T.F.; BORGES, A.; BIGUZZI, F.A.; SANTOS, F.R.C.; SOBIERAJSKI, G.R.; RECCHIA, G.H.; MISTRO, J.C. Processos evolutivos e a origem das plantas cultivadas. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1218-1228, 2011.
- VIDAL NETO, F.C.; FREIRE, E.C. Melhoramento genético do algodoeiro. In: VIDAL NETO, F. C.; CAVALCANTI, J. J. V. (Ed.) **Melhoramento genético de plantas no Nordeste**. 1 ed. Brasília: Embrapa, 2013, p. 49 – 83.
- VISCOSI, V.; CARDINI, A. Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: a simplified protocol for beginners. **PLoS One** v. 6, n. 10, p. e25630, 2011.
- WANEK, K.A.; STURMBAUER, C.H.; Form, function and phylogeny: comparative morphometrics of Lake Tanganyika's Cichlid tribe Tropheini. **Zoologica scripta**, v. 44, n. 4, p. 362-373, 2015.
- WANG, X.; YANG, R.; FENG, S.; HOU, X.; ZHANG, Y.; LI, Y.; REN, Y. Genetic variation in *Rheum palmatum* and *Rheum tanguticum* (Polygonaceae), two medicinally and endemic species in China using ISSR markers. **Plos one**, v. 7, n. 12, p. e51667, 2012.
- WHITMAN, D.W.; AGRAWAL, A.A. What is phenotypic plasticity and why is it important. **Phenotypic plasticity of insects: Mechanisms and consequences**, p. 1-63, 2009.
- WU, Z.; SOLIMAN, K.M.; ZIPF, A.; SAHA, S.; SHARMA, G.C.; JENKINS, J.N. Isolation and Characterization of Genes Differentially Expressed in Fiber of *Gossypium barbadense* L. **Journal of Cotton Science** v. 9, n 3, p. 166–174, 2005.
- ZELDITCH, M.L.; SWIDERSKI, D.L.; SHEETS, H.D.; FINK, W.L. **Geometric morphometrics for biologists: a primer**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004.
- ZHANG, D.X.; HEWITT, G. Nuclear integrations: challenger for mitochondrial DNA markers. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 6, p. 247-251, 1996.