**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Suscetibilidade a inseticidas e estruturação genética em
populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera:
Noctuidae) de diferentes regiões do Paraguai e Brasil**

Osmar René Arias Ruíz Díaz

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2017**

Osmar René Arias Ruíz Díaz
Engenheiro Agrônomo

**Suscetibilidade a inseticidas e estruturação genética em populações de
Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) de diferentes
regiões do Paraguai e Brasil**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **CELSO OMOTO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

**Piracicaba
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Arias Ruíz Díaz, Osmar René

Suscetibilidade a inseticidas e estruturação genética em populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) de diferentes regiões do Paraguai e Brasil / Osmar René Arias Ruíz Díaz. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2017.

87 p.

Tese (Doutorado) - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Resistência 2. Diversidade genética 3. Lagarta-do-cartucho 4. Monitoramento 5. Marcador microssatélite I. Título

A **Dios** por el Don de la Vida y la buena salud para alcanzar esta Meta

Agradezco

A mi mayor incentivo, mi hija **VICTORIA ANABELLA**

A mi amada novia **LAURA** por el apoyo incondicional

A mis padres, **FRANCISCO** y **REGINA** por el gran amor
que siempre depositaron en mí y por enseñarme
los buenos valores de la vida

A mis hermanos **Mirian, Angel, Rubén** y **Rony** por el
apoyo constante

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso Omoto, pela confiança, pelo ensinamento e por ter me dado a oportunidade de trabalhar sob a sua orientação.

Ao Prof. Dr. Alberto Corrêa, pelas valiosas sugestões e ensinamento que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

À Coordenação do Programa de Pós-graduação em Entomologia da ESALQ - USP por ter me dado a oportunidade de fazer o curso de Doutorado.

À Facultad de Ciencias Agrárias da Universidad Nacional de Asunción (FCA/UNA), por me conceder licença para fazer o curso de Doutorado.

Ao Comitê Brasileiro de Ação à Resistência a Inseticidas (IRAC-BR) pelo apoio logístico e financeiro para a execução da pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da ESALQ, pelos ensinamentos e bons conselhos que sem dúvida serão de grande utilidade no meu futuro como pesquisador.

Aos colegas/amigos do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle (ESALQ/USP): Anderson Bolzan, Daniela Okuma, Daniel Bernardi, Douglas Amado, Ewerton Lira, Fernando Semmelroth, Ingrid Schmidt, Mariana Durigan, Oderlei Bernardi, Patrick Dourado, Renato Horikoshi, Rogerio Machado, Rogerio Nascimento e Rubens Kanno pelos bons momentos de trabalho, companheirismo, amizade e apoio constante.

Ao Programa de Estudante Convênio de Pós-Graduação da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PEC-PG/CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À pesquisadora Dra. Eloisa Salmeron do Laboratório de Resistencia de Artrópodes a Táticas de Controle (ESALQ/USP), pelo apoio, amizade e auxílios prestados durante a realização dos experimentos.

A todos os estagiários do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle (ESALQ/USP).

Aos colegas da Faculdade de Ciencias Agrarias - UNA, Victor Gómez, Edgar Gaona, María Ramírez, pelo apoio e motivação para acabar o Doutorado.

Às bibliotecárias Eliana Maria Garcia e Sílvia Maria Zinsly da Biblioteca Central (ESALQ/USP) pelo auxílio na formatação deste trabalho.

Aos colegas, Luis Salinas, Helio Gill, Nigel López e Eduardo Rodriguez, pela ajuda e suporte logístico para realizar as coletas de populações de *S. frugiperda* no Paraguai.

Aos colegas, Lorena Marini e Giselle Villalba, pela ajuda fundamental na criação e manutenção das populações de *S. frugiperda* para bioensaios toxicológicos.

Aos colegas e amigos, Fernando Cabezas, Tânia Bayer, Ignacio Achon, Hugo Gonzalez, Arnaldo Esquivel, Enrique Lurman, Federico Gonzalez, Adrian Correa e José Lesme, pelos bons momentos compartilhados durante o tempo de doutorado em Piracicaba.

Aos pós-doutorado Felipe Domingues, Erick Cordeiro e Aline Guidolin pelo suporte durante a realização das análises moleculares.

A Instituto de Biotecnologia Agrícola del Paraguay (INBIO), pelo apoio econômico para construção e equipamento do Laboratorio de Bioensayos Entomológicos FCA/UNA.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
1 INTRODUÇÃO	13
Referências	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Aspetos bioecológicos de <i>Spodoptera frugiperda</i>	19
2.2 Resistência de <i>Spodoptera frugiperda</i> a inseticidas	21
2.3 Estrutura genética e fluxo gênico: implicações para programas de manejo da resistência	23
Referências	29
3 SUSCETIBILIDADE AOS INSETICIDAS FLUBENDIAMIDE E LUFENURON EM POPULAÇÕES DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) COLETADAS NO PARAGUAI E BRASIL	41
Resumo	41
Abstract	41
3.1 Introdução	42
3.2 Material e Métodos	44
3.2.1 Coleta de populações de <i>S. frugiperda</i>	45
3.2.2 Criação e manutenção das populações de <i>S. frugiperda</i>	48
3.2.3 Caracterizações da suscetibilidade de <i>S. frugiperda</i> aos inseticidas flubendiamide e lufenuron	48
3.3 Resultados	50
3.3.1 Caracterização da suscetibilidade a flubendiamide em populações de <i>S. frugiperda</i> do Paraguai e Brasil	50
3.3.2 Caracterização da suscetibilidade a lufenuron em populações de <i>S. frugiperda</i> do Paraguai e Brasil	53
3.4 Discussão	56
3.5 Conclusões	59
Referências	59

4 DIVERSIDADE GENÉTICA E FLUXO GÊNICO EM POPULAÇÕES DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) DO PARAGUAI E BRASIL	65
Resumo	65
Abstract	65
4.1 Introdução	66
4.2 Material e Métodos	68
4.2.1 Insetos.....	68
4.2.2 Extração de DNA.....	70
4.2.3 Caracterização das raças de <i>S. frugiperda</i>	71
4.2.4 Amplificação e genotipagem dos marcadores microssatélites	71
4.2.5 Análise dos dados de microssatélites	74
4.3 Resultados	75
4.3.1 Caraterização das raças de <i>S. frugiperda</i>	75
4.3.2 Índice de diversidade genética e fluxo gênico	76
4.4 Discussão.....	80
4.5 Conclusões.....	82
Referências	83

RESUMO

Suscetibilidade a inseticidas e estruturação genética em populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) coletadas na cultura de milho (*Zea mays* L.) de diferentes regiões do Paraguai e Brasil

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) tem sido uma das pragas mais importantes da cultura do milho no Paraguai e Brasil. Este trabalho foi realizado para subsidiar programas de manejo de resistência no Paraguai, reconhecendo-se a proximidade das fronteiras agrícolas desse país com Brasil e a alta capacidade de dispersão de *S. frugiperda*. Para tanto, foram realizados estudos de caracterização da suscetibilidade aos inseticidas lufenuron e flubendiamide e de diversidade genética e o fluxo gênico em populações de *S. frugiperda* coletadas nas principais regiões produtoras de milho do Paraguai e de dois Estados fronteiriços do Brasil (Mato Grosso do Sul e Paraná). O método de bioensaio para a caracterização das linhas-básica de suscetibilidade foi o de tratamento superficial da dieta artificial com o inseticida. As variações na suscetibilidade a lufenuron e flubendiamide entre as populações de *S. frugiperda* testadas foram baixas (< 4 vezes), comparando-se as populações das regiões Oriental e Ocidental do Paraguai que apresentam características climáticas distintas ou entre as populações do Paraguai e do Brasil. Para o monitoramento da suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* no Paraguai foram definidas as doses diagnósticas, baseada na DL_{99} , de $0,16 \mu\text{g}$ de lufenuron. cm^{-2} (equivalente a $10 \mu\text{g}$ de lufenuron. mL^{-1} de água) e $2,84 \mu\text{g}$ de flubendiamide. cm^{-2} ($180 \mu\text{g}$ de flubendiamide. mL^{-1} de água). Mediante o uso de 12 loci microssatélites, foram verificadas maior diversidade genética dentro das populações (87,70%) quando comparada entre as populações de cada país (9,91%) e entre países (2,39%). Sendo assim, não foi constatada alta estruturação genética entre as populações de *S. frugiperda* coletadas no Paraguai e Brasil. As populações do Paraguai mostraram-se mais distintas entre si quando comparadas com as populações do Brasil. Nossos resultados apontam baixa estruturação genética e moderado/alto fluxo gênico entre as localidades de coleta de populações de *S. frugiperda* e entre as populações do Paraguai e Brasil. Os resultados obtidos na presente pesquisa servirão para a implementação de um programa de manejo da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas no Paraguai, com ênfase na necessidade de ações no âmbito regional considerando os estados fronteiriços do Brasil.

Palavras-chave: Resistência; Diversidade genética; Lagarta-do-Cartucho; Monitoramento; Marcador Microssatélite

ABSTRACT

Susceptibility to insecticides and genetic structure in populations of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize (*Zea mays* L.) from different regions of Paraguay and Brazil

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) has been one of the most important corn pests in Paraguay and Brazil. This research was conducted to collect information to insect resistance management programs in Paraguay considering the proximity of agricultural borders of this country with Brazil and the high dispersal capacity of *S. frugiperda*. We conducted studies to characterize the susceptibility to the insecticides lufenuron and flubendiamide and to evaluate the genetic diversity and gene flow among *S. frugiperda* populations collected from major corn-producing regions in Paraguay and two frontier States of Brazil (Mato Grosso do Sul and Paraná). The bioassay method to characterize the baseline susceptibility was the diet surface treatment with the insecticide. The variation in the susceptibility to lufenuron and flubendiamide among *S. frugiperda* populations tested was low (< 4 -fold) by comparing populations from Eastern and Western regions of Paraguay with distinct climatic conditions or populations from Paraguay and Brazil. For susceptibility monitoring to lufenuron and flubendiamide in *S. frugiperda* populations in Paraguay, we defined the diagnostic doses based on LD_{99} of $0.16 \mu\text{g}$ of lufenuron. cm^{-2} (equivalent to $10 \mu\text{g}$ of lufenuron. mL^{-1} of water) and $2.84 \mu\text{g}$ of flubendiamide. cm^{-2} ($180 \mu\text{g}$ of flubendiamide. mL^{-1} of water). Using 12 microsatellite loci, higher genetic diversity within populations (87.70%) than among populations within each country (9.91%) and between countries (2.39%). Thus, there was no high genetic structure between *S. frugiperda* populations collected in Paraguay and Brazil. The populations of *S. frugiperda* from Paraguay were more distinct among themselves when compared with the populations from Brazil. Our results suggest low genetic structure and moderate/high gene flow among different sampling locations of *S. frugiperda* populations as well as between populations from Paraguay and Brazil. The results obtained in this research will support the implementation of resistance management programs of *S. frugiperda* to insecticides in Paraguay with focus on the need of plan of actions at regional level considering the border States of Brazil.

Keywords: *Spodoptera frugiperda*; Genetic diversity; Fall armyworm; Monitoring; Microsatellite marker

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – Localidades de coleta de diferentes populações de <i>S. frugiperda</i> para bioensaios toxicológicos.....	46
Figura 3.2 - Log dose-resposta a flubendiamide em populações de <i>S. frugiperda</i> do Paraguai.....	52
Figura 3.3 - Log dose-resposta a flubendiamide em populações de <i>S. frugiperda</i> do Brasil	52
Figura 3.4 - Log dose-resposta a lufenuron em populações de <i>S. frugiperda</i> do Paraguai	55
Figura 3.5 - Log dose-resposta a lufenuron em populações de <i>S. frugiperda</i> do Brasil	55
Figura 4.1- Localidades de coletas de diferentes populações de <i>S. frugiperda</i> para caracterização de raças	69
Figura 4.2- Gráfico obtido do aplicativo STRUCTURE conduzida para indivíduos de <i>S. frugiperda</i> , com K = 6. Cada grupo (k) com suas similaridades alélicas representadas por uma cor, cada indivíduo é representado por uma barra vertical.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1- Localidades de coletas de populações de <i>S. frugiperda</i> para caracterização da suscetibilidade aos inseticidas flubendiamide e lufenuron	47
Tabela 3.2- Caracterização de dose-resposta de lagartas do terceiro instar de <i>S. frugiperda</i> expostas ao tratamento superficial da dieta com o inseticida flubendiamide coletadas no Paraguai e Brasil.....	51
Tabela 3.3- Caracterização de dose-resposta de lagartas do terceiro instar de <i>S. frugiperda</i> expostas ao tratamento superficial da dieta com o inseticida lufenuron coletadas no Paraguai e Brasil.....	54
Tabela 3.4- Análise conjunta das populações de <i>S. frugiperda</i> coletadas no Paraguai e Brasil pelo complemento log-log (gompertz)	56
Tabela 4.1- Localidades onde foram realizadas as coletas de <i>S. frugiperda</i> para caracterização molecular	69
Tabela 4.2- Características dos 12 loci de microssatélite para <i>S. frugiperda</i>	73
Tabela 4.3- Número de indivíduos de <i>S. frugiperda</i> das raças milho e arroz coletado em diferentes regiões do Paraguai e nas regiões fronteiriças do Brasil.....	75
Tabela 4.4- Características das nove populações amostradas de <i>S. frugiperda</i> , para 10 loci polimórficos de microssatélite: tamanho médio das amostras sobre todos os locus (n); número médio de alelos por locus ($A/loco$); número de alelos privados ($A_{PRIV.}$); heterozigosidade esperada (H_E); heterozigosidade observada (H_O); e coeficiente de endogamia (F_{IS}).....	77
Tabela 4.5- Índice de diferenciação genética F_{IT} , F_{ST} e F_{IS} (WEIR; COCKERHAM, 1984) e R_{ST} (SLATKIN, 1995) para populações de <i>S. frugiperda</i>	78
Tabela 4.6- Análise de variância molecular (AMOVA) para estrutura genética em populações de <i>S. frugiperda</i>	78
Tabela 4.7- Matriz de pares de F_{ST} (WEIR; HILL, 2002) entre cada uma das populações de <i>S. frugiperda</i>	79

1 INTRODUÇÃO

Entre as pragas nativas do continente americano destaca-se *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), como uma das mais importantes em diversas culturas de importância econômica. Encontra-se distribuído em todos os países das Américas, desde o norte da Argentina até o sul do Canadá, apresentando uma alta capacidade de dispersão dos adultos (SPARKS, 1979; CRUZ et al., 1999; CAPINERA, 2008). Recentemente constatada a presença no continente Africano (GOERGEN et al., 2016). Nas condições de cultivos, os danos causados por *S. frugiperda* não se restringem somente na cultura do milho, visto que essa praga também ataca as culturas da soja, algodão, trigo e hortaliças (CRUZ, 1995; CASMUZ et al., 2010).

A cultura de milho é uma das mais importantes no Paraguai e Brasil, alcançando uma relevância socioeconômica, tanto por sua utilização para consumo humano e animal, assim como para exploração econômica aos produtores. O sistema de produção se caracteriza por grandes extensões altamente mecanizadas, alternadas principalmente com a cultura de soja. No Paraguai é a segunda cultura com maior área de cultivo, com aproximadamente 1.000.000 hectares, o que representa 40% da superfície agrícola do país (Camara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas - CAPECO, 2017). Até o ano 2012, predominavam o cultivo de variedades convencionais, mas atualmente estão disponíveis 16 eventos de milho transgênico liberados comercialmente para o cultivo (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Vegetal y de Semillas – SENAVE, 2017). Nesse contexto, o controle de *S. frugiperda* no Paraguai antes do ano de 2013 era realizado principalmente com a utilização de inseticidas, ocasionando elevada pressão de seleção sobre as populações de *S. frugiperda*, levando ao aumento da frequência de alelos que confere resistência aos principais inseticidas utilizados no seu controle.

Atualmente já foram reportados mais de 60 casos de resistência de *S. frugiperda* aos principais grupos químicos de inseticidas, incluindo piretroides, organofosforados, carbamatos e inibidores de biossínteses de quitina (YOUNG; MCMILLIAN, 1979; SCHMIDT, 2002; CARVALHO et al., 2013; DIEZ-RODRÍGUEZ;

OMOTO, 2001; NASCIMENTO et al., 2016; YU, 1984, 1991, 1992; YU; NGUYEN; ABO-ELGHAR, 2003).

A rápida evolução da resistência em populações de *S. frugiperda*, se deve em parte à alta polifagia, alta capacidade reprodutiva e alta capacidade de dispersão dos adultos, que permite a espécie colonizar rapidamente grandes áreas ao longo da distribuição das plantas hospedeiras. Soma-se a isso, o fato de não apresentar diapausa em nenhum estágio do seu desenvolvimento, o que contribui de forma preponderante na colonização de novas áreas em lugares mais distantes para a sobrevivência e reprodução (SPARKS, 1979; ANDREWS, 1988; NAGOSHI et al., 2015, 2017). Assim, a dispersão tem como resultado o aumento da variabilidade genética no agroecossistema, podendo afetar a estrutura genética das populações (ZION; YAARI; SHNERB, 2010).

Estudos de estruturação genética em *S. frugiperda* já foram realizados em algumas populações provenientes do Brasil e de outros países do continente americano (CLARK et al., 2007; MARTINELLI et al., 2006, 2007, SOUZA et al., 2015), demonstrando que a maior variabilidade genética se concentra dentro das populações, e que a mesma população da praga ataca as culturas do milho e algodão de uma determinada região agrícola em diferentes épocas do ano. Por outro lado, foi demonstrado que há estruturação de populações de *S. frugiperda* associadas à planta hospedeira no Brasil, com a confirmação da presença das raças “milho” e “arroz” (BUSATO et al., 2004, 2006). Nesse contexto, os marcadores moleculares são uma importante ferramenta para estudo da diversidade genética entre e dentro das populações de insetos (SUNNUCKS, 2000; BOSSART; PROWELL, 1998; ROLLINS; WOOLNOUGH; SHERWIN, 2006). Assim, marcadores microsatélites de *S. frugiperda* foram desenvolvidos para subsidiar estudos de genética de populações de insetos, apresentando as vantagens de serem altamente polimórficos e discriminatórios, podendo ser utilizados para monitorar a dispersão de insetos e subsidiar práticas de manejo regional (ARIAS et al., 2011; KASHI; KING, 2006; KASHI; KING; SOLLER, 1997; PAVINATO et al., 2013).

Do ponto de vista de Manejo de Resistência de Insetos (MRI), o conhecimento da diversidade genética e fluxo gênico entre diferentes populações de *S. frugiperda* é importante para refinar as estratégias de MRI. Neste contexto, sabendo-se que as fronteiras agrícolas entre Paraguai e alguns Estados do Brasil

são muito próximas e sem barreiras geográficas, o conhecimento da dinâmica populacional desta praga nessas regiões é necessário para subsidiar programas regionais de manejo da resistência, pois a evolução de resistência em um dos países pode interferir no manejo da praga em outro país, e portanto, as diferentes épocas de plantio e uso de inseticidas ou tecnologias Bt com similar mecanismo de ação pode influenciar de forma preponderante no controle da praga, já que as populações selecionadas durante o ciclo da cultura em um dos países pode dispersar para outro, e vice-versa, comprometendo assim as táticas de controle.

Portanto, estudos de suscetibilidade a inseticidas e estruturação populacional de *S. frugiperda* nesta região serão de extrema relevância, pois até então não há informações a respeito. O uso de inseticidas do grupo das diamidas e benzoilureias tem sido uma das opções viáveis de manejo de *S. frugiperda* no Paraguai. Contudo, ainda não há estudos de avaliação da suscetibilidade a inseticidas em populações do Paraguai para subsidiar programas de MRI. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram.

