

130

Circular
TécnicaPorto Velho, RO
Junho, 2013**Autores****Luciana Gatto Brito**Médica Veterinária, D.Sc. em
Ciências Veterinárias,
pesquisadora da Embrapa
Rondônia, Porto Velho, RO,
luciana.gatto@embrapa.br**Márcia Cristina de Sena Oliveira**Médica Veterinária, Embrapa
Pecuária Sudeste, São Carlos, SP**Fábio da Silva Barbieri**Médico Veterinário, Embrapa
Rondônia, Porto Velho, RO**Adriana Mércia Guaratini Ibelli**Bióloga, Embrapa Suínos e Aves,
Concórdia, SC**Ivanete Ferreira da Silva**Acadêmica de Ciências Biológicas
da Faculdade São Lucas**Ana Paula Leite dos Santos**Acadêmica de Ciências Biológicas
da Faculdade São Lucas**Renata Reis da Silva**Química, M.Sc., Embrapa
Rondônia, Porto Velho, RO**Felix Guerrero**Bioquímico, Livestock insects
Research Laboratory, Kerrville,
TX, US**Otimização e validação do diagnóstico molecular da resistência a pesticidas piretroides em populações brasileiras da mosca-dos-chifres****Situação da resistência a pesticidas em populações da mosca-dos-chifres**

A infestação pela mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans*) é um fator limitante para a rentabilidade da produção pecuária no Brasil. As condições climáticas predominantes na maior parte do país contribuem para aumentar a intensidade e o período de parasitismo, causando prejuízos significativos à cadeia produtiva da bovinocultura. O acesso fácil a produtos inseticidas e a facilidade com que eles podem ser aplicados, combinado ao progresso no conhecimento da epidemiologia de parasitas de ruminantes, levou a um período de relativo sucesso no controle das infestações parasitárias, particularmente em sistemas de produção intensivos. No entanto, a falsa suposição de que o controle parasitário é facilmente realizado utilizando-se produtos químicos facilitou o desenvolvimento de resistência às bases químicas mais utilizadas, aumentou a presença de resíduos nos produtos de origem animal e provocou a perda de confiabilidade dos produtores na eficiência dos programas de controle.

O problema da resistência a pesticidas é considerado como um dos maiores desafios para a pecuária mundial. Ao final do século XX, a resistência já havia sido detectada em mais de 500 espécies de artrópodes (GEORGHIOU, 1990), entre as quais, cerca de 40% eram dípteros e 38% possuíam importância médica ou veterinária (GEORGHIOU, 1986). Muitas destas espécies são resistentes a diferentes classes de inseticidas e a situação tende a agravar-se com a continuidade do controle das populações parasitárias nos moldes em que vem sendo realizado. O controle da mosca-dos-chifres é historicamente dependente do uso de produtos químicos inseticidas. O uso constante destes medicamentos tem levado à seleção de populações resistentes a diversos grupos químicos.

Na prática, a seleção causada pelos tratamentos químicos leva ao aumento da frequência de indivíduos resistentes na população, com conseqüente redução da eficácia dos produtos e dos níveis de controle. Problemas no controle da mosca-dos-chifres decorrentes da resistência a inseticidas têm sido cada vez mais frequentes nas principais regiões produtoras de bovinos do país. Em última análise, a aplicação de doses mais elevadas e de tratamentos mais frequentes em função da resistência, aumenta os custos de produção e o nível de contaminação ambiental e dos alimentos produzidos pelos rebanhos bovinos. Além da complexidade e dificuldade de sua reversão, o desenvolvimento da resistência compromete não apenas os inseticidas a que as populações foram expostas, mas todo o grupo químico a que eles pertencem.

Um importante mecanismo de resistência, determinado por mutação no gene que codifica a proteína do canal de sódio é caracterizado por uma redução na sensibilidade do sistema nervoso de insetos a piretroides e ao diclorodifeniltricloroetano (DDT), conhecido como "knockdown resistance" (*kdr*), que inicialmente foi observado em cepas de *Musca domestica* resistentes a piretroides (WILLIAMSON et al., 1996). Várias mutações foram descritas no domínio II do gene que codifica a proteína do canal de sódio em vários insetos, conferindo resistência a piretroides. Head et al. (1998) encontraram uma mutação de ponto no *linker* do domínio III e IV deste gene, o qual também é associado como mecanismo de resistência a piretroides em *Heliothis virescens* e *Holicoverpa armigera*.