- Caracterizar a suscetibilidade aos inseticidas flubendiamide e lufenuron em diferentes populações de *S. frugiperda* provenientes do Paraguai e Estados fronteiriços do Brasil;
- Determinar doses diagnósticas de flubendiamide e lufenuron para monitoramento de resistência de populações de *S. frugiperda* no Paraguai;
- Avaliar a estrutura genética e diversidade molecular entre populações de *S. frugiperda* coletadas no Paraguai e Brasil.

Referências

ANDREWS, K. L. Latin American Research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **The Florida Entomologist**, v. 71, n. 4, p. 630, 1988.

ARIAS, R. et al. First microsatellites from *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and their potential use for population genetics. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, n. 3, p. 576–587, 2011.

BOSSART, J. L.; PROWELL, D. P. Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 13, n. 5, p. 202–206, 1998.

BUSATO, G. et al. Susceptibilidade de lagartas dos biótipos milho e arroz de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas com diferentes modos de ação. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 15–20, 2006.

BUSATO, G. R. et al. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 709–716, 2004.

CAMARA PARAGUAYA DE EXPORTADORES Y COMERCIALIZADORES DE CEREALES Y OLEAGINOSAS – CAPECO, **Área de siembra, producción y rendimiento**, 2017, Disponible em: <<http://capeco.org.py/area-de-siembra-produccion-y-rendimiento/>>

CAPINERA, J. Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **University of Florida**, v. EENY098, p. 1–6, 2008.

CARVALHO, R. A. et al. Investigating the Molecular Mechanisms of Organophosphate and Pyrethroid Resistance in the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1-11, 2013.

CASMUZ, A. et al. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, v. 69, n. 3–4, p. 209–231, 2010.

CLARK, P. L. et al. Population Variation of the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in the Western Hemisphere. **Journal of Insect Science**, v. 7, n. 5, p. 1–10, 2007.

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, **EMBRAPA: CNPMS**, 1995, p.45, (Circular Técnica 21).

CRUZ, I. et al. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International Journal of Pest Management**, v. 45, n. 4, p. 293–296, 1999.

DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 311–316, 2001.

FENG, H.; WU, X.; WU, B. O. Seasonal Migration of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) Over the Bohai Sea. **Journal of Economic Entomology**, v. 102, n. 1, p. 95–104, 2009.

GOERGEN, G. et al. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1–9, 2016.

KASHI, Y.; KING, D. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 5, p. 253–259, maio 2006.

KASHI, Y.; KING, D.; SOLLER, M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. **Trends in Genetics**, v. 13, n. 2, p. 74–78, fev. 1997.

MARTINELLI, S. et al. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 99, n. 2, p. 519–526, 2006.

MARTINELLI, S. et al. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. **Bulletin of Entomological Research**, v. 97, n. 3, p. 225–31, 2007.

NASCIMENTO, A. R. B. DO et al. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. **Pest Management Science**, v. 72, n. 4, p. 810–815, 2015.

NAGOSHI, R. N. et al. Haplotype profile comparisons between *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Mexico with those from Puerto Rico, South America, and the United States and their implications to migratory behavior. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 1, p. 135–144, 2015.

NAGOSHI, R. N. et al. Fall armyworm migration across the Lesser Antilles and the potential for genetic exchanges between North and South American populations. **Plos One**, v. 12, n. 2, p. e0171743, 2017.

PAVINATO, V. A C. et al. Microsatellite marker for genetic studies of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 1, p. 370–80, 2013.

ROLLINS, L. A.; WOOLNOUGH, A. P.; SHERWIN, W. B. Population genetic tools for pest management: a review. **Wildlife Research**, v. 33, n. 4, p. 251, 2006.

SERVICIO NACIONAL DE CALIDAD Y SANIDAD VEGETAL Y DE SEMILLAS - SENA. 2017, **Listado de eventos con modificación genética liberados comercialmente en el país**, Dirección de Bioseguridad Agrícola: Departamento de Manejo de Organismos Genéticamente Modificados, Asuncion, 2p.

- SCHMIDT, F. B. **Linha básica de suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a lufenuron na cultura do milho.** 2002 48 P. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- SOUZA, I. R. P. et al. Population Structure of *Spodoptera frugiperda* Collected in Maize from Different Brazilian Geographic Regions. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 14, n. 3, p. 300–315, 2015.
- SPARKS, A. N. A Review of the Biology of the Fall Armyworm. **The Florida Entomologist**, v. 62, n. 2, p. 82–87, 1979.
- SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, n. 5, p. 199–203, 2000.
- YOUNG, J. R.; MCMILLIAN, W. W. Differential Feeding by Two Strains of Fall Armyworm Larvae on Carbaryl Treated Surfaces. **Journal of Economic Entomology**, v. 72, n. 2, p. 202–203, 1979.
- YU, S. J. Microsomal sulfoxidation of phorate in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 23, p. 273–281, 1984.
- YU, S. J. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 39, n. 1, p. 84–91, 1991.
- YU, S. J. Detection and Biochemical-Characterization of Insecticide Resistance in Fall Armyworm (Lepidoptera, Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 85, n. 3, p. 675–682, 1992.
- YU, S. J.; NGUYEN, S. N.; ABO-ELGHAR, G. E. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 77, n. 1, p. 1–11, 2003.
- ZION, Y. B.; YAARI, G.; SHNERB, N. M. Optimizing metapopulation sustainability through a checkerboard strategy. **PLoS Computational Biology**, v. 6, n. 1, p. 21–24, 2010.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos biecológicos de *Spodoptera frugiperda*

A lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), nativa da região tropical e subtropical do continente americano (CAPINERA, 2008; NAGOSHI et al., 2017; POGUE, 2002), é considerada uma das pragas mais importantes na cultura de milho *Zea mays* L., apresentando hábito polífago e atacando outras plantas hospedeiras de importância econômica, tais como arroz *Oryza sativa* L., algodão *Gossypium hirsutum* L., soja *Glycine max* L. Merrill, trigo *Triticum aestivum* L., cana de açúcar *Saccharum officinarum* L., e algumas hortaliças (CASMUZ et al., 2010; CRUZ, 1995; FIGUEREDO, PENTEADO-DIAS, CRUZ, 2005). Recentemente tem sido reportada como praga invasora na África, distribuindo-se na região oeste e centro deste continente (GOERGEN et al., 2016). A habilidade de explorar diferentes plantas hospedeiras contribuiu para a separação de duas linhagens geneticamente distintas pero morfológicamente idênticas, com hábitos comportamentais e fisiológicas bem definidas; que hoje dia é conhecido como raça “milho” atacando milho, sorgo e algodão e raça “arroz” que apresenta preferência pela cultura de arroz e pastagem (NAGOSHI; MEAGHER, 2004; PASHLEY, 1986; PASHLEY; MARTIN, 1987). Estas raças já foram identificadas e caracterizadas nos EUA (NAGOSHI et al., 2015; NAGOSHI; MEAGHER, 2004, 2016; PASHLEY; MARTIN, 1987), Argentina (JUÁREZ et al., 2012), Colômbia (RÍOS-DÍEZ; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2011; VÉLEZ-ARANGO et al., 2008), México (PECINA-QUINTERO et al., 2015; ROSAS-GARCÍA et al., 2016), e no Brasil (BUSATO et al., 2004; NAGOSHI; SILVIE; MEAGHER, 2007). Também foi constatado que os indivíduos pertencente à raça “milho” apresentam menor suscetibilidade a inseticidas de alguns grupos químicos e à proteína de *Bacillus thuringiensis* (BUSATO et al., 2006; CANO-CALLE; ARANGO-ISAHA; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2015; RÍOS-DÍEZ; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2011).

Do ponto de vista de manejo de resistência de insetos a inseticidas MRI, o hábito polífago pode colaborar para retardar a evolução da resistência devido à imigração de indivíduos suscetíveis de hospedeiros não tratadas para as culturas tratadas com inseticidas (ALTIERI; VAN SCHOONHOVEN; DOLL, 1977; GEORGHIOU; TAYLOR, 1977a). Entretanto, com o cenário agrícola atual, onde

diferentes espécies de vegetais são plantadas em áreas vizinhas durante todo o ano com alta utilização de inseticidas sintéticos para proteger as culturas e associada à alta capacidade de dispersão, faz com que as populações de *S. frugiperda* sejam expostas à alta pressão de seleção em vários agroecossistemas durante uma safra e, assim, contribuindo para acelerar a evolução da resistência a um determinado agente de controle (BRATTSTEN et al., 1986; KENNEDY; STORER, 2000; NAGOSHI et al., 2017; RISCH; ANDOW; ALTIERI, 1983).

Nos últimos anos, a ocorrência de *S. frugiperda* tem sido comum nas plântulas de milho logo após a sua emergência, causando redução no número de plantas na área, principalmente em milho de segunda safra. Esta praga ataca também em outras fases de desenvolvimento da cultura causando severos danos, inclusive na fase reprodutiva, durante a formação da espiga e dos grãos (CRUZ; FIGUREDO; OLIVEIRA; VASCONCELOS, 1999; CRUZ; TURPIN, 1982; CRUZ, 1995; FARINELLI; FILHO, 2006).

As fêmeas de *S. frugiperda* são altamente fecundas, podendo colocar mais de 1500 ovos durante toda sua vida. O ciclo de vida de *S. frugiperda* varia entre 30 a 90 dias, dependendo das condições climáticas e do hospedeiro, mas no verão o período de incubação dos ovos é de três dias, a duração dos estágios de larva é de 14 dias, passando por seis ou sete instares, pré-pupa de um dia, pupa de oito a nove dias e os adultos vivem em média 10 dias (BARROS; TORRES; BUENO, 2010; BOREGAS et al., 2013; CAPINERA, 2008; JOHNSON, 1987). Assim, nas condições de Paraguai e Brasil, pode apresentar até 3 gerações para cada ciclo da cultura do milho.

Os adultos de *S. frugiperda* apresentam alta capacidade de dispersão, distribuindo-se rapidamente em toda a extensão da cultura, podendo espalhar para outras regiões quando o alimento é escasso. Outra característica desta praga é que não apresenta diapausa em nenhum estágio de desenvolvimento, e consequentemente precisa estar sempre em contato com seu hospedeiro para sobreviver, contribuindo de forma preponderante na colonização de novas áreas em lugares mais distantes (SPARKS, 1979; PAIR et al., 1986; PASHLEY; JOHNSON; SPARKS, 1985; WESTBROOK et al., 2016). Nos EUA, durante o inverno os adultos sobrevivem no sul da Flórida e Texas; posteriormente, as mariposas migram durante a primavera, verão e outono ao norte do país até o Canadá (NAGOSHI; MEAGHER, 2004; WESTBROOK et al., 2016). No Paraguai e Brasil, em função do alimento

diversificado e disponível durante o ano todo, e das condições climáticas favoráveis, *S. frugiperda* encontra-se distribuído em todas as regiões, mudando de hospedeiro dentro da mesma região conforme a época do ano (CRUZ, 1995; MARTINELLI et al., 2006, 2007).

No Paraguai, o padrão de distribuição está muito ligado ao cenário brasileiro, pois as condições climáticas e disponibilidade de hospedeiros são favoráveis para a sobrevivência e reprodução de *S. frugiperda* durante toda a temporada do ano, com ausência de frio intenso, principalmente na região norte, onde esta praga pode se dispersar para garantir sua sobrevivência em hospedeiros alternativos (ALTIERI; VAN SCHOONHOVEN; DOLL, 1977). Sendo assim, durante a primavera-verão tem como principal hospedeiro a cultura de milho mudando para as culturas de trigo e aveia na época de frio (MAG, 2014). *S. frugiperda* sempre foi uma praga de difícil controle, demandando uma alta utilização de inseticidas sintéticos de diferentes grupos químicos, com resultados insuficientes de controle (RUIZ et al., 2014; CRUZ et al., 1999; SENA et al., 2003).

2.2 Resistência de *S. frugiperda* a inseticidas

A resistência de insetos a inseticidas tem sido demonstrada em várias espécies de insetos-praga. A ocorrência da resistência está amplamente distribuída em todas as regiões agrícolas do mundo, sendo resultado da prolongada exposição a inseticidas que atua como forte pressão de seleção (GEORGHIOU; TAYLOR, 1986; PLAPP, 1976). A evolução da resistência de insetos a inseticidas tem sido considerada como um dos principais entraves para a implementação de programas de Manejo Integrado de Pragas MIP (LABBE; LENORMAND; RAYMOND, 2005). Trata-se de um processo dinâmico que depende de fatores genéticos, bioecológicos e operacionais (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977a, 1977b; ROUSH; MCKENZIE, 1987). Entre os mecanismos de resistência de insetos a inseticidas destacam-se a insensibilidade no sítio de ação, mudança no comportamento, aumento da atividade metabólica e redução na penetração de inseticidas pelo tegumento (BECKEL; LORINI; LAZZARI, 2006; CARVALHO et al., 2013; GEORGHIOU, 1994; LORINI; GALLEY, 2000; NASCIMENTO et al., 2015b).

O controle de *S. frugiperda* tem sido realizado quase que exclusivamente mediante pulverizações com inseticidas, o que exerce alta pressão de seleção

aumentando a frequência de alelos resistentes no campo ocasionando falhas no controle da praga com o uso de inseticidas. A resistência é considerada como um processo inevitável devido à pressão de seleção exercida pela aplicação contínua de um inseticida e a variabilidade genética das populações, mas pode ser retardada com a implementação de estratégias de manejo da resistência (FFRENCH-CONSTANT, 2007; FFRENCH-CONSTANT; DABORN; LE GOFF, 2004).

Casos de resistência de *S. frugiperda* para inseticidas de diferentes grupos químico já foram reportadas na literatura, assim, segundo a Arthropod Pesticide Resistance Database, (2016), na atualidade são conhecidos 67 casos de resistência, para 21 inseticidas sintéticos e três proteínas *Cry* expressadas em eventos de milho transgênico. O primeiro caso de resistência de *S. frugiperda* ocorreu no Paraguai no ano 1965 ao inseticida lindane (organoclorado), no entanto o primeiro caso reportado corresponde aos EUA (Florida) onde se constatou a resistência ao inseticida carbaril (carbamatos) (YOUNG; McMILLIAN, 1979), posteriormente caracterizada como aumento da atividade das enzimas monoxigenases dependentes do citocromo P450 (McCORD; YU, 1987).

Outros relatos de resistência a inseticidas em populações de *S. frugiperda* têm sido detectados para inseticidas pertencentes a principais grupos químicos, tais como organofosforados, carbamatos, piretroides, inibidores de biossíntese de quitina e espinosinas (DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001; NASCIMENTO et al., 2016; OKUMA, 2015; OMOTO et al., 2015; YU, 1991, 1992; YU; NGUYEN; ABO-ELGHAR, 2003). Casos de evolução da resistência em condições de campo a proteínas Bt expressas em plantas geneticamente modificadas também já foram reportadas (STORER et al., 2010; FARIAS et al., 2014; OMOTO et al., 2016).

Estudo de caracterização da suscetibilidade de *S. frugiperda* ao inseticida lufenuron já foi realizado no Brasil, determinado-se os valores da concentração diagnóstica (3,2 e 10 µg de lufenuron.mL⁻¹) para monitoramento da evolução da resistência em populações de *S. frugiperda* (SCHMITD, 2002). Posteriormente, com a seleção e caracterização da resistência de *S. frugiperda* a lufenuron foi possível verificar que há vários genes envolvidos na resistência, com grau de dominância recessiva (NASCIMENTO et al., 2015a). A partir de estudos de expressão genética diferencial utilizando sequenciamento de nova geração, foi verificada uma maior expressão de genes nos indivíduos de *S. frugiperda* resistentes em relação à

expressão nos indivíduos suscetíveis, principalmente de genes relacionados com as monoxigenases dependentes do citocromo P450 que estão envolvidos na detoxificação de xenobióticos (NASCIMENTO et al., 2015b).

Por outro lado, para os inseticidas do grupo mais novo, as diamidas, foram realizadas a caracterização das linhas-básica de suscetibilidade de várias populações de *S. frugiperda* a flubendiamide e chlorantraniliprole no Brasil, determinando-se as concentrações diagnósticas para o monitoramento da evolução da resistência de *S. frugiperda* a estes inseticidas (RIBEIRO, 2014). Também, verificou-se a partir da técnica de F₂ screen, que a frequência de alelos que confere resistência a chlorantraniliprole e flubediamide é baixa (menor a 10⁻³), ressaltando que medidas proativas de MRI devem ser tomadas para evitar que essa frequência aumente e comprometa aos inseticidas diamidas (RIBEIRO, 2014). Isto levando em consideração que indivíduos preadaptados já estão no campo (FFRENCH-CONSTANT, 2007).

2.3 Estruturação genética e fluxo gênico: implicações para programas de manejo da resistência

As populações de insetos são compostas por genótipos que podem ser distribuídos de forma estruturada no espaço e no tempo. A estrutura genética de populações de insetos descreve como estas populações se dividem em menores unidades finitas de acasalamento e é resultado das interações de vários processos evolutivos, como a seleção natural, deriva genética e a mutação (MARTINS, 1987; LOVELESS; HAMRICK, 1984; RODERICK, 1996). Assim, a estrutura genética de uma população refere-se a como as frequências de alelos e genótipos estão distribuídos no espaço e tempo (BROWN, 1978; RODERICK, 1996). Portanto, os fatores que afetam a reprodução e fluxo gênico são processos determinantes das frequências alélicas e genotípicas das populações de insetos (MARCHI et al., 2013). A migração ou fluxo gênico atua promovendo a homogeneidade genética, enquanto que mutação, deriva genética e seleção atuam favorecendo diferenciação genética de populações pelo fato que ajuda a se adaptar às condições ambientais locais (ENDERSBY et al., 2005; LYONS et al., 2012; LOVELESS; HAMRICK, 1984; BOHONAK, 1999). A alteração genética de uma população pode ser avaliada pela

mudança nas suas frequências gênicas, que é fundamental nos estudos evolutivos (FUTUYMA; PETERSON, 1985; NEI, 1978).

Estudos de estruturação genética se baseia no princípio de Hardy-Weinberg, que menciona que as frequências alélicas e genotípicas de uma população se mantém constante em sucessivas gerações, assumindo que está em equilíbrio, ou seja, na ausência de migração, mutação, seleção e deriva gênica. Portanto, por meio deste princípio é possível o cálculo das frequências genotípicas e qualquer alteração que se encontrasse poderia ser a causa da evolução (DUMAS et al., 2015a, 2015b; KEYGHOBADI; ROLAND; STROBECK, 2005).

O fluxo gênico é a transferência de genes entre populações distintas (FUTUYMA; PETERSON, 1985), assim as populações podem estar isoladas ou relacionadas pelo fluxo gênico (ENDERSBY et al., 2005; NAGOSHI et al., 2015; WEI et al., 2013), sendo um componente principal na estruturação populacional, pois determina até que ponto a população local de uma espécie é uma unidade evolutiva independente. Se há grande fluxo gênico entre as populações, todas elas evoluíram em forma conjunta, mas se for o contrário, cada população evoluiria de forma independente (BOSSART; PROWELL, 1998; KEYGHOBADI; ROLAND; STROBECK, 2005). À persistência da estrutura espacial das populações de insetos é determinada pela dispersão entre diferentes habitats (ZION; YAARI; SHNERB, 2010).

Conhecer a dispersão de insetos pragas é muito importante do ponto de vista de manejo de resistência. Assim, alto fluxo gênico entre populações infere na estabilidade de alelos de uma população no tempo, ocasionando a dispersão de genes que confere resistência de uma população a outra, mas também pode promover a diluição da resistência pela imigração de indivíduos suscetíveis (BOURGUET et al., 2000; CAPRIO; PARKER; SCHNEIDER, 2009; PETERSON; DENNO, 1998). Assim, a estrutura genética de uma população de insetos é um dos fatores que regulam a evolução da resistência de pragas a inseticidas, sendo que o fluxo gênico atua a favor da homogeneidade genética entre diferentes populações (FUTUYMA, 1998; BOHONAK, 1999; BOSSART; PROWELL, 1998; FUTUYMA; PETERSON, 1985).