Uma segunda mutação denominada *super-kdr*, também localizada no gene do canal de sódio, foi encontrada em combinação com o *kdr*. Esta mutação se traduz fenotipicamente por moscas muito resistentes a inseticidas piretroides (WILLIAMSON et al., 1996). Jamroz et al. (1998) usando técnicas moleculares constataram a resistência a piretroides por meio de *kdr* e *super-kdr* em populações de mosca-dos-chifres originárias da Louisiana, nos Estados Unidos.

A utilização de *primers* específicos para a região do gene do canal de sódio responsável pelo efeito *kdr* e que confere resistência a pesticidas piretroides em populações de *H. irritans* possibilita identificar a mutação no gene determinada pela substituição do aminoácido Leucina por Fenilalanina no fragmento S6 da transmembrana do domínio II do gene que codifica a proteína do canal de sódio. Uma segunda mutação no domínio II da transmembrana S4-S5 do canal de sódio, caracterizada pela substituição do aminoácido Metionina por Treonina, estabelece em populações de moscas-dos-chifres o fenótipo conhecido como *super-kdr* (*skdr*), o qual determina alta resistência aos inseticidas piretroides (GUERRERO et al., 1997).

A fim de validar a aplicabilidade de utilização das sequências nucleotídicas diagnósticas identificadas por Guerrero et al. (1997) para as populações brasileiras da mosca-dos-chifres, análises fenotípicas da resistência a piretroides foram realizadas para a triagem de espécimes resistentes ao pesticida, os quais posteriormente foram submetidos à análises moleculares a fim de caracterizar a presença das mutações tipo *kdr* e *skdr* nas populações brasileiras de *H. irritans*.

Caracterização fenotípica da resistência a inseticidas em populações de campo da mosca-dos-chifres

Para avaliação da presença de populações de campo da mosca-dos-chifres resistentes a pesticidas piretroides se utilizou o método desenvolvido por Sheppard e Hinkle (1987), aceito como o teste padrão para determinar as concentrações letais (CL) utilizadas para a indicação de inseticidas para o controle das populações de moscas.

Os bioensaios utilizando kits inseticidas avaliaram fenotipicamente a resistência a piretroides em três populações de campo de moscas-dos-chifres coletadas em dois rebanhos bovinos estabelecidos nos municípios de Porto Velho e Nova Mamoré e um rebanho bubalino no Município de Nova União, Rondônia.

A susceptibilidade das populações da mosca aos inseticidas foi determinada pelo método do papel de filtro (SHEPPARD; HINKLE, 1987). Os ensaios que

foram realizados impregnando-se o papel filtro com soluções de cipermetrina em grau técnico (Cypermethrin, analytical standart, Pestanal®, CAS number 67375-30-8) nas concentrações de 409,9; 102,4; 25,6; 6,4 e 1,6 µg/cm². Como controle foi utilizado papel filtro impregnado com acetona (solvente). Todos os bioensaios foram conduzidos imediatamente após a captura das moscas sobre os animais. A taxa de mortalidade foi determinada após duas horas de exposição ao pesticida e os resultados foram analisados pelo procedimento (PROC) Probits do programa *Statistical Analysis System* (SAS) (SAS INSTITUTE..., 2003) para obtenção das concentrações letais 50 e 90 (CL50 e CL90) das populações de mosca-dos-chifres avaliadas. Posteriormente, foram calculados os fatores de resistência (FR) das populações estudadas, com base na CL50 da população da mosca-dos-chifres suscetível mantida em laboratório no U.S. Livestock Insects Research Laboratory of Agricultural Research Service/United States Department of Agriculture (ARS/USDA), a qual foi calculada também utilizando-se o PROC Probits do SAS. O FR foi calculado pela fórmula $FR = CL50 \text{ da população testada} / CL50 \text{ da população suscetível}$.

Concluída a leitura das placas dos bioensaios, amostras de cada uma das populações de moscas-dos-chifres, avaliadas, foram depositadas em frascos criogênicos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para posterior validação e realização das provas de detecção molecular e caracterização do perfil genotípico das populações com relação aos alelos da resistência aos pesticidas piretroides.

Tabela 1. Dados referentes a localização geográfica, ao tipo de exploração pecuária e resultado da avaliação fenotípica da resistência a pesticidas piretroides nas populações de moscas-dos-chifres.

Caracterização fenotípica - pesticida piretroides					
Município	Localização	Rebanho	CL 50	CL 90	FR
Nova União	S 10° 55' 11" / W 62° 33' 44"	Bubalino leite	13,621	90,225	40,300
Nova Mamoré	S 10° 27' 378" / W 65° 17' 657"	Bovino leite	11,649	62,765	34,465
Nova Mamoré	S 10° 15' 101" / W 64° 50' 815"	Bovino leite	10,932	405,538	32,342
Colônia de referência	Kerville/Texas, US	Laboratório	0,338	7,730	1,00

Fonte: Elaborado pelos autores.