Estudos de estruturação genética e fluxo gênico de populações de *S. frugiperda* vêm sendo desenvolvida no continente americano, tentando explicar como as diferentes populações desta praga está relacionada à localidade e a

plantas hospedeiras (CANO-CALLE; ARANGO-ISAZA; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2015; CLARK et al., 2007; JUÁREZ et al., 2014; MARTINELLI et al., 2006, 2007; MEAGHER; NAGOSHI, 2004; MURUA et al., 2008; NAGOSHI et al., 2015, 2017; NAGOSHI; MEAGHER; HAY-ROE, 2012; NAGOSHI; SILVIE; MEAGHER, 2007; PECINA-QUINTERO et al., 2015; ROSAS-GARCÍA et al., 2016; SOUZA et al., 2015; VÉLEZ-ARANGO et al., 2008).

Os estudos da genética de populações têm evoluído nos últimos anos com os avanços das técnicas de biologia molecular, o que torna possível para elucidar as funções fisiológicas complexas ao nível do gene: especialmente depois da descoberta da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), o que permitiu estudar e medir a variabilidade genética a nível molecular (ARANGUREN-MÉNDEZ et al., 2005; ROLLINS; WOOLNOUGH; SHERWIN, 2006). Do ponto de vista molecular essa variação também denominada “polimorfismo”, derivado de mudanças espontâneas do DNA pode ser medido por diferentes técnicas disponíveis.

O desenvolvimento das técnicas de marcadores moleculares levou a um estudo mais refinado da estruturação genética das populações de insetos. Atualmente se tem muitas técnicas descritas que podem ser utilizadas para diversos propósitos, dependendo do interesse do pesquisador (SUNNUCKS, 2000). Assim, como já foi mencionado acima, há muitos trabalhos publicados estudando estrutura genética de populações de *S. frugiperda* com diversas técnicas moleculares (WHITLOCK; MCCAULEY, 1999).

Estudos de diversidade gênica de populações de *S. frugiperda* provenientes de plantas do milho e algodão no Brasil já foi realizada, utilizando a técnica RADP (*Random Amplified Polymorphic DNA*), onde demonstraram que a maior diversidade genética se encontra dentro da população, porém mencionam que há um fluxo gênico muito alto entre populações de *S. frugiperda* associada a milho e algodão na mesma localidade (MARTINELLI et al., 2006). Em outro trabalho, avaliaram a estruturação genética e diversidade molecular em populações de *S. frugiperda* associada a cultura do milho e algodão no Brasil por meio da técnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), onde determinaram que não há variação genética entre populações de *S. frugiperda* coletadas nessas culturas nas suas respectivas localidades (MARTINELLI et al., 2007), e portanto, cuidados deverão ser tomados para o manejo desta praga, visto que a pressão de seleção com inseticida/toxinas de Bt exercida na cultura do milho pode afetar o controle

dessa praga com o mesmo inseticida/toxina de Bt na cultura do algodão e vice-versa. Em outro trabalho, utilizando também a técnica AFLP, estudaram a diversidade genética de populações de *S. frugiperda* coletadas no México, Estados Unidos, Puerto Rico, Brasil e Argentina onde determinaram que a maior diversidade genética se concentra dentro das populações e não entre populações indicando um baixo fluxo gênico entre as mesmas (CLARK et al., 2007). Num trabalho utilizando a mesma técnica AFLP, caracterizaram as populações de *S. frugiperda* biótipo “milho” e “arroz” no Rio Grande do Sul/Brasil (BUSATO et al., 2004).

Na Colômbia, utilizando marcadores moleculares da região Citocromo oxidase I (COI) do DNA mitocondrial e da região nuclear FR, caracterizaram as populações de *S. frugiperda* biótipos “milho” e “arroz” e uma população híbrida (CANO-CALLE; ARANGO-ISAZA; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2015; VÉLEZ-ARANGO et al., 2008). Assim, nos Estados Unidos, em uma revisão sobre a distribuição dos biótipos “milho” e “arroz”, mencionam que as técnicas RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphis*) podem ser utilizadas para caracterizar as populações de *S. frugiperda* do campo, mas afirmam que são menos consistentes que a comparação da variação do DNA mitocondrial (mtDNA) por serem mais preciso para realizar essas análises; e concluíram que, os marcadores FR da região nuclear somente é possível utilizar no biótipo “arroz”, já que não são encontrados em biótipo “milho” (NAGOSHI; MEAGHER, 2004).

Assim, estudos de análises de estruturação populacional desta praga são muito importantes já que brinda bases para tomar medidas proativas para manejo da resistência (MARTINELLI, et al., 2006, 2007; SOUZA et al., 2015). É bem sabido que os adultos têm uma alta capacidade de dispersão que podem levar os alelos de resistência de uma região a outra comprometendo seu controle (MEAGHER; NAGOSHI, 2004; NAGOSHI, 2012; NAGOSHI et al., 2015, 2017; WESTBROOK et al., 2016). Estudos de genética populacional de pragas são importante hoje dia e constitui a base para quaisquer programas de manejo regional (ROLLINS; WOOLNOUGH; SHERWIN, 2006; SOUZA et al., 2015).

Um dos marcadores moleculares bastante utilizados em estudos de genética de populações tem sido os microssatélites (CHEN; DORN, 2010; SOUZA et al., 2015). São repetições em *tandem* de pequenas sequências de um a seis nucleotídeos adjacentes, e estão presentes em todos os genomas de organismo eucariotos (HANCOCK, 1999). Estes são encontrados principalmente em regiões

não codificantes do genoma, porém, também são encontrados em menor taxa em sequências de regiões promotoras.

Em genomas de eucariotos, estas sequências são muito mais frequentes e melhor distribuídas ao acaso. Apresentam tamanhos mais variáveis, formando locos genéticos muito mais polimórficos (HAMADA et al., 1982), são raros em regiões codificadoras (HANCOCK, 1999), possuem expressão codominantes, são multialélicos e apresentam alto grau de polimorfismo genético (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

Assim, podemos citar o uso de marcadores moleculares microsatélites, que devido às suas únicas propriedades inerentes, tornaram-se os marcadores de escolha para muitos estudos de genética básica (KASHI; KING, 2006; KASHI; KING; SOLLER, 1997). A partir da análise genética populacional, seguido por criações de mapas genéticos para a detecção de genes significativos. Os principais avanços têm sido feitos por geneticistas a partir da informação fornecida por estes marcadores, medindo o polimorfismo de DNA em genomas mais complexos (ARANGUREN-MÉNDEZ et al., 2005; JARNE; LAGODA, 1996; SELKOE; TOONEN, 2006).

O polimorfismo é detectado após a amplificação do DNA via PCR (amplificação em cadeia da polimerase) e a separação dos produtos por eletroforese em gel de poliacrilamida ou agarose (WU; TANKSLEY, 1993; ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994). Cada segmento de DNA representa um alelo daquele loco específico (SOUZA, 2001; BORÉM; CAIXETA, 2006). Este polimorfismo é resultado do número de repetições do motivo que o caracteriza. Portanto, os diferentes alelos que um loco microsatélite podem distinguir-se uns dos outros pelo número de repetições que apresentam. Dado o elevado grau de polimorfismo, os microsatélites são úteis para definir um único genotipo multilocus, e são de particular interesse em estudos que exijam uma resolução muito mais sensível, em que outros tipos de marcadores poderiam apresentar algumas limitações (KASHI; KING, 2006).

Os microsatélites são classificados conforme a composição das sequências repetidas: (a) repetições perfeitas, quando não apresentam nenhuma interrupção, por exemplo: GTGTGTGTGTGTGT; (b) repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases que não correspondem ao motivo, por exemplo: GTGTGTGTAGTGTGTT; (c) repetições compostas, quando duas ou mais repetições

(classes) de microssatélites que estão dispostas em sequência, por exemplo: GTGTGTGTGTGTCACACACACACA (BORÉM; CAIXETA, 2006).

Assim, um bom marcador molecular deve atender a uma série de requisitos para maximizar a sua utilidade, inclusive, deve ter uma boa distribuição em todo o genoma e alto grau de polimorfismo. A técnica para analisar o marcador deve ser rápida, prático e fiável de ser repetido em outros laboratórios (CHENG; CRITTENDEN, 1994). Os marcadores microssatélites apresentam essas vantagens quando comparado com outros, além que são mais robustos do obtidos com RAPDs, e mais transferíveis do que AFLPs e fornecem mais informações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

A grande limitação do uso em larga escala de marcadores microssatélites é a obtenção dos iniciadores específicos, pois até recentemente requeria trabalho intenso no desenvolvimento e o custo inicial era muito elevado. Mas hoje em dia foram desenvolvidos marcadores microssatélite para *S. frugiperda* que podem ser utilizados para estudo de genética de populações desta praga (ARIAS et al., 2011; PAVINATO et al., 2013). Entretanto, também podem ser utilizados os iniciadores, denominado heterólogos, que foram desenvolvidas para outras espécies do mesmo gênero (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; RAFALSKI; TINGEY, 1993; BROWN et al., 1996).

Os marcadores microssatélites, devido à habilidade de revelar alta diversidade de alelos por loco, são usados na genotipagem de indivíduos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; JARNE; LAGODA, 1996; SELKOE; TOONEN, 2006).

Vários trabalhos com estudo de genética populacional de pragas de importância agrícola têm sido reportados mediante o uso de marcadores microssatélites. Por exemplo, na Austrália analisaram a migração regional e estrutura populacional de *Helicoverpa armigera* (Hübner) na região de Darling Down, onde encontraram alta estruturação genética das populações nas épocas em que a migração dos adultos é baixa (SCOTT et al., 2005). Outros estudos de estruturação genética e fluxo gênico de *Chloridea (Heliopsis) virescens* (Fabricius) no Brasil, concluíram que existe um baixo fluxo gênico e moderada a alta estruturação genética entre diferentes populações desta praga (DOMINGUES et al., 2012). Souza et al., (2015), num estudo de estruturação genética de distintas populações de *S. frugiperda* no Brasil, determinaram que há dois sub populações de *S. frugiperda* bem

estruturada. Em todos os casos os autores optaram por os marcadores microsatélite por serem mais sensível e discriminatório para fazer essas análises. (ARIAS et al., 2011; PAVINATO et al., 2013).

Referências

ALTIERI, M. A.; VAN SCHOONHOVEN, A.; DOLL, J. The Ecological Role of Weeds in Insect Pest Management Systems: A Review Illustrated by Bean (*Phaseolus vulgaris*) Cropping Systems. **Tropical Pest Management**, v. 23, n. 2, p. 195–205, 1977.

ARANGUREN-MÉNDEZ, J. A. et al. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación : una revisión. **Arch Latinoam Prod Anim**, v. 13, n. 1, p. 1–6, 2005.

ARIAS, R. et al. First microsatellites from *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and their potential use for population genetics. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, n. 3, p. 576–587, 2011.

ARTHROPODE PESTICIDE RESISTANCE DATABASE. Disponível em: <<https://www.pesticideresistance.org/>>

BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera : Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 996–1001, 2010.

BECKEL, H. DOS S.; LORINI, I.; LAZZARI, S. M. N. Efeito do sinergista butóxido de piperonila na resistência de *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera, Silvanidae) a deltametrina e fenitrotiom. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 50, n. 1, p. 110–114, 2006.

BOHONAK, A. J. Gene flow and population structure. **The Quarterly Review of Biology**, v. 74, n. 1, p. 21–45, 1999.

BOREGAS, K. G. B. et al. Estádio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Bragantia**, v. 72, n. 1, p. 61–70, 2013.

BORÉM, A. & CAIXETA, E. T. **Marcadores moleculares**. Viçosa – M.G., 374p., 2006.

BOSSART, J. L.; PROWELL, D. P. Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. **Trends in ecology & evolution**, v. 13, n. 5, p. 202–206, 1998.

BOURGUET, D. et al. Gene Flow in the European Corn Borer *Ostrinia nubilalis*: Implications for the Sustainability of Transgenic Insecticidal Maize, **Proceedings Biological Sciences**, v. 267, n. 1439, p. 117-122, 2000.

BRATTSTEN, L. B. et al. Insecticide Resistance: Challenge to Pest Management and Basic Research. **Science**, v. 231, n. 4743, p. 1255–1260, 1986.

BROWN, A. H. D. Isozymes plant population genetic structure and genetic conservation. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 52, n. 4, p. 145-157, 1978.

BROWN, S. M.; SZEWC-MCFADDEN, A. K.; KRESOVICH, S. **Development and application of simple sequence repeat (SSR) loci for plant genome analysis** In: Methods of genome analysis in plant, 1996.

BUSATO, G. et al. Susceptibilidade de lagartas dos biótipos milho e arroz de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas com diferentes modos de ação. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 15–20, 2006.

BUSATO, G. R. et al. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 709–716, 2004.

CANO-CALLE, D.; ARANGO-ISAIZA, R. E.; SALDAMANDO-BENJUMEA, C. I. Molecular Identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Corn and Rice Strains in Colombia by Using a PCR-RFLP of the Mitochondrial Gene Cytochrome Oxydase I (COI) and a PCR of the Gene FR (For Rice). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 108, n. 2, p. 172–180, 2015.

CAPINERA, J. Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **University of Florida**, v. EENY098, p. 1–6, 2008.

CAPRIO, M. A.; PARKER, C. D.; SCHNEIDER, J. C. Future fitness of female insect pests in temporally stable and unstable habitats and its impact on habitat utility as refuges for insect resistance management. **Journal of Insect Science**, v. 9, n. 44, p. 1–10, 2009.

CARVALHO, R. A. et al. Investigating the Molecular Mechanisms of Organophosphate and Pyrethroid Resistance in the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1-11, 2013.

CASMUZ, A. et al. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista de la Sociedad Entomologica Argentina**, v. 69, n. 3-4, p. 209-231, 2010.

CHEN, M. H.; DORN, S. Microsatellites reveal genetic differentiation among populations in an insect species with high genetic variability in dispersal, the codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 100, n. 1, p. 75-85, 2010.

CHENG, H. H.; CRITTENDEN, L. B. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken, **Poulti Science**, v. 73, n. 4, p. 539-546, 1994.

CLARK, P. L. et al. Population Variation of the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in the Western Hemisphere. **Journal of Insect Science**, v. 7, n. 5, p. 1-10, 2007.

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, **EMBRAPA: CNPMS**, 1995, p.45, (Circular Técnica 21).

CRUZ, I. et al. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International Journal of Pest Management**, v. 45, n. 4, p. 293-296, 1999.

CRUZ, I.; TURPIN, E. Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estádios de crescimento da cultura do milho. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 355-359, 1982.

DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 311-316, 2001.

DOMINGUES, F. A et al. Genetic Structure and Gene Flow Among Brazilian Populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of economic entomology**, v. 105, n. 6, p. 2136-2146, 2012.

DUMAS, P. et al. *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) host-plant variants: two host strains or two distinct species? **Genetica**, v. 143, n. 3, p. 305-316, 2015a.

DUMAS, P. et al. Phylogenetic molecular species delimitations unravel potential new species in the pest genus *Spodoptera* guenée, 1852 (Lepidoptera, Noctuidae). **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–20, 2015b.

ENDERSBY, N. M. et al. Microsatellites isolated from diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), for studies of dispersal in Australian populations. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 1, p. 51–53, 2005.

FARIAS, J. R. et al. Geographical and Temporal Variability in Susceptibility to Cry1F Toxin From *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Populations in Brazil. **Journal of economic entomology**, v. 107, n. 6, p. 2182–2189, 2014a.

FARIAS, J. R. et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p. 150–158, 2014b.

FARINELLI, R.; FILHO, D. F. Avaliação de dano de *Spodoptera frugiperda* (J. E Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivares de milho. **Cientifica**, v. 34, n. 2, p. 197–202, 2006.

FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. Introducción al Uso de Marcadores moleculares en el Análisis Genético. Brasília: **EMBRAPA-CENARGEN**, 220p., 1998.

FFRENCH-CONSTANT, R. H. Which came first: insecticides or resistance? **Trends in Genetics**, v. 23, n. 1, p. 1–4, 2007.

FFRENCH-CONSTANT, R. H.; DABORN, P. J.; LE GOFF, G. The genetics and genomics of insecticide resistance. **Trends in Genetics**, v. 20, n. 3, p. 163–170, 2004.

FIGUEREDO M L, PENTEADO-DIAS, A M, CRUZ, I. Danos provocados por *Spodoptera frugiperda* na Produção de Matéria Seca e nos Rendimentos de Grãos, na Cultura do Milho. Sete Lagoas, **EMBRAPA: CNPMS**, 2005, p.6, (Circular Técnica 130).

FUTUYMA, D. J.; PETERSON, S. C. Genetic Variation in the Use of Resources by Insects. **Annual Review of Entomology**, v. 30, n. 1, p. 217–238, 1985.

FUTUYMA, D. J. **Evolutionary Biology**. 3. ed., Sunderland, MA: Sinauer Associates, 196p, 1998.

GEORGHIOU, G. P. Principles of insecticide resistance management. **Phytoprotection**, v. 75, n. 4, p. 51–59, 1994.

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. Operational Influences in the Evolution of Insecticide Resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 70, n. 5, p. 653–658, 1977a.

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of economic entomology**, v. 70, n. 3, p. 319–323, 1977b.

GEORGHIOU, P.; TAYLOR, C. **Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management**. Washington, National Academies Press, 1986, p.471.

GOERGEN, G. et al. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1–9, 2016.

HAMADA, H.; PETRINO, M. G.; KAKUNAGA, T. A novel repeated element with ZDNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America**, v.79, p. 6465-6469, 1982.

HANCOCK, J. M. **Microsatellites and other simple sequence**: genomic context and mutational mechanisms. "In" *Microsatellites: Evolution and Applications* (Eds. D. B. Goldstein & C. Shlötterer), pp. 1-9, Oxford University Press, New York, 1999.

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.

JOHNSON S. Migration and the life history strategy of the fall armyworm , *Spodoptera frugiperda* in the western hemisphere. **Insect Science Applic**, v. 8, p. 543–549, 1987.

JUÁREZ, M. L. et al. Host Association of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Corn and Rice Strains in Argentina, Brazil, and Paraguay. **Journal of Economic Entomology**, v. 105, n. 2, p. 573–582, 2012.

JUÁREZ, M. L. et al. Population structure of *Spodoptera frugiperda* maize and rice host forms in South America: are they host strains? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 152, n. 3, p. 182–199, 2014.

KASHI, Y.; KING, D. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 5, p. 253–259, 2006.

KASHI, Y.; KING, D.; SOLLER, M. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. **Trends in Genetics**, v. 13, n. 2, p. 74–78, 1997.

KENNEDY, G. G.; STORER, N. P. Life Systems of Polyphagous Arthropod Pests in Temporally Unstable Cropping Systems. **Annual Review of Entomology**, v. 45, n. 1, p. 467–493, 2000.

KEYGHOBADI, N.; ROLAND, J.; STROBECK, C. Genetic differentiation and gene flow among populations of the alpine butterfly, *Parnassius smintheus*, vary with landscape connectivity. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 7, p. 1897–1909, 2005.

LABBE, P.; LENORMAND, T.; RAYMOND, M. On the worldwide spread of an insecticide resistance gene: a role for local selection. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 18, n. 6, p. 1471–1484, 2005.

LORINI, I.; GALLEY, D. J. Effect of the Synergists Piperonyl Butoxide and DEF in Deltamethrin Resistance on Strains of *Rhyzopertha dominica* (F .) (Coleoptera : Bostrychidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 4, p. 749–755, 2000.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 15, n. 1, p. 65–95, 1984.

LYONS, J. I. et al. Lack of genetic differentiation between monarch butterflies with divergent migration destinations. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 14, p. 3433–3444, 2012.