Validação e otimização das provas diagnósticas moleculares para identificação e caracterização dos alelos específicos *kdr* e *super-kdr*

Para a validação das provas moleculares diagnósticas para amplificação dos alelos *kdr* e *skdr* nas populações brasileiras da *H. irritans* utilizou-se as populações de moscas-dos-chifres previamente caracterizadas como

fenotipicamente resistentes e com fator de resistência (FR) de 32,342; 34,465 e 40,300 respectivamente, das quais foi extraído o DNA para utilização nos testes moleculares de validação e otimização.

A extração de DNA genômico se deu de acordo com a metodologia descrita por Li et al. (2003). Resumidamente, as moscas foram separadas de acordo com o sexo e as fêmeas tiveram a cabeça cortada e o corpo descartado. As moscas foram armazenadas à temperatura de -80°C em tubos plásticos identificados, até o momento da análise. Moscas individualizadas foram transferidas para placas de Petri previamente resfriadas em gelo seco e colocadas em microtubos de 1,5 mL também pré-resfriados e mantidos em gelo seco. As moscas foram maceradas com auxílio de pistilo plástico descartável, também previamente resfriado em gelo seco por aproximadamente 15 segundos. Foram adicionados 25 µL do buffer de isolamento de DNA (1667 µL de 3M KCl; 600 µL de 1M Tris-Cl, pH 8,5; 400 µL de 1M Tris-Cl, pH 8,0; 7333 µL de água ultra pura) e novamente a mosca foi macerada com o pistilo gelado por mais 15 segundos. Teve-se a preocupação de se observar se a mosca foi totalmente fragmentada e então o tubo foi novamente transferido para o gelo seco até que todas as moscas estivessem processadas. Os tubos contendo as moscas foram rapidamente centrifugados para total mistura da larva com o tampão de isolamento. As moscas fragmentadas no tampão de isolamento foram submetidas a banho-maria (temperatura de ebulição) por 3 a 5 minutos. O DNA total extraído foi mantido em freezer a -20°C para uso imediato ou por até 2 dias ou a -80°C quando o tempo para realização da reação em Cadeia da Polímera (PCR) foi superior a 48 horas. Para a realização das provas moleculares, as amostras contendo o DNA total foram centrifugadas a 4°C por 14.000 rpm por 4 minutos.

Para a genotipagem das moscas em relação aos alelos tipo *kdr* foi necessário a otimização da reação em cadeia da polimerase, sendo o volume de reação utilizado de 20 µL. Todas as baterias de reação contavam com uma amostra de DNA controle *kdr* RR proveniente de uma população de *H. irritans* do estado da Geórgia (USA) cedida ARS/USDA e uma amostra controle *kdr* SS também cedida pelo ARS/USDA.

Os protocolos otimizados apresentam condições de temperatura de anelamento e concentração de polimerase diferenciadas das condições estabelecidas anteriormente por Guerrero et al. (1997), sendo estes:

1. Amplificação de alelos tipo *kdr*

Mix Alelo Susceptível

- 10,0 µL de Master Mix (4,0 mM MgCl₂, 150 mM de Tris-HCl pH 8,5, 40 mM de (NH₄)₂SO₄, 0.2% Tween 20, 0.4 mM de dNTPs e 0.05 unidades/µL taq DNA polimerase).
- 2 pmol de primer FG 130 (5' - TAC TGT TGT CAT CGG CAA TC -3').
- 2 pmol de primer FG 138 (5' - CAA TAT TAC GTT TCA CCC AG -3).
- 2 pmol de primer FG 234 (5' -CTT CTT CAT CGG TGT AGC - 3').
- 2 pmol de primer FG 243 (5' -GGC ATG GCT TTC CGT GTC C - 3).
- 8,2 µL de água ultra-pura.
- 100 ng de DNA diluído.

Mix Alelo Resistente

- 10,0 µL de Master Mix (4,0 mM MgCl₂, 150 mM de Tris-HCl pH 8,5, 40 mM de (NH₄)₂SO₄, 0.2% Tween 20, 0.4 mM de dNTPs e 0.05 units/µL taq DNA polimerase);
- 2 pmol de primer FG 134 (5' -TAC TGT TGT CAT CGG CAA TT -3'')
- 2 pmol de primer FG 138 (5' - CAA TAT TAC GTT TCA CCC AG -3)
- 2 pmol de primer FG 234 (5' -CTT CTT CAT CGG TGT AGC - 3')
- 2 pmol de primer FG 243 (5' -GGC ATG GCT TTC CGT GTC C - 3)
- 8,2 µL de água ultra-pura
- 100 ng de DNA.

Condições de amplificação: Foram testadas oito temperaturas de anelamento para os *primers*, sendo que estas variaram de 55,7 °C a 65 °C, sendo a temperatura de 55,7 °C considerada como ótima para as condições de amplificação avaliadas. As condições de amplificação estabelecidas para a amplificação de alelos tipo *kdr* foi:

- Desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos

35 ciclos de:

- 94°C por 1 minuto.
- 57,5°C por 1 minuto.
- 72°C por 1 minuto.
- Extensão final a 72°C por 7 minutos.

As amostras de *H. irritans* amplificadas para caracterização dos alelos de resistência tipo *kdr* com *amplicons* de 285 pb para *kdr* e 154 pb para GAPDH foram visualizadas em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo (Figura 1).

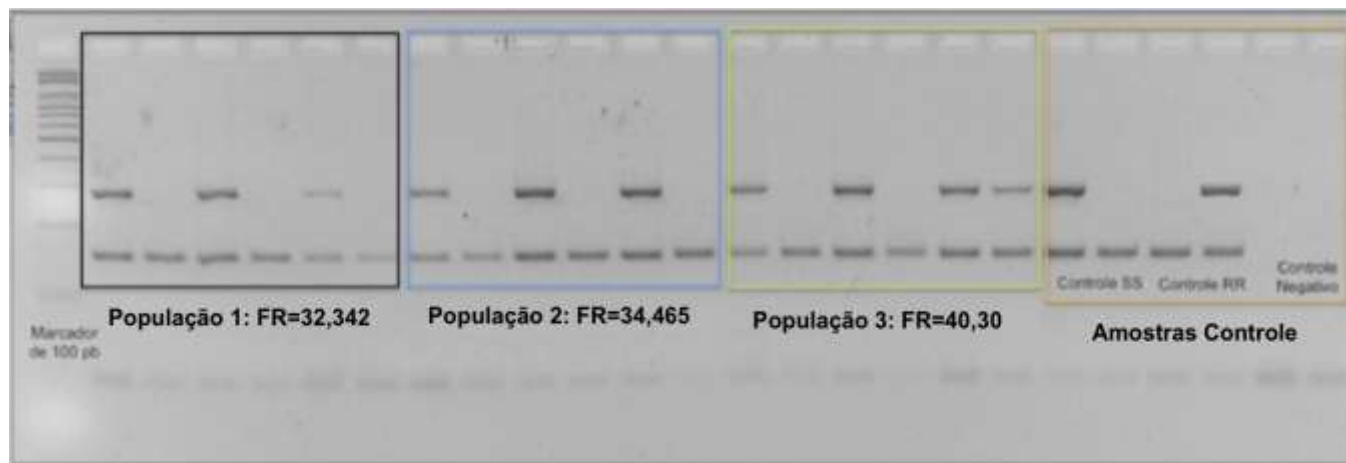


Figura 1. Gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo com produtos de amplificação das amostras de DNA de *Haematobia irritans* genotipadas para KDR, mutação que confere resistência aos pesticidas piretroides. Onde: Marcador 100pb = padrão de pares de bases; Controle SS = amostras controle de moscas com genótipo para suscetibilidade; RR= amostras controle de moscas com genótipo para resistência.
Fonte: Elaborado pelos autores.

2. Amplificação de alelos tipo super-kdr

Mix Alelo Susceptível

- 10,0 μ L de Master Mix (4,0 mM MgCl₂, 150 mM de Tris-HCl pH 8.5, 40 mM de (NH₄)₂SO₄, 0.2% Tween 20, 0.4 mM de dNTPs e 0.05 units/ μ l taq DNA polimerase).
- 2 pmol de primer FG 154 (5'- ACC CAT TGT CCG GCC CA -3').
- 2 pmol de primer FG 235 (5' – CTT CGT GTA TTC AAA TTG GCA -3').
- 2 pmol de primer FG 234 (5' –CTT CTT CAT CGG TGT AGC – 3').
- 0,2 μ L de primer FG 243 (5' –GGC ATG GCT TTC CGT GTC C – 3).
- 8,2 μ L de água ultra-pura.
- 100 ng de DNA.