MARCHI, C. et al. Gene flow and population structure of a common agricultural wild species (*Microtus agrestis*) under different land management regimes. **Heredity**, v. 111, n. 6, p. 486–494, 2013.

MARTINELLI, S. et al. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 99, n. 2, p. 519–526, 2006.

MARTINELLI, S. et al. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. **Bulletin of entomological research**, v. 97, n. 3, p. 225–31, 2007.

MARTINS, P. S. Estrutura populacional, fluxo gênico e conservação “*in situ*”. **Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais**, v. 35, p. 71-79, 1987.

McCORD, E.; YU, S. J. The mechanisms of carbaryl resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 27, n. 1, p. 114–122, 1987.

MEAGHER, R. L.; NAGOSHI, R. N. Population dynamics and occurrence of *Spodoptera frugiperda* host strains in southern Florida. **Ecological Entomology**, v. 29, n. 5, p. 614–620, 2004.

MURUA, M. G. et al. Fitness and mating compatibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae) Populations from different host plant species and regions in Argentina. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 101, n. 3, p. 639–649, 2008.

NAGOSHI, R. N. Improvements in the Identification of Strains Facilitate Population Studies of Fall Armyworm Subgroups. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 105, n.2, p. 351–358, 2012.

NAGOSHI, R. N. et al. Haplotype profile comparisons between *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Mexico with those from Puerto Rico, South America, and the United States and their implications to migratory behavior. **Journal of Economic Entomology**, v. 108, n. 1, p. 135–144, 2015.

NAGOSHI, R. N. et al. Fall armyworm migration across the Lesser Antilles and the potential for genetic exchanges between North and South American populations. **Plos One**, v. 12, n. 2, p. e0171743, 2017.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L. Behavior and distribution of the two fall armyworm host strains in Florida. **Florida Entomologist**, v. 87, n. 4, p. 440–449, 2004.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L. Using intron sequence comparisons in the triose-phosphate isomerase gene to study the divergence of the fall armyworm host strains. **Insect Molecular Biology**, v. 25, n. 3, p. 324–337, 2016.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L.; HAY-ROE, M. Inferring the annual migration patterns of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in the United States from mitochondrial haplotypes. **Ecology and Evolution**, v. 2, n. 7, p. 1458–1467, 2012.

NAGOSHI, R. N.; SILVIE, P.; MEAGHER, R. L. Comparison of haplotype frequencies differentiate fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) corn-strain populations from Florida and Brazil. *Journal of Economic Entomology*, v. 100, n. 3, p. 954–961, 2007.

NASCIMENTO, A. R. B. DO et al. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. **Pest Management Science**, v. 72, n. 4, p. 810–815, 2015a.

NASCIMENTO, A. R. B. DO et al. Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 985, 2015b.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, n. 3, p. 583–590, 1978.

OKUMA, D. M. **Bases genéticas e moleculares da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J . E . Smith) (Lepidoptera : Noctuidae) a spinosad**. 2015 104P. Disertacao (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

OMOTO, C. et al. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n.9, p. 1727-1736, 2016.

PAIR, S. D. et al. Fall Armyworm Distribution and Population Dynamics in the Southeastern States. **The Florida Entomologist**, v. 69, n. 3, p. 468, 1986.

PASHLEY, D. P. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex? **Annals of the Entomological Society of America**, v. 79, n. 6, p. 898–904, 1986.

PASHLEY, D. P.; JOHNSON, S. J.; SPARKS, A N. Genetic population structure of migratory moths: the fall armyworm (Lepidoptera:Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 78, p. 756–762, 1985.

PASHLEY, D. P.; MARTIN, J. A. Reproductive Incompatibility Between Host Strains of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 80, n. 6, p. 731–733, 1987.

PAVINATO, V. A C. et al. Microsatellite markers for genetic studies of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 1, p. 370–80, 2013.

PECINA-QUINTERO, V. et al. Caracterización Genética de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en México Usando Marcadores AFLP. **Southwestern Entomologist**, v. 40, n. 3, p. 545–553, 2015.

PETERSON, M. A.; DENNO, R. F. The Influence of Dispersal and Diet Breadth on Patterns of Genetic Isolation by Distance in Phytophagous Insects. **The American Naturalist**. v. 152, n. 3, p. 428–446, 1998.

PLAPP, F. I. Biochemical Genetics of Insecticide Resistance. **Annual Review of Entomology**, p.179-197, 1976.

POGUE, M. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **American Entomological Society**, n. 43, p. 202, 2002.

RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. Genetic diagnostics in plant: RAPDs, microsatellites and machines. **Trends Genet**, 9: 275-280, 1993.

RÍOS-DÍEZ, J. D.; SALDAMANDO-BENJUMEA, C. I. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Strains From Central Colombia to Two Insecticides, Methomyl and Lambda-Cyhalothrin: A Study of the Genetic Basis of Resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 5, p. 1698–1705, 2011.

RISCH, S. J.; ANDOW, D. A.; ALTIERI, M. A. Agroecosystem Diversity and Pest Control: Data, Tentative Conclusions, and New Research Directions. **Environmental Entomology**, v. 12, n. 3, p. 625–629, 1983.

RODERICK, G. K. Geographic Structure of Insect Populations: Gene Flow, Phylogeography, and Their Uses. **Annual Review of Entomology**, v. 41, n. 1, p. 325–352, 1996.

ROLLINS, L. A.; WOOLNOUGH, A. P.; SHERWIN, W. B. Population genetic tools for pest management: a review. **Wildlife Research**, v. 33, n. 4, p. 251-261, 2006.

ROSAS-GARCÍA, N. M. et al. Identificación de Biotipos de *Spodoptera frugiperda* Provenientes de Plantas Hospederas de Maíz en Diferentes Regiones de México. **Southwestern Entomologist**, v. 41, n. 3, p. 761–770, 2016.

ROUSH, R. T.; MCKENZIE, J. A. Ecological Genetics of Insecticide and Acaricide Resistance. **Annual Review of Entomology**, v. 32, n. 1, p. 361–380, 1987.

RUIZ, E. M.; CABRAL, C. C.; PINO, C. D. Eficiencia de *Bacillus thuringiensis* Linea HD-1 en el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) en condiciones de campo y de laboratorio en el cultivo de maíz dulce *Zea mays* saccharata. **Investigación Agraria**, v. 6, n.1, p. 10-14, 2004.

SCHMIDT, F. B. **Linha básica de suscetibilidade de suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a lufenuron na cultura do milho.** 2002 48 P. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SCOTT, K. D. et al. Assessing Moth Migration and Population Structuring in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) at the Regional Scale: Example from the Darling Downs, Australia. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 6, p. 2210–2219, 2005.

SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, n. 5, p. 615–629, 2006.

SENA, D. G. et al. Fall armyworm damaged maize plant identification using digital images. **Biosystems Engineering**, v. 85, n. 4, p. 449–454, 2003.

SOUZA, I. R. P. et al. Population Structure of *Spodoptera frugiperda* Collected in Maize from Different Brazilian Geographic Regions. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 14, n. 3, p. 300–315, 2015.

SOUZA, A. P. Biologia molecular aplicada ao melhoramento. In: NASS, L. L., VALOIS, A. C. C., MELO, I. S., VALADARES-INGLIS, M. C. (ed.). **Recursos genéticos & melhoramento plantas**, Rondonópolis: Fundação M.T., p.939-966, 2001.

SPARKS, A. N. A Review of the Biology of the Fall Armyworm. **The Florida Entomologist**, v. 62, n. 2, p. 82–87, 1979.

STORER, N. P. et al. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of economic entomology**, v. 103, n. 4, p. 1031–8, 2010.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, n. 5, p. 199–203, 2000.

VÉLEZ-ARANGO, A. N. A. M. et al. Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mediante marcadores mitocondriales y nucleares. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 34, n. 63, p. 145–150, 2008.

WEI, S.-J. et al. Genetic Structure and Demographic History Reveal Migration of the Diamondback Moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from the Southern to Northern Regions of China. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1-14, 2013.

WESTBROOK, J. K. et al. Modeling seasonal migration of fall armyworm moths. **International Journal of Biometeorology**, v. 60, n. 2, p. 255–267, 2016.

WHITLOCK, M. C.; MCCAULEY, D. E. Indirect measures of gene flow and migration: F_{ST} not equal to $1/(4Nm + 1)$. **Heredity**, v. 82, p. 117–125, 1999.

WU, K. S.; TANKSLEY, S. D. Genetic and physical mapping of telomeres and microsatellite of rice, **Plant Molecular Biology**, v. 22, p. 861-872, 1993.

YOUNG, J. R.; MCMILLIAN, W. W. Differential Feeding by Two Strains of Fall Armyworm Larvae on Carbaryl Treated Surfaces. **Journal of Economic Entomology**, v. 72, n. 2, p. 202–203, 1979.

YU, S. J. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 39, n. 1, p. 84–91, 1991.

YU, S. J. Detection and Biochemical-Characterization of Insecticide Resistance in Fall Armyworm (Lepidoptera, Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 85, n. 3, p. 675–682, 1992.

YU, S. J.; NGUYEN, S. N.; ABO-ELGHAR, G. E. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 77, n. 1, p. 1–11, 2003.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v, 20, p. 176-183, 1994.

ZION, Y. BEN; YAARI, G.; SHNERB, N. M. Optimizing metapopulation sustainability through a checkerboard strategy. **PLoS Computational Biology**, v. 6, n. 1, p. 21–24, 2010.

3 SUSCETIBILIDADE AOS INSETICIDAS FLUBENDIAMIDE E LUFENURON EM POPULAÇÕES DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) COLETADAS NO PARAGUAI E BRASIL

Resumo

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) tem sido uma das pragas mais importantes da cultura do milho no Paraguai e Brasil. Este trabalho foi realizado para subsidiar programas de manejo de resistência no Paraguai e Brasil, reconhecendo-se a proximidade das fronteiras agrícolas desses dois países e a alta capacidade de dispersão de *S. frugiperda*. Para tanto, foram realizados estudos de caracterização da suscetibilidade aos inseticidas lufenuron e flubendiamide em populações de *S. frugiperda* coletadas em 9 diferentes regiões agrícolas do Paraguai e em dois estados fronteiriços do Brasil (Mato Grosso do Sul e Paraná). O método de bioensaio para a caracterização das linhas-básica de suscetibilidade foi o de tratamento superficial da dieta artificial com o inseticida. As variações na suscetibilidade a lufenuron e flubendiamide entre as populações de *S. frugiperda* testadas foram baixas (< 4 vezes), comparando-se as populações das regiões Oriental e Ocidental do Paraguai que apresentam características climáticas distintas ou entre as populações do Paraguai e do Brasil. Para o monitoramento da suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* no Paraguai foram definidas as doses diagnósticas, baseada na DL₉₉, de 0,16 µg de lufenuron.cm⁻² (equivalente a 10 µg de lufenuron.mL⁻¹ de água) e 2,84 µg de flubendiamide.cm⁻² (180 µg de flubendiamide.mL⁻¹ de água). Os resultados obtidos na presente pesquisa servirão para a implementação de um programa de manejo da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas no Paraguai, com ênfase na necessidade de ações no âmbito regional considerando os estados fronteiriços do Brasil.

Palavras-chave: Manejo da resistência de insetos; Lagarta-do-cartucho; Flubendiamide; Lufenuron

Abstract

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith) has been one of the most important corn pests in Paraguay and Brazil. This research was conducted to collect information to insect resistance management programs in Paraguay and Brazil considering the proximity of agricultural borders of both countries and the high dispersal capacity of *S. frugiperda*. We conducted studies to characterize the susceptibility to the insecticides lufenuron and flubendiamide in populations of *S. frugiperda* collected in 9 different agricultural regions of Paraguay and 2 border States of Brazil (Mato Grosso do Sul and Paraná). The bioassay method to characterize the baseline susceptibility was the diet surface treatment with the insecticide. The variation in the susceptibility to lufenuron and flubendiamide among *S. frugiperda* populations tested was low (< 4-fold) by comparing populations from Eastern and Western regions of Paraguay with distinct climatic conditions or populations from Paraguay and Brazil. For susceptibility monitoring to lufenuron and flubendiamide in *S. frugiperda* populations in Paraguay, we defined the diagnostic

doses based on LD₉₉ of 0.16 µg of lufenuron.cm⁻² (equivalent to 10 µg of lufenuron.mL⁻¹ of water) and 2,84 µg of flubendiamide.cm⁻² (180 µg of flubendiamide.mL⁻¹ of water). The results obtained in this research will support the implementation of resistance management programs of *S. frugiperda* to insecticides in Paraguay with focus on the need of plan of actions at regional level considering the border States of Brazil.

Keywords: Insect resistance management; Fall armyworm; Flubendiamide; Lufenuron

3. 1 Introdução

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) tem sido considerada uma das pragas mais importantes do continente americano (CAPINERA, 2008; POGUE, 2002), mas que recentemente foi constatada a sua presença no continente africano (GOERGEN et al., 2016). Esta praga apresenta hábito polífago alimentando-se de mais de 186 espécies de plantas dentro de 42 famílias distintas, com preferência para plantas de Poaceae (CASMUZ et al., 2010). Na América do Sul é a praga mais destrutiva da cultura de milho, afetando também outras plantas cultivadas, tais como, arroz, sorgo, algodão, soja, feijão cana de açúcar e hortaliças, ocasionando grandes perdas econômicas (BARROS; TORRES; BUENO, 2010; BOREGAS et al., 2013; CASMUZ et al., 2010; CRUZ, 1995). Os adultos de *S. frugiperda* apresentam uma alta capacidade de dispersão, permitindo explorar novas áreas localizadas a grandes distâncias (CLARK et al., 2007; MARTINELLI et al., 2007; SPARKS, 1979). Além destas características, apresentam curto ciclo de desenvolvimento e alta capacidade de reprodução, o que tem contribuído de forma preponderante para que esta espécie ganhasse importância significativa como praga agrícola (CRUZ et al., 1999; JOHNSONS, 1987; PAIR et al., 1986; SENA et al., 2003).

O principal entrave para o Manejo Integrado de Pragas (MIP) com uso de inseticidas tem sido a evolução da resistência. O controle de *S. frugiperda* nunca foi uma tarefa fácil, pelo fato de se alimentar dentro do cartucho do milho, tornando-se assim um alvo difícil de ser atingido pelos inseticidas. Isto tem ocasionando surtos de populações que na maioria das vezes pode levar à aplicação intensiva e indiscriminada de inseticidas; e, desafortunadamente, acarreta a evolução da resistência a inseticidas de diferentes grupos químicos, incluindo organofosforados, carbamatos, piretroides, benzoilureias e proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*

Berliner expressas nos eventos de milho transgênico (DIEZ-RODRÍGUEZ; OMOTO, 2001; FARIAS et al., 2014b; NASCIMENTO et al., 2015a; OMOTO et al., 2016; STORER et al., 2010; YOUNG; MCMILLIAN, 1979; YU, 1984, 1991; YU; NGUYEN, 1992; YU; NGUYEN; ABO-ELGHAR, 2003; ZHU et al., 2015).

O primeiro caso de resistência de *S. frugiperda* reportado foi ao inseticida carbaryl, que seguidamente foi caracterizado o mecanismo de resistência mediante o aumento da atividade metabólica (MCCORD, YU, 1987; YOUNG; MCMILLIAN, 1979). Com a evolução de resistência de *S. frugiperda* a inseticidas ao longo dos anos, a busca de inseticidas com novos mecanismos de ação tem sido uma das soluções imediatas ao problema, mas com limitações devido à dificuldade e ao alto custo no desenvolvimento de novas moléculas inseticidas.

Os inseticidas do grupo benzoilureias (inibidores da biossíntese de quitina), foram lançadas no mercado nos inícios dos anos 70, tornando-se em uma opção viável para o controle de diferentes lagartas desfolhadoras (SCHMIDT, 2002; SPARKS; NAUEN, 2015). Estes inseticidas agem inibindo a polimerização do N-acetilglucosamino pela enzima sintetase na última fase do processo de biossíntese de quitina (WRIGHT; RETNAKARAN, 1987; MERZENDORFER, 2013; SAKUDA et al., 1987; MERZENDORFER; ZIMOCH, 2003). Os inseticidas inibidores da biossíntese de quitina apresentam vantagens de serem altamente específicos, com baixa toxicidade aos mamíferos e inimigos naturais quando são utilizados de forma regulada, adequando-se aos princípios de MIP (EVANGELISTA; SILVA-TORRES; TORRES, 2002). A caracterização da resistência a lufenuron em populações de *S. frugiperda* do Brasil foi realizada recentemente (NASCIMENTO et al., 2015a). Mediante uso de técnicas moleculares de sequenciamento de nova geração foi determinada que a expressão gênica relacionada com enzimas de detoxificação dependente do citocromo P450 foi maior em indivíduos resistentes, indicando que as mesmas estariam fortemente relacionadas à resistência a lufenuron. Também foi constatada que a resistência é autossômica, incompletamente recessiva e ligado a mais de um gene (NASCIMENTO et al., 2015a, 2015b).

Recentemente o grupo de inseticidas diamidas foi lançado no mercado. Os inseticidas desse grupo atuam como moduladores de receptores de rianodina (INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE – IRAC, 2015). As diamidas ocasionam a abertura permanente do canal de cálcio, permitindo sua saída da região intracelular do retículo sarcoplasmático e induzindo a contração gradual dos

músculos que leva à paralisia e, conseqüentemente, à morte dos insetos (JEANGUENAT, 2013). Depois de um longo processo de síntese, o inseticida flubendiamide foi o primeiro liberado e comercializado, tornando-se num componente chave para manejo de lagartas em geral (JEANGUENAT, 2012; TOHNISHI et al., 2005; SEO et al., 2007; TEIXEIRA; ANDALORO, 2013).

Na última década, a utilização dos inseticidas lufenuron e flubendiamide tem sido intensificado para o controle de *S. frugiperda* no Paraguai, em virtude da alta eficácia e à evolução de resistência desta praga a maioria dos inseticidas de outros grupos químicos. Porém, isso tem ocasionado uma alta pressão de seleção, com a constatação de falhas de controle de *S. frugiperda* no campo com o uso desses inseticidas. Nesse contexto, estudos de caracterização da suscetibilidade desta praga ao lufenuron e flubendiamide, mediante bioensaios toxicológicos é de importância relevante para implementar programas proativos de manejo de resistência de insetos a inseticidas MRI no Paraguai, visando retardar a evolução da resistência e assim prolongar a vida útil das moléculas inseticidas.

Sabendo que as fronteiras agrícolas entre Paraguai e alguns Estados do Brasil são relativamente próximas e reconhecendo que adultos de *S. frugiperda* possuem alta capacidade de dispersão, há necessidade de melhor entendimento da estruturação genética entre as populações. Apesar das diferenças no sistema de regulamentação dos produtos fitossanitários, bem como os sistemas de produção agrícola no Paraguai e Brasil, uma seleção de indivíduos resistentes a um determinado inseticida em um país poderá afetar o desempenho deste mesmo inseticida em outro país. Portanto, este trabalho teve como objetivos determinar e as linhas-básicas de suscetibilidade aos inseticidas flubendiamide e lufenuron em populações de *S. frugiperda* coletadas regiões de produção de milho mais relevantes do Paraguai e de dois estados fronteiriços do Brasil para definir doses diagnósticas para implementação de programas de MRI no Paraguai.

3.2 Material e Métodos

Os bioensaios toxicológicos foram realizadas nos Laboratórios de “Bioensayos Entomológicos” do Departamento de Protección Vegetal da Facultad de Ciencias Agrarias/Universidad Nacional de Asunción (FCA/UNA), San Lorenzo/C - Paraguai, e no Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle da

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), Piracicaba/SP – Brasil.