Mix Alelo Resistente

- 10,0 μ L de Master Mix (4,0 mM MgCl₂, 150 mM de Tris-HCl pH 8.5, 40 mM de (NH₄)₂SO₄, 0.2% Tween 20, 0.4 mM de dNTPs e 0.05 units/ μ l taq DNA polimerase).
- 2 pmol de primer FG 155 (5' – ACC CAT TGT CCG GCC CG -3').
- 2 pmol de primer FG 235 (5' – CTT CGT GTA TTC AAA TTG GCA -3').
- 2 pmol de primer FG 234 (5' –CTT CTT CAT CGG TGT AGC – 3').
- 2 pmol de primer FG 243 (5' –GGC ATG GCT TTC CGT GTC C – 3).
- 8,2 μ L de água ultra-pura.
- 100 ng de DNA.

Condições de amplificação: Também foram testadas oito temperaturas de anelamento para os *primers*, sendo que estas variaram de 55,7° a 65°C, sendo a

temperatura de 55,7°C considerada como ótima para as condições de amplificação avaliadas. As condições de amplificação estabelecidas para a amplificação de alelos tipo skdr foram:

- Desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos
- 35 ciclos de:
 - 94°C por 1 minuto
 - 57,5°C por 1 minuto
 - 72°C por 1 minuto
 - Extensão final a 72°C por 7 minutos

As amostras de *H. Irritans* amplificadas para caracterização dos alelos de resistência tipo skdr com *amplicons* de 74 pb para super-kdr e 154 pb para GAPDH foram visualizadas em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo (Figura 2).

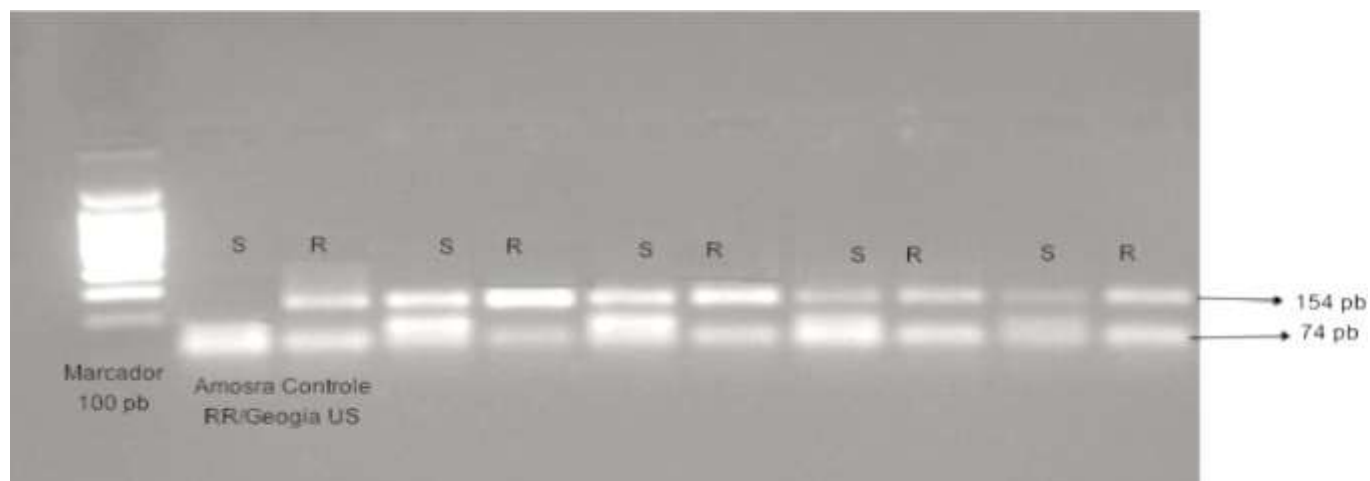


Figura 2. Gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo com produtos de amplificação das amostras de DNA de *Haematobia irritans* genotipadas para super-KDR, mutação que confere resistência aos pesticidas piretroides. Onde: Marcador 100pb = padrão de pares de bases; Controle SS = amostras de moscas com genótipo para suscetibilidade; RR = amostras de moscas com genótipo para resistência.

Fonte: Elaborado pelos autores.

Buscando a caracterização genotípica da resistência a pesticidas piretroides, amostras de DNA de espécimes brasileiros de *H. Irritans* genotipados como *kdr* resistentes homozigoto (RR) e *skdr* heterozigotos (SR) a pesticidas piretroides foram submetidas a reação de sequenciamento para avaliação da presença das mutações que conferem a resistência ao pesticida.

Foram sequenciados somente os alelos *kdr* e *skdr* R proveniente das populações avaliadas de moscas-dos-chifres. Os *amplicons* foram clonados no vetor pGEM[®]-T Easy Vector Systems vector (Promega) e transformados em *Escherichia coli* (DH5 α). As colônias brancas foram selecionadas e incubadas a 37 ± 1 °C "overnight" sob agitação. Após a confirmação da presença do fragmento de PCR no vetor, as amostras foram purificadas e sequenciadas no equipamento Applied Biosystems/HITACHI ABI Prism[®] 3100 Avant Genetic Analyzer, usando o kit Big Dye terminator v.3.1.

As sequências *kdr* e *skdr* provenientes das populações brasileiras de *H. irritans* foram confrontadas com a sequências de referência de *H. irritans* que contêm as mutações que conferem a

resistência a pesticidas piretroides e encontram-se depositadas no banco público de nucleotídeos *GenBank* (U83874.1, U83873.1, U83872.1 e U83871.1,) utilizando-se o algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Zheng et al., 2000).

A alta homologia encontrada entre a sequência do alelo *kdr* R obtida a partir da população de *H. Irritans* com FR = 40,30 e as sequência de referência demonstra a presença da mutação resultante da substituição do aminoácido Leucina por Fenilalanina no fragmento S6 da transmembrana do domínio II no gene do canal de sódio nas populações brasileiras de mosca-dos-chifre (Figura 3).

Em relação a segunda mutação no domínio II da transmembrana S4-S5 do canal de sódio, caracterizada pela substituição do aminoácido Metionina por Treonina e que confere à mosca-dos-chifres o fenótipo de alta resistência aos inseticidas piretroides conhecido como *super-kdr*, foi possível sua caracterização na população de *H. Irritans* de Nova União, o que comprova a presença de populações brasileiras com alta resistência a pesticidas piretroides (Figura 4).

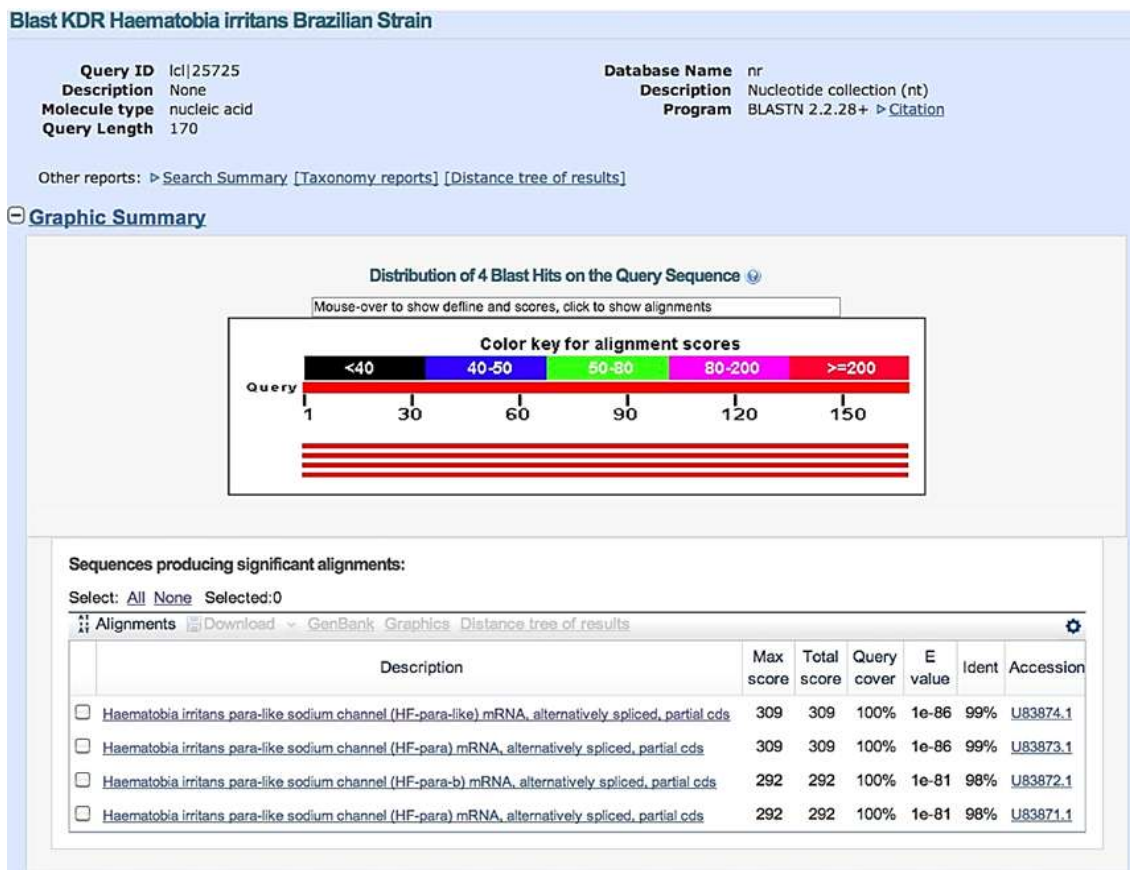


Figura 3. Análise de homologia entre as sequências nucleotídicas do alelo kdr resistente (R) da população brasileira de *Haematobia irritans* com as sequências nucleotídicas de referência depositadas no GenBank.