3.2.1 Coleta de populações de *S. frugiperda*

No total foram coletadas 18 populações de *S. frugiperda* de pontos estratégicos de culturas de milhos convencionais. Nove populações coletadas correspondem ao Paraguai e as outras nove ao Brasil. As coletas no Paraguai foram realizadas durante a primeira safra 2014 em 6 estados da Região Oriental, que apresentam alta produção de milho, sendo elas; Alto Paraná, Amambay, Caaguazú, Canindeyú, Itapúa e San Pedro, e uma população na região Ocidental (Chaco paraguaio), no estado de Boquerón em cultura de sorgo, por ser o cultivo predominante (Figura 3.1, Tabela 3.1). No total foram coletadas manualmente entre 500 a 800 lagartas por pontos, que foram acondicionadas de forma individual em porta comprimidos que continham dieta artificial econômica (sem caseína; complexo vitamínico e anticontaminantes), modificada de Kasten et al., (1978), logo transportada ao Laboratório de Bioensaios Entomológicos da FCA/UNA, num tempo máximo de até 48 horas, para sua criação. Por outro lado, as populações do lado brasileiro foram coletadas em localidades próximas ao Paraguai que correspondem aos estados do Paraná e Mato Grosso do Sul durante as safras 2013/2014 e 2014/2015 (Tabela 3.1), dentro do projeto Monitoramento de Resistência de Insetos a Inseticidas e plantas Bt do Comitê Brasileiro de Ação a Resistência a Inseticidas (IRAC/BR), que vem sendo conduzido no Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle ESALQ/USP. Também foi utilizada uma população suscetível de referência, que vem sendo mantida em laboratório da ESALQ/USP por mais de 10 anos.

Figura 3.1 - Localidades de coletas de diferentes populações de *S. frugiperda* para bioensaios toxicológicos (cinza: Paraguai; branco: Estados de Mato Grosso do Sul e Paraná - Brasil)

Tabela 3.1 – Localidades de coletas de populações de *S. frugiperda* para caracterização de suscetibilidade aos inseticidas flubendiamide e lufenuron

Código da população	Estado	Localidade	Latitude Sul	Longitude Oeste	Data	Hospedeiro
PARAGUAI						
CTY	Canindeyú	Curuguaty	24°15'43"	55°42'16"	Fev/14	Milho
PIR	Itapuá	Pirapó	26°49'06"	55°23'22"	Abr/14	Milho
CAL	Itapuá	Caros A López	26°15'15"	54°53'39"	Abr/14	Milho
APR	Alto Paraná	Nueva Esperanza	24°43'43"	54°53'03"	Mar/14	Milho
SP1	San Pedro	Tacurú Ty	24°29'57"	56°42'16"	Mar/14	Milho
SP2	San Pedro	San Pedro	23°55'04"	57°02'41"	Abr/14	Milho
PJC	Amambay	Pedro J. Caballero	22°36'32"	55°49'35"	Abr/14	Milho
CZU	Caaguazú	Caaguazú	25°19'51"	55°42'19"	Mai/14	Milho
CHA	Boquerón	Loma Plata	22°25'44"	59°46'13"	Mar/14	Sorgo
BRASIL						
PR-52	Paraná	Cascavel	24°57'54"	53°27'53"	Dez/13	Milho
PR-55	Paraná	Engenheiro Beltrão	23°48' 8"	52°15'10"	Abr/14	Milho
PR-56	Paraná	Ponta Grossa	25°5' 34"	50°06'27"	Nov/14	Milho
PR-57	Paraná	Palotina	24°18' 25"	53°50'58"	Nov/14	Milho
PR-58	Paraná	Fundação ABC	24°47' 30"	50°01'10"	Dez/14	Milho
PR-60	Paraná	Ivatuba	23°37' 14"	53°13'28"	Abr/15	Milho
PR-61	Paraná	Londrina	23°18' 29"	51°06'09"	Abr/15	Milho
MS-20	Mato Grosso do Sul	Campo Grande	20°28' 2"	54°41'42"	Mai/15	Milho
MS-21	Mato Grosso do Sul	Rio Brilhante	21°48' 13"	54°32'28"	Mai/15	Milho
SUS	Laboratório	ESALQ/USP	-	-	-	-

3.2.2 Criação e manutenção das populações de *S. frugiperda*

As amostras de lagartas de *S. frugiperda* coletadas no campo foram transferidas e individualizadas em copos de plásticos de 50 ml que continham dieta artificial, sendo que esses copos novamente eram agrupados em bandejas plásticas e etiquetadas com nome da localidade e data de coleta e mantidas em salas de criação com temperatura $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotofase 14 horas até a fase de pupa. As pupas foram retiradas com ajuda de pinças e tratadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,2%. Após esse tratamento, as pupas foram lavadas com água destilada e acondicionadas em placas de Petri de 15 cm de diâmetro e tampadas com copo plástico transparente de 500 mL para a emergência dos adultos. Os adultos foram transferidos para gaiolas de acasalamento que consistiam em tubo cilíndricos de PVC de 24 cm de altura por 14,5 cm de diâmetro revestidas internamente com papel jornal como substrato de oviposição e fechadas na parte superior com tecido tipo “voil”. Foram acondicionados aproximadamente 30 casais por gaiola e mantida em sala com temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 14 horas. Os adultos foram alimentados com uma solução de mel a 10% embebidas em chumaços de algodão colocados na parte superior das gaiolas e trocados a cada 48 horas. As posturas foram retiradas a cada 48 horas e mantidas em copos plásticos de 50 mL junto com papel de filtro umedecido para evitar a dessecação das mesmas e mantidas em câmara climatizada tipo BOD à temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; e fotofase de 14 horas até a eclosão das lagartas. As lagartas recém-eclodidas foram transferidas em copos plásticos contendo dieta artificial previamente esterilizada sob luz ultravioleta, até atingir o terceiro instar para os bioensaios toxicológicos. Aproximadamente 200 a 300 lagartas que não foram utilizadas para os bioensaios eram inoculadas individualmente em copos com dieta, para manutenção da população.

3.2.3 Caracterização da suscetibilidade de *S. frugiperda* aos inseticidas flubendiamide e lufenuron

Para a caracterização da suscetibilidade de *S. frugiperda*, foram utilizados os inseticidas flubendiamide (Belt SC® 480 g.i.a./L Bayer Cropscience AG Industrial Operations), e lufenuron (Match CE® 50 g.i.a./L, Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.), utilizando-se o método de bioensaio de ingestão mediante o tratamento superficial da dieta artificial. Foram utilizadas placas contendo 24 cavidades

(COSTAR[®]), onde foram vertidas 1,5 mL de dieta artificial por cavidade. Antes da realização dos bioensaios, as placas com dietas foram esterilizadas em câmara de fluxo laminar com luz ultravioleta por 30 minutos. Os inseticidas foram diluídos em água destilada e surfactante Triton[®] na concentração de 0,1%. O tratamento controle consistiu de somente água destilada com o surfactante Triton[®] na concentração de 0,1% aplicado na superfície da dieta. No total foram realizadas sete a oito concentrações espaçadas logaritmicamente para cada inseticida, para a obtenção de mortalidades entre 5 a 95%. Posteriormente, com auxílio de uma micropipeta, foram depositados 30 µL da suspensão inseticida em cada cavidade das placas e transferidas para uma câmara de exaustão para secagem desta solução por aproximadamente 45 minutos. Após a secagem, as lagartas de terceiro instar foram transferidas para cada cavidade. Após a inoculação, as placas foram fechadas e, em seguida, acondicionadas em câmara climatizada tipo BOD regulada à temperatura de $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotofase de 14 horas.

A avaliação dos bioensaios foram realizadas quatro dias após da infestação para o inseticida flubendiamide e cinco dias para o inseticida lufenuron, sendo considerados mortos os indivíduos que não demonstravam movimentos vigorosos ao toque com um pincel de ponta fina. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com quatro repetições (24 larvas por repetição), totalizando aproximadamente 96 lagartas por concentração. As porcentagens de mortalidade foram corrigidas conforme o tratamento controle (ABBOTT, 1925).

As concentrações testadas foram transformadas em doses na unidade de µg de ingrediente ativo por cm² de dieta artificial. Os dados de mortalidade foram submetidos à análise Probit, utilizando o programa POLO PLUS (LEORA SOFTWARE, 1987) para a estimativa das doses letais (DL₅₀ e DL₉₀) para cada população, com seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%). Para a estimativa das doses diagnósticas baseadas na DL₉₉, os dados de mortalidade acumulada das nove populações do Paraguai e as nove populações do Brasil foram agrupadas para cada país e analisadas conjuntamente (SIMS et al., 1996). Os dados de mortalidade foram ajustados ao modelo binomial com função de ligação complemento log-log (Gompertz), utilizando o programa SAS (SAS PROC PROBIT, SAS Institute, 2000).

3.3 Resultados

3.3.1 Caracterização da suscetibilidade a flubendiamide em populações de *S. frugiperda* do Paraguai e Brasil

Para as 18 populações de *S. frugiperda* coletadas no Paraguai e nos estados fronteiriços do Brasil (Paraná e Mato Grosso do Sul), as DL_{50} (I.C. 95%) ao inseticida flubendiamide variaram de 0,09 (0,08-0,11) para a população PR55 a 0,37 (0,31-0,43) μg de flubendiamide. cm^{-2} para PR60. Assim as DL_{90} (I.C. 95%) variaram de 0,56 (0,42-0,78) para PR55 a 2,11 (1,19-3,34) μg de flubendiamide. cm^{-2} para CZU (Tabela 3.2).

A variação na suscetibilidade a flubendiamide entre as populações de *S. frugiperda* testadas foi de aproximadamente 4 vezes, baseada nas DL_{50} e DL_{90} do inseticida. Sendo assim, os valores das DL_{50} e DL_{90} a flubendiamide em distintas populações de *S. frugiperda* não apresentam diferenças significativas, devido a sobreposição dos valores estimados dos respectivos intervalos de confiança (I.C.95%). Essas diferenças de suscetibilidade observada nas populações de *S. frugiperda* se deve a variações naturais do ambiente nos locais de coletas.

As populações PR57; SP1 e CAL apresentaram a maior homogeneidade por apresentarem os maiores coeficientes angulares da curva de doses-resposta com valores de 2,17 (0,16); 2,11 (0,12) e 2,10 (0,11) respectivamente (Tabela 3.2), indicando que pequenas variações na dose dos inseticidas promovem uma alta variação na mortalidade nessas populações.

Todas as populações testadas não demonstraram χ^2 significativo a $P > 0,05$; ($\chi^2 = 14,64$; G.I. 5), indicando ajuste ao modelo Probit. Analisando os limites dos I.C.95% das DL_{50} , pode-se considerar que o modelo de bioensaios utilizado foi adequado já que as mesmas não superaram duas vezes os valores das DL_{50} determinada para as diferentes populações.

Tabela 3. 2 - Caracterização de dose-resposta de lagartas do terceiro instar de *S. frugiperda* expostas ao tratamento superficial da dieta com o inseticida flubendiamide coletadas no Paraguai e Brasil

População	Geração	n ^a	Coef. Ang.(±EP)	DL ₅₀ (95% IC) ^b	DL ₉₀ (95% IC) ^b	χ^2	g.l. ^c
PARAGUAI							
CTY	F2	949	1,72 (0,09)	0,17 (0,14-0,22)	0,96 (0,70-1,46)	10,91	6
PIR	F1	953	1,98 (0,10)	0,18 (0,16-0,21)	0,81 (0,66-1,03)	1,30	5
CAL	F2	823	2,10 (0,11)	0,18 (0,14-0,24)	0,75 (0,53-1,25)	12,65	5
APR	F1	926	1,92 (1,06)	0,28 (0,25-0,32)	1,30 (1,10-1,61)	4,41	6
SP1	F1	825	2,11 (0,12)	0,29 (0,21-0,40)	1,24 (0,82-2,37)	12,60	5
SP2	F1	801	1,68 (0,09)	0,16 (0,11-0,23)	1,10 (0,57-2,00)	12,81	5
PJC	F1	926	1,56 (0,08)	0,15 (0,13-0,18)	1,02 (0,83-1,31)	1,98	6
CZU	F1	791	1,47 (0,09)	0,29 (0,20-0,40)	2,11 (1,19-3,34)	10,86	5
CHA	F2	930	1,98 (0,10)	0,22 (0,17-0,29)	0,99 (0,71-1,56)	14,64	6
BRASIL							
PR-52	F7	768	1,55 (0,11)	0,10 (0,08-0,12)	0,67 (0,52-0,93)	4,40	5
PR-55	F6	764	1,70 (0,13)	0,09 (0,08-0,11)	0,56 (0,42-0,78)	1,63	4
PR-56	F3	740	1,32 (0,11)	0,15 (0,12-0,19)	1,43 (0,96-2,41)	3,24	4
PR-57	F2	853	2,17 (0,16)	0,17 (0,12-0,22)	0,65 (0,42-1,36)	10,03	4
PR-58	F4	660	1,64 (0,15)	0,18 (0,14-0,22)	1,10 (0,72-1,80)	2,46	4
PR-60	F2	761	1,83 (0,19)	0,37 (0,31-0,43)	1,70 (1,26-2,58)	2,24	4
PR-61	F2	848	1,76 (0,13)	0,22 (0,18-0,27)	1,16 (0,83-1,88)	5,16	5
MS-20	F2	666	1,70 (0,11)	0,27 (0,20-0,37)	1,60 (1,04-2,96)	7,57	5
MS-21	F2	757	1,69 (0,13)	0,31 (0,26-0,37)	1,78 (1,28-2,73)	3,35	4

a=número de insetos testados; b= µg/cm² de i. a. flubendiamide; c= graus de liberdade

Figura 3.2 - Log dose-resposta a flubendiamide em populações de *S. frugiperda* do Paraguai

Figura 3.3 - Log dose-resposta a flubendiamide em populações de *S. frugiperda* do Brasil

3.3.2 Caracterização da suscetibilidade a lufenuron em populações de *S. frugiperda* do Paraguai e Brasil

Os valores estimados das DL_{50} (I.C. 95%) a lufenuron foi de 0,03 (0,03-0,04) para a população PR56 a 0,11 (0,09-0,15) μg de lufenuron. cm^{-2} para a população CAL. As DL_{90} (I.C. 95%) para lufenuron foram de 0,12 (0,09-0,15) para PR52; PR55 e PR56 a 0,37 (0,25-0,70) μg de lufenuron. cm^{-2} para CAL (Tabela 3.4 e 3.5).

A diferença de suscetibilidade a lufenuron entre as populações de *S. frugiperda* testadas no Paraguai e Brasil foi de apenas 3,5 vezes, sendo esse resultado muito próximo ao valor calculado para o inseticida flubendiamide, baseada nas DL_{50} e DL_{90} de cada inseticida.

Para lufenuron, verificou-se que os coeficientes angulares das curvas de dose-mortalidade foram altos para todas as populações testadas, indicando uma maior homogeneidade genética das populações em resposta a este produto. A população APR demonstrou maior coeficiente angular da reta dose-mortalidade com 3,72 (0,26), indicando que pequenas variações nas doses dos inseticidas promove uma alta variação na mortalidade nessas populações.

Os dados de mortalidade obtidos para as populações testadas apresentaram um bom ajuste ao modelo Probit, uma vez que o χ^2 calculado não foi significativo ($\chi^2 = 10,03$; G.I.=4; $P > 0,05$), além disso, o modelo de bioensaios utilizado foi adequado já que os valores estimados dos I.C. 95%, não ultrapassaram duas vezes os valores das DL_{50} determinada para as diferentes populações.

Tabela 3. 3 - Caracterização de dose-resposta de lagartas do terceiro instar de *S. frugiperda* expostas ao tratamento superficial da dieta com o inseticida lufenuron coletadas no Paraguai e Brasil

População	Geração	n ^a	Coef. Ang.(±EP)	DL ₅₀ (95% IC) ^b	DL ₉₀ (95% IC) ^b	χ^2	g.l. ^c
PARAGUAI							
CTY	F2	690	3,14 (0,22)	0,06 (0,05-0,08)	0,17 (0,12-0,27)	6,8	3
PIR	F1	688	2,67 (0,19)	0,07 (0,05-0,09)	0,22 (0,15-0,41)	6,9	3
CAL	F2	667	2,56 (0,19)	0,11 (0,09-0,15)	0,37 (0,25-0,70)	5,2	3
APR	F1	717	3,72 (0,26)	0,08 (0,07-0,09)	0,18 (0,16-0,25)	3,0	3
SP1	F1	715	3,51 (0,31)	0,10 (0,09-0,11)	0,20 (0,17-0,22)	2,2	3
SP2	F1	707	3,42 (0,23)	0,06 (0,05-0,06)	0,14 (0,12-0,16)	2,9	3
PJC	F1	709	3,42 (0,23)	0,08 (0,06-0,08)	0,18 (0,14-0,23)	3,2	3
CZU	F1	701	2,88 (0,20)	0,05 (0,05-0,06)	0,16 (0,13-0,18)	0,7	3
CHA	F2	779	2,85 (0,22)	0,05 (0,03-0,06)	0,13 (0,09-0,26)	7,5	3
BRASIL							
PR-52	F7	668	1,90 (0,21)	0,04 (0,03-0,05)	0,12 (0,10-0,19)	3,01	3
PR-55	F6	672	2,90 (0,26)	0,04 (0,04-0,05)	0,12 (0,09-0,15)	1,84	3
PR-56	F3	660	2,20 (0,20)	0,03 (0,03-0,04)	0,12 (0,10-0,17)	2,81	3
PR-57	F2	651	2,21 (0,22)	0,05 (0,04-0,05)	0,18 (0,14-0,25)	0,56	3
PR-58	F4	666	1,80 (0,18)	0,04 (0,03-0,05)	0,22 (0,17-0,33)	1,34	3
PR-60	F2	667	2,30 (0,20)	0,04 (0,03-0,04)	0,14 (0,12-0,19)	1,32	3
PR-61	F2	665	2,20 (0,20)	0,05 (0,04-0,07)	0,19 (0,12-0,32)	4,81	3
MS-20	F2	663	1,98 (0,19)	0,06 (0,05-0,09)	0,28 (0,17-0,62)	4,02	3
MS-21	F2	667	2,12 (0,19)	0,06 (0,04-0,08)	0,24 (0,15-0,63)	5,30	3
SUS	-	755	4,48(0,38)	0,02 (0,01-0,03)	0,04 (0,03-0,04)	12,5	4

a=número de insetos testados; b= $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de i. a. lufenuron; c= graus de liberdade

Figura 3.4 - Log dose-resposta a lufenuron em populações de *S. frugiperda* do Paraguai

Figura 3.5 - Log dose-resposta a lufenuron em populações de *S. frugiperda* do Brasil

Com análise conjunta das curvas doses-mortalidade das nove populações de *S. frugiperda* coletadas no Paraguai e das nove populações coletadas no Brasil, foi calculado as DL_{99} (I.C.95%) para os inseticidas flubendiamide e lufenuron. Assim a $DL_{99} = 2,69$ (1,85-4,67) μg de flubendiamide. cm^{-2} do Paraguai, e 2,39 (2,05-2,83) μg de flubendiamide. cm^{-2} do Brasil. Em tanto, para lufenuron a $DL_{99} = 0,32$ (0,22-0,54) μg de lufenuron. cm^{-2} do Paraguai e 0,31 (0,25-0,44) μg de lufenuron. cm^{-2} do Brasil.

Tabela 3.4 - Análise conjunta das populações de *S. frugiperda* coletadas no Paraguai e Brasil pelo complemento log-log (gompertz) (SAS PROC PROBIT, SAS Institute, 2000)

Produto	n ^a	Coef. Ang. ($\pm$ EP)	DL_{99} (95% IC) ^b	χ^2	g.l. ^d
Paraguai					
flubendiamide	9116	1,63 (0,16)	2,69 (1,85-4,67)	18,14	6
lufenuron	6284	3,30 (0,28)	0,32 (0,22-0,54)	9,75	3
Brasil					
flubendiamide	6818	1,92 (0,58)	2,39 (2,05-2,83)	10,98	6
lufenuron	5979	2,41 (0,15)	0,31(0,25-0,44)	22,45	4
SUS	755	5,82 (0,58)	0,06 (0,05-0,07)	2,02	4

a= número de insetos testados; b= $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de i.a; c= graus de liberdade

3.4 Discussão

A variabilidade na suscetibilidade em populações de *S. frugiperda* aos inseticidas flubendiamide e lufenuron coletadas no Paraguai foi baixa, mesmo quando comparadas às populações coletadas em Estados fronteiriços com Brasil (Paraná e Mato Grosso do Sul), com uma diferença de apenas 2,5 vezes, baseada nas estimativas de DL_{50} e DL_{90} .

Dentro do Paraguai foram avaliadas duas regiões com características climáticas distintas (Regiões Oriental e Ocidental) o que poderia incidir em respostas diferenciadas aos inseticidas; porém, as DL_{50} e DL_{90} foram bastante próximas para todas as populações testadas. Na Região Oriental do Paraguai, as populações de *S. frugiperda* avaliadas foram provenientes de estados com atividade agrícola altamente intensificada e tecnificada, com grandes áreas de cultivos agrícolas, que correspondem aos estados próximos ao Brasil. Durante a temporada quente (setembro-março) há predomínio de culturas de soja e milho em sucessão com trigo,

aveia e canola no inverno (maio-agosto). A resposta similar aos inseticidas flubendiamide e lufenuron em populações de *S. frugiperda* coletadas no Paraguai e Brasil pode ser atribuída à proximidade das regiões agrícolas sem barreiras geográficas e com fronteiras secas na maior parte da sua extensão, facilitando assim a dispersão de *S. frugiperda* para as áreas vizinhas. Sendo assim, os programas de monitoramento e manejo da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas nessas regiões fronteiriças deverão ser realizadas no âmbito regional envolvendo os diferentes países.

Atualmente, no Paraguai são realizadas duas safras de milho por temporada, mas em algumas áreas tem sido feito uma terceira safra para cobertura de solo ou alimentação animal, tendo assim milho no campo durante todo ano. Portanto, *S. frugiperda* pode desenvolver várias gerações, aumentando a pressão de seleção com o uso frequente de inseticidas de diferentes grupos químicos, especificamente as diamidas e inibidores de biossíntese de quitina.

Atualmente, não há nenhum programa de manejo de resistência de insetos a inseticidas no Paraguai. Portanto, as definições de concentrações diagnósticas de lufenuron e flubendiamide serão de grande valia para o início de um programa de monitoramento da suscetibilidade de populações de *S. frugiperda* a lufenuron e flubendiamide. Os valores de DL_{99} estimados para o inseticida flubendiamide em populações de *S. frugiperda* no Paraguai e Brasil foram bastante próximos, ou seja de 2,69 e 2,39 μg de flubendiamide. cm^{-2} equivalente a 170 e 151 μg de flubendiamide. mL^{-1} de água (ppm), com a definição da concentração diagnóstica para monitoramento da resistência de 180 μg de flubendiamide. mL^{-1} de água (2,84 μg de flubendiamide. cm^{-2}). Esta concentração foi uma das concentrações diagnósticas propostas por Ribeiro, (2014) para o monitoramento da suscetibilidade de *S. frugiperda* a flubendiamide no Brasil. Para lufenuron, os valores de DL_{99} estimados para populações de *S. frugiperda* coletadas no Paraguai e Brasil também foram muito próximos, de 0,32 e 0,31 μg de lufenuron. cm^{-2} respectivamente, o que equivale a aproximadamente 20 μg de lufenuron. mL^{-1} de água (ppm). As concentrações diagnósticas definidas a partir das linhas básicas de suscetibilidade a lufenuron de populações de *S. frugiperda* coletadas no início dos anos 2000 no Brasil foram de 3,2 e 10 μg de lufenuron. mL^{-1} de água (SCHMIDT, 2002). Portanto, foram verificadas uma diminuição da suscetibilidade a lufenuron em populações de

S. frugiperda avaliadas no presente estudo. Lufenuron foi amplamente utilizado para controle de *S. frugiperda* a partir dos anos 2000, enquanto que o flubendiamide foi liberado comercialmente no ano 2013 no Paraguai (SENAVE, 2017). Se considerarmos a comparação das respostas das populações do Paraguai com a população suscetível de referência do Brasil, a razão de resistência a lufenuron atingiu valores de 5,5 vezes para a população CAL. Portanto, as frequências de resistência a lufenuron em populações de *S. frugiperda* no Paraguai devem estar relativamente elevadas devido ao uso intenso desse inseticida. Portanto, a concentração diagnóstica para o monitoramento da suscetibilidade em populações de *S. frugiperda* no Paraguai serão realizadas com 10 µg de lufenuron.mL⁻¹ de água, baseada no trabalho de SCHMIDT (2002), ao invés de 20 µg de lufenuron.mL⁻¹ de água (0,32 µg de lufenuron.cm⁻²) obtida a partir da análise conjunta para a estimativa da DL₉₉ no presente estudo. Para a implementação de um programa de MRI no Paraguai, iniciou-se a seleção de população suscetível de referência de *S. frugiperda* a lufenuron no Laboratorio de Bioensayos Entomologicos, FCA/UNA, mediante técnica de F₂ screen.

Os resultados do presente trabalho subsidiarão o início de um programa de monitoramento da resistência a inseticidas em populações de *S. frugiperda* no Paraguai. A suscetibilidade a lufenuron e flubendiamide em populações de *S. frugiperda* do Paraguai e dos Estados fronteiriços do Brasil foi bastante próxima, reforçando assim a necessidade de implementação de estratégias de MRI no âmbito regional. Com a liberação comercial de milho transgênico no Paraguai a partir de 2012 (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Vegetal y de Semillas – SENAVE, 2017), houve uma redução significativa no uso de inseticidas para o controle de *S. frugiperda*. Sendo assim, trata-se de um momento bastante adequado para a implementação de estratégias efetivas de MRI.

Para tanto, haverá a necessidade de envolvimento de toda cadeia produtiva, incluindo produtores, consultores, pesquisadores, revendas, cooperativas, empresas de inseticidas/biotecnologia e governo do Paraguai juntamente com as ações de países vizinhos.

3.5 Conclusões

- Não há diferenças na suscetibilidade a flubendiamide e lufenuron em populações de *S. frugiperda* coletadas no Paraguai e nos Estados fronteiriços do Brasil.
- As doses diagnósticas para o monitoramento da suscetibilidade a flubendiamide e lufenuron em populações de *S. frugiperda* no Paraguai são 2,84 µg de flubendiamide.cm⁻² (180 µg de flubendiamide.mL⁻¹ de água) e 0,16 µg de lufenuron.cm⁻² (10 µg de lufenuron.mL⁻¹ de água) em bioensaios com tratamento superficial de dieta artificial.

Referências

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265–267, 1925.
- BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 9, p. 996–1001, 2010.
- BOREGAS, K. G. B. et al. Estádio de adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em hospedeiros alternativos. **Bragantia**, v. 72, n. 1, p. 61–70, 2013.
- BRATTSTEN, L. B. et al. Insecticide Resistance: Challenge to Pest Management and Basic Research. **Science**, v. 231, n. 4743, p. 1255–1260, 1986.
- BUSATO, G. et al. Susceptibilidade de lagartas dos biótipos milho e arroz de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas com diferentes modos de ação. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 15–20, 2006.
- CAMARA PARAGUAYA DE EXPORTADORES Y COMERCIALIZADORES DE CEREALES Y OLEAGINOSAS – CAPECO, Área de siembra, producción y rendimiento, 2017, Disponible em: <<http://capeco.org.py/area-de-siembra-produccion-y-rendimiento/>>
- CAPINERA, J. Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **University of Florida**, v. EENY098, p. 1–6, 2008.

- CASMUZ, A. et al. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista de la Sociedad Entomologica Argentina**, v. 69, n. 3–4, p. 209–231, 2010.
- CLARK, P. L. et al. Population variation of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in the Western Hemisphere. **Journal of Insect Science**, v. 7, n. 5, p. 1-10, 2007.
- CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, EMBRAPA: **CNPMS**, 1995, p.45, (Circular Técnica 21).
- CRUZ, I. et al. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International Journal of Pest Management**, v. 45, n. 4, p. 293–296, 1999.
- DIEZ-RODRÍGUEZ, G. I.; OMOTO, C. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 311–316, 2001.
- EKBOIR, J. et al. **Análisis de sistema paraguayo de investigación agropecuaria**, Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo - CIMMYT, 2008, Mexico, 22p.
- EVANGELISTA, W. S.; SILVA-TORRES, C. S. A.; TORRES, J. B. Toxicidade de lufenurom para *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 2, p. 319–325, 2002.
- FARIAS, J. R. et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p. 150–158, 2014.
- GEORGHIOU, G. P. Principles of insecticide resistance management. **Phytoprotection**, v. 75, n. 4, p. 51–59, 1994.
- GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. Operational Influences in the Evolution of Insecticide Resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 70, n. 5, p. 653–658, 1977.
- GOERGEN, G. et al. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1–9, 2016.

INSECTICIDE RESISTANCE ACTION COMMITTEE – IRAC, 2015, **Mode of Action Classification Scheme**, IRAC – International MoA Working Group, Version, 7.4, 26p.

JEANGUENAT, A. The story of a new insecticidal chemistry class: the diamides. **Pest Management Science**, v. 69, n. 1, p. 7–14, 2013.

JOHNSON S. Migration and the life history strategy of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in the western hemisphere. **Insect Science Applic.**, v. 8, p. 543–549, 1987.

JUTSUM, A. R. et al. Pesticide Resistance: assessment of risk the development and implementation of effective management strategies. **Pest Management Science**, v. 54, p. 435-446, 1998.

KASTEN J. P.; PRECETTI, A.A.C.M.; PARRA, J.R.P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, v.53, p.69-78, 1978.

LEORA SOFTWARE. **POLO-PC**: a user's guide to Probit or Logit analysis. Berkeley, 1987.

MARTINELLI, S. et al. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. **Bulletin of Entomological Research**, v. 97, n. 3, p. 225–31, 2007.

MCCORD, E YU, S. J. The mechanisms of carbaryl resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 27, n. 1, p. 114–122, 1987.

MEAGHER, R. L.; NAGOSHI, R. N. Population dynamics and occurrence of *Spodoptera frugiperda* host strains in southern Florida. **Ecological Entomology**, v. 29, n. 5, p. 614–620, 2004.

MERZENDORFER, H. Chitin synthesis inhibitors: old molecules and new developments. **Insect Science**, v. 20, n. 2, p. 121–138, 2013.

MERZENDORFER, H.; ZIMOCH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **The Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 4393–4412, 2003.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA – MAG, **Síntesis Estadísticas: Producción Agropecuaria**, 2014, Asunción – Paraguay, 47p.

- NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. Fall armyworm FR sequences map to sex chromosomes and their distribution in the wild indicate limitations in interstrain mating. **Insect Molecular Biology**, v. 12, n. 5, p. 453–458, 2003.
- NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L. Behavior and distribution of the two fall armyworm host strains in Florida. **Florida Entomologist**, v. 87, n. 4, p. 440–449, 2004.
- NASCIMENTO, A. R. B. DO et al. Genetic basis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to the chitin synthesis inhibitor lufenuron. **Pest Management Science**, v. 72, n. 4, p. 810–815, 2015a.
- NASCIMENTO, A. R. B. DO et al. Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 985, 2015b.
- OMOTO, C. et al. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, v. 72, n.9, p. 1727-1736, 2016.
- PAIR, S. D. et al. Fall Armyworm Distribution and Population Dynamics in the Southeastern States. **Florida Entomologist**, v. 69, n. 3, p. 468, 1986.
- POGUE, M. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **American Entomological Society**, n. 43, 202p, 2002.
- RIBEIRO, R. S. **Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil**. 2014. 86 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.
- ROUSH, R. T.; MCKENZIE, J. A. Ecological Genetics of Insecticide and Acaricide Resistance. **Annual Review of Entomology**, v. 32, n. 1, p. 361–380, 1987.
- ROUSH, R. T.; MILLER, G. L. Considerations for Design of Insecticide Resistance Monitoring Programs. **Journal of Economic Entomology**, v. 79, n. 2, p. 293–298, 1986.
- SAKUDA, S. et al. Search for microbial insect growth regulators II. **The journal of Antibiotics**, v. XL, n. 3, p. 296–300, 1987.
- SAS Institute. 2000. Statistical analysis system: getting started with the SAS learning. SAS Institute, Cary, NC.

SCHMIDT, F. B. **Linha básica de suscetibilidade de suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a lufenuron na cultura do milho.** 2002 48 P. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SENA, D. G. et al. Fall armyworm damaged maize plant identification using digital images. **Biosystems Engineering**, v. 85, n. 4, p. 449–454, 2003.

SERVICIO NACIONAL DE CALIDAD Y SANIDAD VEGETAL Y DE SEMILLAS - SENA. 2013, Cultivares Protegidos e Comerciales, Departamento de Protección y uso de Variedades, Boletín Nacional, San Lorenzo – Paraguay, año 13, nº1, 32p.

_____. 2017, **Listado de eventos con modificación genética liberados comercialmente en el país**, Dirección de Bioseguridad Agrícola: Departamento de Manejo de Organismos Genéticamente Modificados, Asuncion, 2p.

SEO et al., Flubendimide, a new Insecticide Characterized by its Novel Chemistry and Biology, In: OHKAWA, H.; HISASHI, M.; LEE, P. W. (Ed.). **Pesticide Chemistry**, 11º IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry, Kobe, Japan: 2007, p. 127-135. (Livro de Resumes).

SIMS, S. B. et al. Monitoring Strategies for Early Detection of Lepidoptera Resistance to *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Proteins. In: BROWN, T. M (Ed.). **Molecular Genetic and Evolution of Pesticide Resistance**. Washington: American Chemical Society, 1996. p. 229–242. (Symposium Series, 645).

SPARKS, A. N. A Review of the Biology of the Fall Armyworm. **The Florida Entomologist**, v. 62, n. 2, p. 82–87, 1979.

SPARKS, T. C.; NAUEN, R. IRAC : Mode of action classification and insecticide resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 122–128, 2015.

STORER, N. P. et al. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 4, p. 1031–8, 2010.

TABASHNIK, B. E. et al. Defining terms for proactive management of resistance to Bt crops and pesticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 2, p. 496–507, 2014.

TEIXEIRA, L. A.; ANDALORO, J. T. Diamide insecticides: Global efforts to address insect resistance stewardship challenges. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 106, n. 3, p. 76–78, 2013.

TOHNISHI, M. et al. Flubendiamide, a novel insecticide highly active against lepidopterous insect pests. **Journal Pesticide Science**, v. 30, n. 4, p. 354–360, 2005.

WRIGHT, J. E.; RETNAKARAN, A. **Chitin and Benzoylphenyl Ureas**. Dordrecht: Springer Netherlands, 309p, 1986. (Series Entomologica, 38).

YOUNG, J. R.; MCMILLIAN, W. W. Differential Feeding by Two Strains of Fall Armyworm Larvae on Carbaryl Treated Surfaces. **Journal of Economic Entomology**, v. 72, n. 2, p. 202–203, 1979.

YU, S. J. Microsomal sulfoxidation of phorate in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 23, p. 273–281, 1984.

YU, S. J. Insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 39, n. 1, p. 84–91, 1991.

YU, S. J.; NGUYEN, S. N. Detection and biochemical characterization of insecticide resistance in the diamondback moth. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 44, n. 1, p. 74–81, 1992.

YU, S. J.; NGUYEN, S. N.; ABO-ELGHAR, G. E. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 77, n. 1, p. 1–11, 2003.

ZHU, Y. C. et al. Evidence of multiple/cross resistance to Bt and organophosphate insecticides in Puerto Rico population of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 122, p. 15–21, 2015.

4. DIVERSIDADE GENÉTICA E FLUXO GÊNICO EM POPULAÇÕES DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) DO PARAGUAI E BRASIL

Resumo

O conhecimento da diversidade genética e fluxo gênico entre as populações naturais em uma escala local e regional é de fundamental relevância para a implementação de programas de Manejo da Resistência de Insetos (MRI). Sendo assim, este trabalho teve como objetivos avaliar a diversidade genética e o fluxo gênico entre populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) coletadas nas principais regiões produtoras de milho do Paraguai e de dois Estados fronteiriços do Brasil (Mato Grosso do Sul e Paraná). Inicialmente foi avaliada a frequência de indivíduos pertencentes às raças milho e arroz de *S. frugiperda* nas diferentes populações avaliadas. De 14 localidades avaliadas, a presença de ambas raças foi verificada em 11 localidades, sendo que a raça milho representou 94% do total de exemplares identificados. Mediante o uso de 12 loci microssatélites, foram verificadas maior diversidade genética dentro das populações (87,70%) quando comparada entre as populações de cada país (9,91%) e entre países (2,39%). Sendo assim, não foi constatada alta estruturação genética entre as populações de *S. frugiperda* coletadas no Paraguai e Brasil. As populações do Paraguai mostraram-se mais distintas entre si quando comparada com as populações do Brasil. Nossos resultados apontam baixa estruturação genética e moderado/alto fluxo gênico entre as localidades de coleta de populações de *S. frugiperda* e entre as populações do Paraguai e Brasil. Desta forma, as estratégias de manejo da resistência de *S. frugiperda* a inseticidas e plantas Bt devem ser implementadas no âmbito regional, considerando-se o Paraguai e os Estados fronteiriços do Brasil.

Palavras chave: *Spodoptera frugiperda*; raça associada a hospedeiro; diversidade genética; fluxo gênico

Abstract

Understanding the genetic diversity and gene flow among natural populations at local and regional levels is important to implementing Insect Resistance Management (IRM) programs. Then, the objectives of this research were to evaluate the genetic diversity and gene flow among *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) populations collected from major corn-producing regions in Paraguay and two frontier States of Brazil (Mato Grosso do Sul and Paraná). Initially, the frequency of individuals from corn and rice strains was evaluated in different *S. frugiperda* populations evaluated. Out of 14 locations evaluated, the presence of both strains was found in 11 locations; and the corn strain represented 94% of the identified specimens. Using 12 microsatellite loci, higher genetic diversity within populations (87.70%) than among populations within each country (9.91%) and between countries (2.39%). Thus, there was no high genetic structure between *S. frugiperda* populations collected in Paraguay and Brazil. The populations of *S. frugiperda* from

Paraguay were more distinct among themselves when compared with the populations from Brazil. Our results suggest low genetic structure and moderate/high gene flow among different sampling locations of *S. frugiperda* populations as well as between populations from Paraguay and Brazil. Therefore, resistance management strategies of *S. frugiperda* to insecticides and Bt plants should be implemented at regional level considering Paraguay and frontier States of Brazil.

Keywords: *Spodoptera frugiperda*; host races; genetic diversity; gene flow

4.1. Introdução

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), tem sido uma das pragas mais destrutivas do milho no continente americano (CAPINERA, 2008; POGUE, 2002), mas que recentemente foi introduzida no continente africano (GOERGEN et al., 2016). Esta praga não se restringe apenas à cultura do milho, podendo atacar também outras espécies vegetais de importância agrícola como algodão, soja, sorgo, arroz, cana de açúcar e hortaliças, ocasionando grandes perdas econômicas (ANDREWS, 1988; CAPINERA, 2008; CASMUZ et al., 2010; CRUZ; TURPIN, 1982; JUÁREZ et al., 2012, 2014; MEAGHER et al., 2004; POGUE, 2002).