Fonte: Elaborado a partir de pesquisa na base de dados de dados do GenBank (2013)

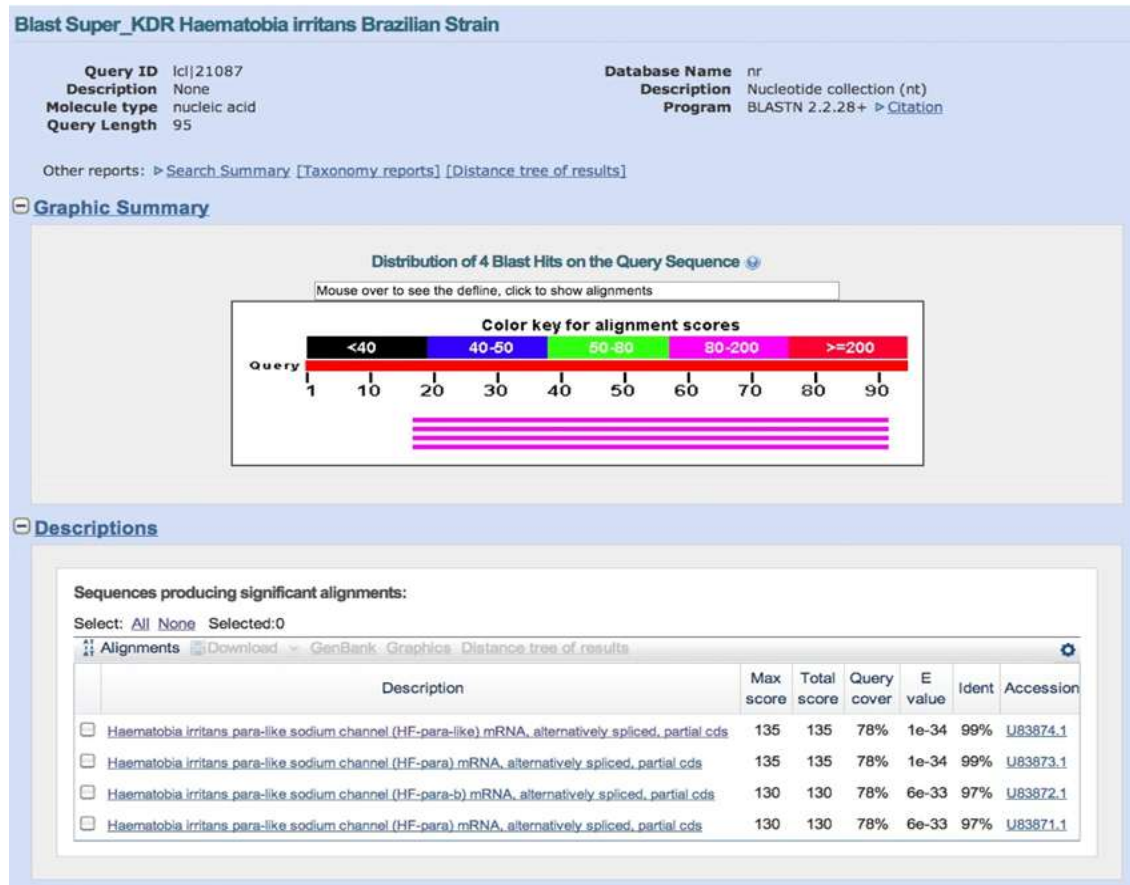


Figura 4. Análise de homologia entre as sequências nucleotídicas do alelo super kdr resistente (R) da população brasileira de *Haematobia irritans* com as sequências nucleotídicas de referência depositadas no GenBank.

Fonte: Elaborado a partir de pesquisa na base de dados de dados do GenBank (2013)

Considerações

A detecção precoce da resistência em populações da mosca-dos-chifres é o melhor e menos dispendioso caminho para a mitigação dos problemas da resistência e o manejo adequado das moléculas inseticidas (BRENT, 1986). Rebanhos bovinos onde a emergência de populações de moscas apresenta alta frequência de alelos para resistência possuem os fatores predisponentes à dispersão destes alelos em populações suscetíveis, agravando cada vez mais o problema.