Spodoptera frugiperda é uma praga de alta mobilidade, podendo se dispersar rapidamente em toda área de distribuição do seu hospedeiro. Assim, estudos bioecológicos revelaram que nos EUA apresenta um comportamento migratório temporal, escapando de condições climáticas adversas durante o inverno e sobrevivendo no Sul de Texas e Flórida. Isto se deve ao fato de que *S. frugiperda* não apresenta diapausa em nenhum estágio de desenvolvimento, precisando estar em contínuo contato com seu hospedeiro (PAIR et al., 1986; SPARKS, 1979; WESTBROOK et al., 2016). Portanto nas condições de América do Sul, este comportamento poderia não se aplicar já que o clima e abundância de hospedeiros são propícias para seu desenvolvimento durante todo ano (CRUZ, 1995). Estudos moleculares demonstraram que esta praga apresenta uma especialização associada ao hospedeiro, separando duas raças morfologicamente idênticas, mas com caracteres fisiológicos e comportamentais distintas (NAGOSHI; MEAGHER, 2003, 2004; PASHLEY, 1986; PASHLEY; MARTIN, 1987).

São vários os fatores que determinam a dispersão dos insetos, entre elas se destacam a capacidade de voo dos adultos, especialização pelo hospedeiro, persistência e estrutura espacial do hábitat dentro da paisagem (KEYGHOBADI; ROLAND; STROBECK, 2005; PETERSON; DENNO, 1998). Assim, nos agroecossistemas o manejo dado pelo homem, pode contribuir na dispersão das pragas ocasionando fluxo gênico entre distintas populações, em tanto, o entendimento dos padrões de dispersão é fundamental para implementar estratégias de manejo de pragas (BOHONAK, 1999; BOSSART; PROWELL, 1998).

Nesse contexto, os marcadores moleculares são uma importante ferramenta para estudo de dinâmica populacionais de insetos, já que são capazes de reconhecer e detectar a variabilidade genética e molecular intra e interpopulacionais para auxiliar estratégias de manejo de resistência de insetos a táticas de controle (BUSATO et al., 2004; CHEN; DORN, 2010; CLARK et al., 2007; KASHI; KING, 2006; MARTINELLI et al., 2006, 2007; ROLLINS; WOOLNOUGH; SHERWIN, 2006; SELKOE, K A TOONEN, 2006; SUNNUCKS, 2000; WEI et al., 2013).

Nesse sentido, este trabalho trata-se do primeiro estudo que encara a genética de populações de *S. frugiperda* do Paraguai e Brasil, utilizando marcadores microsatélite, aportando dados relevantes para o manejo regional dessa praga, enfatizando sempre retardar o aumento de alelos que confere resistência dentro das populações em cada região. Reconhecendo a alta mobilidade de adultos de *S. frugiperda* e sabendo que as fronteiras agrícolas entre Brasil e Paraguai são muitos próximos e sem barreira geográficas, estudos da dinâmica populacional desta praga nessa região é de fundamental importância para refinar programas de Manejo de Resistência de Insetos (MRI), pois a evolução de resistência em um dos países pode interferir no manejo da praga no outro, comprometendo as táticas de controle. Assim os nossos objetivos foram: (i) identificar a frequência de indivíduos pertencentes as raças “milho” e “arroz” de *Spodoptera frugiperda* no Paraguai e de regiões fronteiriças do Brasil em cultivos de milho; e (ii) revelar a diversidade genética e o fluxo gênico entre populações de *S. frugiperda* coletadas nas principais regiões do Paraguai e de regiões vizinhas no Brasil.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Insetos

Indivíduos de *S. frugiperda* foram coletados em 14 localidades oriundas do Paraguai (n = 9) e dos estados fronteiriços do Brasil (n = 5) (Tabela 4.1 e Figura 4.1). Os adultos de *S. frugiperda* foram armazenados individualmente dentro de microtubos Eppendorf de 1,5 ml (Axygen), que continham álcool absoluto (PA) e conservados em freezer a -20°C, para evitar degradação do DNA. Foram coletados aproximadamente 50 indivíduos por ponto de coleta e encaminhados para os Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle e de Ecologia Molecular de Artrópodes da ESALQ/USP – Piracicaba/São Paulo para posterior extração de DNA.

Vinte quatro indivíduos de cada um dos 14 pontos de coleta foram utilizados para genotipagem das linhagens mitocondriais, previamente definidas, como raças milho e arroz. Posteriormente, indivíduos oriundos de nove pontos amostrais, cinco do Paraguai e quatro do Brasil, todas coletadas na mesma safra, foram selecionadas para análises com marcadores microssatélites (SSR). O critério utilizado para escolher os nove pontos amostrais para análises com SSR foi baseado na distância geográfica, com intuito de caracterizar o território paraguaio e a região de fronteira com o Brasil. No Paraguai foram escolhidas as populações coletadas nos estados de Itapua (CAL), San Pedro (SP2), Amambay (PJC), Caaguazú (CZU) e Boquerón (CHA). No Brasil foram escolhidas quatro localidades Campo Grande (MS18), Dourados (MS19), Palotina (PR54) e Engenheiro Beltrão (PR55) (Tabela 4.1, Mapa 4.1).

Figura 4.1 – Localidades de coleta de diferentes populações de *S. frugiperda* para caracterização molecular

Tabela 4.1 - Localidades de coletas de *S. frugiperda* para caracterização molecular

População	Estado	Cidade	Latitude	Longitude	Data	Hospedeiro
PARAGUAI						
CTY	Canindeyú	Curuguaty	24°15'43"	55°42'16"	Fev/14	Milho
PIR	Itapúa	Pirapó	26°49'06"	55°23'22"	Abr/14	Milho
CAL	Itapúa	Caros A. López	26°15'15"	54°53'39"	Abr/14	Milho
APA	Alto Paraná	Nva.Esperanza	24°43'43"	54°53'03"	Mar/14	Milho
SP1	San Pedro	Tacurú Ty	24°29'57"	56°42'16"	Mar/14	Milho
SP2	San Pedro	San Pedro Yk.	23°55'04"	57°02'41"	Abr/14	Milho
PJC	Amambay	Pedro Juan Ca.	22°36'32"	55°49'35"	Abr/14	Milho
CZU	Caaguazú	Caaguazú	25°19'51"	55°42'19"	Mai/14	Milho
CHA	Boquerón	Loma Plata	22°25'44"	59°46'13"	Mar/14	Sorgo
BRASIL						
PR52	Paraná	Cascavel	24°57'54"	53°27'53"	Dic/13	Milho
PR54	Paraná	Palotina	24°18' 25"	53°50'58"	Abr/14	Milho
PR55	Paraná	Eng. Beltrão	23°48' 8"	52°15'10"	Abr/14	Milho
MS18	Mato G do Sul	Campo Grande	20°28' 2"	54°41'42"	Abr/14	Milho
MS19	Mato G do Sul	Dourados	22°13' 36"	54°55'56"	Abr/14	Milho

4.2.2 Extração de DNA

Para a extração de DNA foi utilizado o tecido torácico de 24 adultos de *S. frugiperda* provenientes do campo seguindo o protocolo de Doyle e Doyle (1990). Primeiramente, com ajuda de um bisturi foram separadas a cabeça, abdome, asas e pernas do inseto. Em seguida, o tórax foi individualizado em microtubos de 1,5 ml (Axygem) e em câmara de exaustão foi adicionado 650 µl do tampão de extração (10 ml CTAB 2% + 20 µg proteinase K 20 µg/ml + 20 µl β-mercaptoetanol), e triturado com ajuda de um pistilo. Uma vez trituradas, as amostras foram transferidas para banho-maria a 63°C e incubado por uma hora. Posteriormente, foram retiradas e adicionadas 650 µl de CIA 24:1 (24 de clorofórmio e 1 de álcool isoamílico), seguidamente se procedeu a vortexar até homogeneizar e depois centrifugar a 12000 rpm a 4°C por 5 minutos. Em seguida, com ajuda de uma micropipeta foi separado o sobrenadante e transferido em outro microtubo de 1,5 ml. Novamente foi adicionado 650 µl de tampão de extração CTAB 2% (sem proteinase k e β-mercaptoetanol), e 200 µl de CIA 24:1, sendo centrifugado conforme descrito acima, este processo de limpeza foi repetido uma vez mais, dependendo se as amostras ficavam muito sujas. Uma vez terminado esse procedimento, o sobrenadante era separado em outro microtubo de 1,5 ml e adicionado 200 µl de isopropanol gelado e acondicionado em freezer a -20°C durante duas horas; transcorrido esse tempo as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm a 4°C por 10 minutos, seguidamente o isopropanol foi descartado e o pellet resultante de todo esse processo foi lavado com álcool duas vezes, primeiramente com álcool gelado ao 95% por 5 minutos e depois com álcool gelado ao 70% durante 10 minutos, seguidamente foi descartado o álcool e o pellet foi deixado para secar ao vácuo overnight, por último, adicionou-se por cada microtubo 49 µl de água Miliq e 1 µl de RNase, sendo posteriormente armazenado em freezer a -20°C para ser observado em eletroforese de gel de agarose para avaliação da qualidade e quantidade do DNA extraído para sua posterior utilização na análises da variabilidade genética entre as diferentes populações.

4.2.3 Caracterização das raças de *S. frugiperda*

No total foram genotipadas 336 indivíduos de *S. frugiperda* utilizando o marcador PCR-RFLP de um fragmento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) previamente desenvolvido por Nagoshi et al. (2007) e Nagoshi et al. (2012). O DNA extraído dos indivíduos foi amplificado mediante a PCR em um volume total de 10 µl de reação que continham 1,2 µl de buffer de Taq DNA polimerase (10X) (GeneDirex®), 0,5 µl MgCl₂ 25 mM (Promega®), 0,1 µl de dNTP 10 mM (Sinapse inc®), 0,4 µl do primer senso COI893 (5'-CACGAGCATATTTTACATCWGCA-3'), 0,4 µl primer antisenso COI1303 (5'-CAGGATAGTCAGAATATCGACG-3'), 0,06 µl (5u/µl) do Taq DNA polimerase (GeneDirex®), 6,54 µl de H₂O Miliq e 1 µl do DNA diluído (1µl do DNA extraído em 49 µl H₂O). Para a reação do PCR foi realizada um ciclo inicial de 94°C por 1 minuto, seguido de 33 ciclos de 92°C por 45 segundo, 60°C por 45 segundos, 72°C por 60 segundo e um ciclo de extensão final a 72°C por 3 minutos. Seguidamente foi realizada uma digestão com a enzima de restrição EcoRV (Thermo Scientific®), para isto, novamente foi adicionado em outro microtubo 5 µl do produto PCR, 2 µl do buffer da enzima (10X) (Thermo Scientific®), 0,25 µl da enzima de restrição EcoRV (10U/µl), e por último completado com 7,8 µl de H₂O Miliq, dando um volume final de 15 µl, que foi incubada a 37°C por 6 horas ou overnight. As amostras foram analisadas em um gel de agarose ao 2 % com SYBER SAFE (TAE 1X) e foi visualizado em um transiluminador ultravioleta UV.

4.2.4 Amplificação e genotipagem dos marcadores microssatélites

Doze loci de microssatélites foram amplificados para as nove populações de *S. frugiperda*, oito destes loci foram descritos por Arias et al. (2011) e quatro loci descritos por Pavinato et al. (2013) (Tabela 4.2).

Os primers senso dos 12 loci foram marcados com marcadores fluorescentes 6-FAM, HEX e NED (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As amplificações foram realizadas com quatro reações de multiplex contendo três conjuntos de primers, Multiplex1: Spf01-HEX, Spf1592-NED e Spf1706-FAM; Multiplex2: Spf05-HEX, Spf789-NED, Spf918-FAM; Multiplex3: Spf06-HEX, Spf670-NED, Spf997-FAM; Multiplex4: Spf09-HEX, Spf343-NED, Spf1502-FAM. As reações de PCR foram realizadas em volume final de 10 µL, contendo 1 µL DNA genômico das amostras;

0,5 µL de cada iniciadores senso com fluorescência (HEX, NED, FAN); 0,5 µL de iniciador antisenso, 0,1 µL dNTPs (Sinapse inc®); 1,5 µL buffer (10X) (GeneDirex®), 0,06 µL de Taq polimerase (GeneDirex®); completando com 6,14 µL água Milli-Q. A reação foi incubada em termociclador (Applied biosystems®), programado para realizar uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 32 ciclos compostos por 40 segundos de desnaturação a 94°C, 45 segundos com temperatura de 60°C, e 80 segundos a 72°C seguido de uma extensão final de 25 minutos a 72°C. Primeiramente os produtos do PCR, foram diluídos 1:20, sendo essa diluição utilizada para genotipagem. Seguidamente foram preparados em microplacas (PCR® MICROPLATE; PCR-96M2-HS-C AXYGEN) para um volume final de 10,0 µL contendo 2,0 µL do produto das PCRs (Multiplex), 7,80 µL de Formamida Hi-Di (Applied Biosystems®), e 0,20 µL GeneScan 500 Rox size standard (Applied Biosystems®). A avaliação de polimorfismo foi realizada em sequenciador ABI PRISM 3130xl DNA Analyser (Applied Biosystems®) no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia da ESALQ/USP. Posteriormente, a identificação e edição dos fragmentos foi realizada no programa GeneMarker v.2.7.0 (SoftGenetic LLC®).

Tabela 4.2 - Características do 12 loci de microssatélites para *S. frugiperda*

Locus	GenBank acesso	Motivos	Primers	Amplitude de tamanho dos alelos (bp)*	Referencia
Spf01	GF110935	(TG) ₇ 14 bp(AAAGG) ₂	F: TTTTGATTGGGTTTTGGCAT R: GGCTTTTATGGCAACGGATA	258 – 308	Pavinato et al., 2013
Spf05	GF100742	(AC) ₅	F: AGACCCACCCACACACTCAC R: GGAATCGCAAACATTTGTCC	196 – 258	Pavinato et al., 2013
Spf06	GF100743	(AC) ₁₂	F: CAGAGAAATGCTCTTCTGACTCTT R: GGTGATTTATGCTCAAGCCTTC	128 – 166	Pavinato et al., 2013
Spf09	GF100744	(AC) ₅	F: TCAAGCCCTATCGGTCAATC R: CGTGCATTTTTATGCTTTGG	204 – 278	Pavinato et al., 2013
Spf343	HM752609	(TG) ₁₂	F: GTCAAAGTTTTACATGGAAGCGTG R: CCCATCTGTTTGTCCACAGTAAAG	109 – 143	Arias et al., 2011
Spf670	HM752637	(CAT) ₅	F: GGGAGAGGTTTCTAGCTTCTACGG R: GAGGAGCCTTGGTTCAATAGTGC	116 – 158	Arias et al., 2011
Spf789	HM752653	(CACAC) ₄	F: CGACACGTTGATTGCTCACAG R: AATCTTTTATCACAATTCGCAGCC	178 – 212	Arias et al., 2011
Spf918	HM752666	(TG) ₆	F: GCGAAATTGTTTTAATGTGGGTTG R: ACGACCTATACGGACCTTGTTACG	110 – 140	Arias et al., 2011
Spf997	HM752675	(TACA) ₄	F: TTGATGCATGAATTTTCAAACGAG R: ATCACGTTGTGGTCCAATCAATG	95 – 139	Arias et al., 2011
Spf1502	HM752731	(CA) ₁₂	F: TTTGCAATTTTAGTTACAAACGTCCTC R: TATTGATAGCCTCGTGTTTGACCC	182 – 230	Arias et al., 2011
Spf1592	HM752740	(TG) ₁₀	F: GGTTCTGTTATCACCTGCAGTA R: CTATGTAGTTTATGTTAATTCGCACGAT	183 – 229	Arias et al., 2011
Spf1706	HM752751	(AC) ₉	F: CCACTGTACTGTGATAAACAGATGGC R: ATGATCATACAAAGTGCATCCGTG	107 – 139	Arias et al., 2011

* Amplitude de tamanho dos alelos são correspondentes aos resultados obtidos no presente trabalho; Temperatura de anelamento foi de 60°C para todos loci.

4.2.5 Análise dos dados de microssatélites

Os testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação foram estimados pelo programa FSTAT (GOUDET, 2001) e a frequência de alelos nulos utilizando o aplicativo MICRO-CHECKER v.2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). O número de alelos por locus, número de alelos privados, a heterozigosidade média observada, a heterozigosidade média esperada para cada população foi estimado utilizando o programa GDA versão 1.1 (LEWIS; ZAYKIN, 2001). Para as análises entre populações foram estimados os índices de fixação dentro das populações (F_{IS}), índice de fixação total (F_{IT}) e divergência genética entre populações (F_{ST}) (WEIR; COCKERHAM, 1984) e a estimativa R_{ST} (SLATKIN, 1995) utilizando o software FSTAT (GOUDET, 2001). Para estas análises foi utilizado o método de reamostragem “bootstrap”, com 95% de intervalo de confiança, com 1000 permutações. Análises de variância molecular (AMOVA), para diferenças intra e interpopulacional, foram realizadas com o aplicativo Arlequin 3.1.0 (EXCOFFIER et al., 2006) os parâmetros de variância molecular Φ_{st} , Φ_{ct} e Φ_{sc} com significância testada de 1000 permutações. Também foi obtida uma matriz de pares de F_{ST} (WEIR; HILL, 2002) entre cada uma das nove populações (EXCOFFIER et al., 2006) com significância testada de 100 permutações. Utilizando o aplicativo Structure v.2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000) nós ainda exploramos a distribuição de variação genética dos indivíduos através de uma estimativa do número de grupos bayesianos (K) que abrangesse os nove locais de amostragem dos insetos. Este aplicativo utiliza uma abordagem Bayesiana, baseado na cadeia de Monte Carlo Markov (MCMC), que agrupa indivíduos dentro de grupos (K) que privilegiam o equilíbrio de Hardy-Weinberg e o desequilíbrio de ligação entre os marcadores dentro do mesmo grupo. Para isso, realizamos 10 corridas, com um burnin conjunto de 150.000 replicações seguidas por 600.000 de passos de MCMC para um número de grupos variando de K=2 a K=10. Para a obtenção do melhor K foi utilizado o parâmetro de ΔK (EVANNO et al., 2005).

4.3 Resultados

4.3.1 Caracterização das raças de *S. frugiperda*

No total foram genotipadas 336 indivíduos de *S. frugiperda* em 14 populações (nove no Paraguai e cinco no Brasil), das quais em 11 localidades (78,4%), foram confirmadas a presença das duas raças. No Paraguai, somente na localidade PJC não foi constatada a presença da raça “arroz”, e no Brasil nas localidades MS18 e MS19 que corresponde ao estado de Mato Grosso do Sul. Em todos os casos, a raça “milho” foi predominante nas populações estudadas. A população PR55 teve a presença de maior número de exemplares da raça “arroz”, quatro indivíduos que representa 16% do total; nas demais localidades a porcentagem foi variando em meia entre 4 a 8% respectivamente (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Número de indivíduos de *S. frugiperda* das raças “milho” e “arroz” coletados em diferentes regiões do Paraguai e nas regiões fronteiriças do Brasil

População	Estado	Cidade	Número	Raças	
				"milho"	"arroz"
PARAGUAI					
CTY	Canindeyú	Curuguaty	24	23	1
PIR	Itapuá	Pirapo	24	23	1
CAL	Itapuá	Caros A López	24	23	1
APR	Alto Paraná	Nueva Esperanza	24	22	2
SP1	San Pedro	Tacurú Ty	24	22	2
SP2	San Pedro	San Pedro	24	23	1
PJC	Amambay	Pedro J Caballero	24	24	0
CZU	Caaguazú	Caaguazú	24	22	2
CHA	Boquerón	Loma Plata	23	21	2
BRASIL					
PR52	Paraná	Cascavel	24	22	2
PR54	Paraná	Palotina	24	22	2
PR55	Paraná	Engenheiro Beltrão	24	20	4
MS18	Mato G do Sul	Campo Grande	24	24	0
MS19	Mato G do Sul	Dourados	24	24	0

4.3.2 Índices de diversidade genética e fluxo gênico

O locus Spf06 apresentou tamanho de amplificação de bandas diferente daquelas descritas por Pavinato et al., (2013), somado ao baixo polimorfismo do locus, nós optamos por eliminar o locus das análises subsequentes. O locus Spf09 demonstrou um excesso de homozigotos para maioria das classes de tamanho de alelos sugerindo a presença de alelos nulo. A presença de alelo nulo sugere que em alguns casos os indivíduos heterozigotos são erroneamente identificados como homozigotos para os loci onde a presença deste tipo de alelo é confirmada. Assim, nós optamos em eliminar o locus Spf09 das análises subsequentes. A análise de desequilíbrio de ligação, com correção de Bonferroni, apontou que todas as combinações de loci aceitaram a hipótese de desequilíbrio de ligação ($p > 0.000909$) apontando que os loci são marcadores moleculares independentes.