A utilização das provas moleculares diagnósticas de resistência a pesticidas piretróides fundamentada na genotipagem de alelos *kdr* e *skdr* é uma opção viável e adequada também para as populações brasileiras de *H. irritans*, uma vez que foram detectadas as mutações em espécimes nativos da mosca-dos-chifres. Desta forma, a genotipagem de espécimes oriundos de populações da mosca-dos-chifres brasileiras mostra-se como uma ferramenta eficiente e de alta confiabilidade para utilização em estratégias de controle da mosca-dos-chifres, uma vez que permite a detecção precoce da resistência a pesticidas nas populações, além de possibilitar estimar a frequência de alelos resistentes nas populações.

Referências

BRENT, K. J. Detection and monitoring of resistant forms: an overview. In: National Academic of Science (Ed.). **Pesticides resistance: strategies and tactics for management**. Washington: Academic Press, 1986. p. 298-312.

GENBANK. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: 14 maio 2013.

GEORGHIOU, G. P. The magnitude of the resistance problem. In: COMMITTEE ON STRATEGIES FOR THE MANAGEMENT OF RESISTANT PEST POPULATIONS. **Pesticide resistance: strategies and tactics for management**. Washington, D.C.: National Academy Press, 1986. p.14-43.

GEORGHIOU, G. P. Overview of Insecticide Resistance. In: GREEN, M. B.; LEBARON, H. M.; MOBERG, W.K. (Ed.). **Managing resistance to agrochemicals: from fundamental research to practical strategies**. Washington D.C.: American Chemical Society, 1990, v. 421. p.18-41.

GUERRERO, F. D.; JAMROZ, R. C.; KAMMLAH, D.; KUNZ, S. E. Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: Identification of *kdr* and *super-kdr* point mutations. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 27, n. 8/9, p. 745-755,

HEAD, D. J.; MCCAFFERY, A. R.; CALLAGHAN, A. Novel mutations in the *para*-homologous sodium channel gene associated with phenotypic expression of nerve insensitivity resistance to pyrethroids in *Heliothine lepidoptera*. **Insect Molecular Biology**, v. 7, n.2, p.191-196, 1998.

JAMROZ, R. C.; GUERRERO F. D.; KAMMLAH, D.; KUNZ, S. E. Role of the *kdr* and *super-kdr* sodium channel; mutations in pyrethroid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 28, n. 12, p.1031-1037, 1998.

LI, A. Y.; GUERRERO, F. D.; ALMAZAN, C. A.; GEORGE, J. E. Survey of resistance to permethrin and diazinon and the use of a multiplex polymerase chain reaction assay to detect resistance alleles in the horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L.). **Journal of Medical Entomology**, Lanhan, v. 40, n. 6, p. 942-949, 2003.

SAS Institute (Cary, NC). SAS/INSIGHT User's Guide. Version 9.1.3. Cary, NC: SAS, 2003.

SHEPPARD, D. C.; HINKLE, N. C. Field procedure using disposable materials to evaluate horn fly insecticide resistance. **Journal of Agricultural Entomology**, Clemson, v. 4, n. 1, p. 87-89, 1987.

WILLIAMSON, M. S.; MARTINEZ-TORRES, D.; HICK, C. A.; DEVONSHIRE, A. L. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 252, n.1/2, p. 51-60, 1996.

**Circular
Técnica, 130**

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

BRASIL
PAÍS RICO E SEM Pobreza

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Rondônia
BR 364 km 5,5, Caixa Postal 127,
CEP 76815-800, Porto Velho, RO.
Fone: (69)3901-2510, 3225-9384/9387
Telefax: (69)3222-0409
www.cpafro.embrapa.br

1ª edição
1ª impressão (2013): 100 exemplares

**Comitê de
Publicações**

Presidente: *Cléberson de Freitas Fernandes*
Secretárias: *Marly de Souza Medeiros e*
Sílvia Maria Gonçalves Ferradaes
Membros: *Marília Locatelli*
Rodrigo Barros Rocha
José Nilton Medeiros Costa
Ana Karina Dias Salman
Luiz Francisco Machado Pfeifer
Fábio da Silva Barbieri
Maria das Graças Rodrigues Ferreira

Expediente

Normalização: *Daniela Maciel*
Revisão de texto: *Wilma Inês de França Araújo*
Editoração eletrônica: *Marly de Souza Medeiros*