O número médio de alelos por loci variou de 5,2 alelos para a população de CHA e 8,4 para a população de PR54 e PR55 (Tabela 4.4). O número de alelos privados variou de 9 a 1 para a população CZU e as populações CHA e MS19, respectivamente. A heterozigosidade esperada variou entre 0,73 a 0,54 para as populações PR55 e CHA. Já heterozigosidade observada variou de 0,71 para CZU e 0,56 para MS19 (Tabela 4.4). O coeficiente de endogamia variou de -0,14 para SP2 a 0,16 para PR54 (Tabela 4.4). Todos os loci dentro das populações estudadas estão dentro dos princípios do Equilíbrio de Hard-Weinberg. Baseados nos índices número médio de alelos/loci e heterozigosidade observada, as populações brasileiras apresentaram uma maior diversidade genética quando comparadas com as populações paraguaias (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Características das nove populações amostradas de *S. frugiperda*, para 10 loci polimórficos de microsatélite: tamanho médio da amostra sobre todos os locus (n); número médio de alelos por locus (A/loco); número de alelos privados (A_{PRIV}); heterozigosidade esperada (H_E); heterozigosidade observada (H_O); e coeficiente de endogamia (F_{IS}) (Wright, 1951)

População (código)	n	A/loco	A_{PRIV}	H_E	H_O	F_{IS}
Paraguai						
CAL	23,9	7,0	5	0,69	0,65	0,06
CZU	23,6	6,5	9	0,69	0,71	-0,03
CHA	23,0	5,2	1	0,54	0,59	-0,09
PJC	22,2	6,8	5	0,69	0,70	-0,01
SP2	23,9	5,3	3	0,60	0,68	-0,14
Média	23,3	6,2	23*	0,64	0,67	-0,04
Brasil						
PR54	23,0	8,4	5	0,72	0,60	0,16
PR55	23,8	8,4	8	0,73	0,66	0,10
MS18	23,4	8,1	8	0,70	0,65	0,08
MS19	23,9	6,4	1	0,61	0,56	0,08
Média	23,5	7,8	22*	0,69	0,62	0,11
MÉDIA	23,41	6,9	45*	0,66	0,65	0,03

* Refere-se a soma dos alelos privados

Os índices de fixação global ($F_{ST} = 0,113$ e $R_{ST} = 0,153$) demonstraram moderada diferenciação genética entre as populações estudadas. Já quando dividimos em dois grupos, de acordo com a localização geográfica, Brasil e Paraguai, a diferenciação genética entre os países foi baixa ($F_{ST} = 0,046$ e $R_{ST} = 0,029$). A diferenciação genética entre as populações dentro de cada país foi baixa/moderada para o Brasil $F_{ST} = 0,062$ e $R_{ST} = 0,030$ e moderada/alta para o Paraguai $F_{ST} = 0,131$ e $R_{ST} = 0,210$ (Tabela 4.5). Os coeficientes de autozigosidade (F_{IT}) e o coeficiente de endogamia (F_{IS}) não variaram entre as divisões das populações considerando a localização geográfica, com valores de 0,027 a 0,106 e -0,04 a 0,107, respectivamente (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 - Índices de diferenciação genética F_{IT} , F_{ST} e F_{IS} (WEIR; COCKERHAM, 1984) e R_{ST} (SLATKIN, 1995) para populações de *S. frugiperda*

Grupo (N)	R_{ST}	F_{ST}	F_{IT}	F_{IS}
Global (9)	0,153	0,113*	0,137*	0,027 ^{ns}
Paraguai (5)	0,210	0,131*	0,097 ^{ns}	-0,040 ^{ns}
Brasil (4)	0,030	0,062*	0,162*	0,107 ^{ns}
Paraguai vs Brasil	0,029	0,046*	0,146*	0,106 ^{ns}

* Significativo a $p < 0,05$;

A análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou que nos nove locais estudados a maior parte da diversidade está dentro das populações (88,66%, $\Phi_{ST}=0,113$). Quando dividimos os locais amostrados por países (Brasil e Paraguai), a maior parte da variação ainda foi alojada dentro de populações (87,70%, $\Phi_{ST}=0,123$), sendo apenas 2,39% e 9,91% da variabilidade explicada entre os países e entre populações dentro do mesmo país, respectivamente (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 - Análise de variância molecular (AMOVA) para estrutura genética de populações de *S. frugiperda*

Fonte de variação	Soma de quadrados	Componente de variância	Variância (%)	Índice de Fixação
Entre populações	185,57	0,425	11,35	$\Phi_{ST}=0,113^*$
Dentro de populações	1367,98	3,321	88,66	
Total	1553,55	3,747		
Entre países (Paraguai x Brasil)	39,91	0,091	2,39	$\Phi_{CT}=0,024^*$
Entre populações dentro de país	145,66	0,375	9,91	$\Phi_{SC}=0,101^*$
Dentro de populações	1367,98	3,321	87,70	$\Phi_{ST}=0,123^*$
Total	155,55	3,825		

* Significativo a $p < 0,05$;

As divergências genéticas entre as populações estudadas, utilizando o índice F_{ST} (WEIR; HILL, 2002) por comparações de pares a pares ($p < 0,05$) são apresentados na tabela 4.7. A maioria das populações divergiram entre si no nível moderado ($F_{ST} = 0,05 - 0,15$) a alto ($F_{ST} = 0,15 - 0,25$). As populações mais

divergentes foram provenientes de indivíduos coletados em MS19 e CHA com $F_{ST} = 0,201$ e as populações mais similares geneticamente foram as populações provenientes de PR55 e PR54 ($F_{ST} = 0,015$) e PR55 e PJC ($F_{ST} = 0,04$) (Tabela 4.7).

Tabela 4.7 - Matriz de pares de (WEIR; HILL, 2002) entre cada uma das populações de *S. frugiperda*

	CAL	CZU	CHA	PJC	SP2	PR54	PR55	MS18
CZU	0,096							
CHA	0,106	0,140						
PJC	0,116	0,161	0,168					
SP2	0,110	0,156	0,150	0,096				
PR54	0,091	0,132	0,134	0,019	0,102			
PR55	0,067	0,123	0,132	0,04	0,120	0,015		
MS18	0,055	0,109	0,051	0,097	0,091	0,081	0,121	
MS19	0,161	0,190	0,201	0,114	0,088	0,084	0,122	0,125

A estrutura genética entre os locais estudados determinada pelo STRUCTURE com convergência entre as análises realizada pelo parâmetro ΔK (EVANNO et al., 2005) convergiu para $K=6$ (Figura 4.2). Considerando $K = 6$, os indivíduos se agruparam de acordo com sua origem geográfica, com maior proximidade genética entre os indivíduos provenientes de CHA e PJC no Paraguai (cluster rosa), entre as populações paraguaia SP2 e brasileira MS19 (cluster roxo) e entre três populações brasileiras PR55, PR54 e MS18 (clusters azul e verde) (Figura 4.2.). As populações CAL (cluster laranja) e CZU (cluster amarelo) são distintas das outras populações estudadas.

Os indivíduos previamente caracterizados como raça arroz não apresentaram diferenças significativas na composição genética quando comparados aos indivíduos da raça milho (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Gráfico obtido do aplicativo STRUCTURE conduzida para indivíduos de *S. frugiperda*, com $K = 6$. Cada grupo (K) com suas similaridades alélicas representadas por uma cor, cada indivíduo é representado por uma barra vertical. *Indivíduos genotipados como raça arroz.

4.4. Discussão

As 14 populações de *S. frugiperda* coletadas nas principais regiões produtoras de milho no Paraguai e nas regiões de fronteira do Brasil, especificamente nos estados de Paraná e Mato Grosso do Sul, permitiram caracterizar 336 exemplares mediante a técnica PCR-RFLP, utilizando os iniciadores COI-837F e COI-1303R (NAGOSHI; SILVIE; MEAGHER, 2007). A raça milho foi predominante em todas as localidades com 316 indivíduos (94%), e a raça arroz com apenas 16 indivíduos (6%). A predominância da raça milho pode ser explicada pela quase totalidade das coletas dos insetos terem sido realizadas em cultivos de milho (CANO-CALLE; ARANGO-ISAZA; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2015; ROSAS-GARCÍA et al., 2016). Preliminarmente, outros estudos têm reportado frequentemente a presença de indivíduos classificados como raça arroz na cultura de milho na América do Sul (CANO-CALLE; ARANGO-ISAZA; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2015; JUÁREZ et al., 2012, 2014; VÉLEZ-ARANGO et al., 2008).

Os eventos de mistura das raças milhos e arroz em hospedeiros inicialmente não preferíveis entre as raças podem estar ligados ao aumento das fronteiras agrícolas, a implementação de novas tecnologias de plantio e o intenso sistema de cultivo que promoveram (e ainda promovem) alterações na sucessão e no locais de plantios de diferentes hospedeiros/cultivos (FARIAS et al., 2014a, 2014b). Na década de 1980 tivemos a expansão da área agrícola para o bioma cerrado e recentemente nos anos 2000 para o Norte/Nordeste do continente (floresta

amazônica e caatinga/cerrado), o que mudou a dinâmica dos plantios de cereais na América do Sul. Esses fatores aumentaram a disponibilidade alimento para insetos-praga polípagos e com alto potencial de dispersão como *S. frugiperda*, o que pode favorecer a ocorrência de diferentes raças de *S. frugiperda* na mesma área, com a possibilidade de formação de indivíduos híbridos e homogeneização de alelos entre as populações (CANO-CALLE; ARANGO-ISAIZA; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2015; NAGOSHI; MEAGHER; HAY-ROE, 2012).

O fluxo gênico é fundamental para determinar o potencial de diferenciação genética entre as populações, a dispersão geográfica e a adaptação local, principalmente em áreas perturbadas e de recente colonização, de populações de diferentes organismos (KEYGHOBADI; ROLAND; STROBECK, 2005). Os resultados das análises dos loci microssatélites não demonstraram alta estruturação genética entre as populações de *S. frugiperda* coletadas entre o Paraguai e Brasil, o que sugere significativo e constante fluxo gênico desta praga entre ambos países, influenciado pela distância geográfica entre as localidades. No entanto, as populações do Paraguai mostraram-se mais distintas entre si (dentro do país) quando comparada com as populações do Brasil. De acordo com o STRUCTURE existem quatro clusters genéticos bem definidos no Paraguai que demonstra moderada a alta estruturação genética das populações de *S. frugiperda* dentro do país, sendo um destes cluster compartilhado com o Brasil. No Brasil além do cluster compartilhado com o Paraguai existem dois clusters genéticos que demonstram alto fluxo gênico entre as populações de PR55, PR54 e MS18. Souza et al., (2015) confirmou alto fluxo gênico entre as populações brasileiras de *S. frugiperda*, com a formação de apenas dois cluster genéticos entre os indivíduos amostrados. *Spodoptera frugiperda* apresenta uma ampla capacidade de dispersão, podendo se deslocar a grandes distâncias em procura de hospedeiro, além disso, esta espécie tem alto potencial reprodutivo e comportamento de múltiplos acasalamentos (CLARK et al., 2007; PAIR et al., 1986; SPARKS, 1979). Somado a isso, a região produtora de milho no Paraguai se concentra nos estados fronteiriços com Brasil, favorecendo ainda mais cruzamento entre as populações de ambos os países (MAG, 2014).

Nossa análise de múltiplos loci de SSR demonstrou que os indivíduos identificados como raça arroz e milho pelo genoma mitocondrial apresentaram alta

similaridade genética entre si. Esses resultados sugerem que as forças evolutivas que promoviam o isolamento reprodutivo entre as raças estão diminuindo e a completa homogeneização das raças de *S. frugiperda* pode ser uma realidade a curto prazo. A presença de híbridos entre as raças milho e arroz de *S. frugiperda* foi recentemente reportada em vários outros estudos na América do Sul, fatos que reforçam os nossos resultados (CANO-CALLE; ARANGO-ISAHA; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2015; NAGOSHI; MEAGHER; HAY-ROE, 2012; VÉLEZ-ARANGO et al., 2008).

O moderado/alto fluxo gênico entre as populações de *S. frugiperda* entre os locais estudados e a baixa diferenciação genética entre as populações paraguaias e da fronteira com o Brasil são informações importantes para o manejo sustentável das populações dessa praga em ambos os países. Desta forma, medidas regionais de controle e manejo de resistência à táticas de controles devem ser encaradas de maneira conjunta nas áreas fronteiriças entre Paraguai e Brasil, como por exemplo a utilização de inseticida com mesmo mecanismos de ação e plantio de eventos transgênico que expressam a mesma proteína em épocas iguais e com implementação de área de refúgio para diminuir a pressão de seleção. Essas estratégias podem prolongar a vida útil das tecnologias de milho que expressam a proteína *Bt* e de novos inseticidas liberados no mercado para controle de *S. frugiperda*, visto que o constante fluxo gênico entre as regiões proporciona que falhas de manejo localizadas causem problemas em áreas mais amplas (GEORGHIOU, 1994; GEORGHIOU; TAYLOR, 1977a; SHELTON et al., 2000; TABASHNIK, 2008; TABASHNIK et al., 2008).

4.5 Conclusões

- Há predominância da raça milho (94% dos indivíduos coletados) de *S. frugiperda* na cultura do milho no Paraguai e na região de fronteira com o Brasil.
- As populações coletadas na fronteira com o Brasil apresentam maior diversidade genética que as populações coletadas dentro do território paraguaio.

- Há moderado a alto fluxo gênico entre as populações de *S. frugiperda* quando avaliadas globalmente.
- As populações provenientes do Paraguai apresentam uma moderada/alta estruturação genética dentro do país.
- Os indivíduos de *S. frugiperda* identificados como raça milho ou raça arroz não apresentam diferenciação genética inferida por marcadores SSR.

Referencias

ANDREWS, K. L. Latin American Research on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **The Florida Entomologist**, v. 71, n. 4, p. 630, 1988.

ARIAS, R. S.; BLANCO, C. A.; PORTILLA, M.; SNODGRASS, G. L.; SCHEFFLER, B. E. First microsatellite from *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and their potential use for population genetics, **Annals of the Entomological Society of America**, v. 104, n. 3, p. 576-587, 2011.

BOHONAK, A. J. Gene flow and population structure. **The Quarterly Review of Biology**, v. 74, n. 1, p. 21–45, 1999.

BOSSART, J. L.; PROWELL, D. P. Genetic estimates of population structure and gene flow: limitations, lessons and new directions. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 13, n. 5, p. 202–206, 1998.

BUSATO, G. R. et al. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 709–716, 2004.

CANO-CALLE, D.; ARANGO-ISAIZA, R. E.; SALDAMANDO-BENJUMEA, C. I. Molecular Identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Corn and Rice Strains in Colombia by Using a PCR-RFLP of the Mitochondrial Gene Cytochrome Oxidase I (COI) and a PCR of the Gene FR (For Rice). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 108, n. 2, p. 172–180, 2015.

CAPINERA, J. **Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)**. University of Florida, v. EENY098, p. 1–6, 2008.

CASMUZ, A. et al. Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista de la Sociedad Entomologica Argentina**, v. 69, n. 3–4, p. 209–231, 2010.

CHEN, M. H.; DORN, S. Microsatellites reveal genetic differentiation among populations in an insect species with high genetic variability in dispersal, the codling

moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 100, n. 1, p. 75–85, 2010.

CLARK, P. L. et al. Population Variation of the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in the Western Hemisphere. **Journal of Insect Science**, v. 7, n. 5, p. 1–10, 2007.

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas, **EMBRAPA: CNPMS**, 1995, p.45, (Circular Técnica 21).

CRUZ, I.; TURPIN, E. Efeito da *Spodoptera frugiperda* em diferentes estádios de crescimento da cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 17, n. 3, p. 355–359, 1982.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue, **Focus**, v12, p.13-15, 1990.

DUMAS, P. et al. *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) host-plant variants: two host strains or two distinct species? **Genetica**, v. 143, n. 3, p. 305–316, 2015.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology Resource**, Oxford, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2002.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin v. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, Auckland, v. 1, p. 47, 2006.

FARIAS, J. R. et al. Geographical and Temporal Variability in Susceptibility to Cry1F Toxin From *Bacillus thuringiensis* in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Populations in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 6, p. 2182–2189, 2014a.

FARIAS, J. R. et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, v. 64, p. 150–158, 2014b.

GEORGHIOU, G. P. Principles of insecticide resistance management. **Phytoprotection**, v. 75, n. 4, p. 51–59, 1994.

GEORGHIOU, G. P.; TAYLOR, C. E. Operational Influences in the Evolution of Insecticide Resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 70, n. 5, p. 653–658, 1977.

GOERGEN, G. et al. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. 1–9, 2016.

GOUDET, J. FSTAT 2.9.3: FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices 2001. Disponible em:

<<http://www.citeulike.org/user/argosmarulanda/article/7617994>>

JUÁREZ, M. L. et al. Host Association of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Corn and Rice Strains in Argentina, Brazil, and Paraguay. **Journal of Economic Entomology**, v. 105, n. 2, p. 573–582, 2012.

JUÁREZ, M. L. et al. Population structure of *Spodoptera frugiperda* maize and rice host forms in South America: are they host strains? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 152, n. 3, p. 182–199, 2014.

KASHI, Y.; KING, D. Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 5, p. 253–259, 2006.

KEYGHOBADI, N.; ROLAND, J.; STROBECK, C. Genetic differentiation and gene flow among populations of the alpine butterfly, *Parnassius smintheus*, vary with landscape connectivity. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 7, p. 1897–1909, 2005.

LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. Genetic data analysis (GDA 1.1): computer program for the analysis of allelic data, 2001. Disponible em: <<http://en.bio-soft.net/dna/gda.html>>

MARTINELLI, S. et al. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 99, n. 2, p. 519–526, 2006.

MARTINELLI, S. et al. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. **Bulletin of entomological research**, v. 97, n. 3, p. 225–31, 2007.

MEAGHER, R. L. et al. Larval development of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on different cover crop plants. **Florida Entomologist**, v. 87, n. 4, p. 454–460, 2004.

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA – MAG, **Síntesis Estadísticas: Producción Agropecuaria**, 2014, Asunción – Paraguay, 47p.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. Fall armyworm FR sequences map to sex chromosomes and their distribution in the wild indicate limitations in interstrain mating. **Insect Molecular Biology**, v. 12, n. 5, p. 453–458, 2003.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L. Behavior and distribution of the two fall armyworm host strains in Florida. **Florida Entomologist**, v. 87, n. 4, p. 440–449, 2004.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L.; HAY-ROE, M. Inferring the annual migration patterns of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in the United States from mitochondrial haplotypes. **Ecology and Evolution**, v. 2, n. 7, p. 1458–1467, 2012.

NAGOSHI, R. N.; SILVIE, P.; MEAGHER, R. L. Comparison of haplotype frequencies differentiate fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) corn-strain populations from Florida and Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 100, n. 3, p. 954–961, 2007.

PAIR, S. D. et al. Fall Armyworm Distribution and Population Dynamics in the Southeastern States. **The Florida Entomologist**, v. 69, n. 3, p. 468, 1986.

PAVINATO, V. A. C.; MARTINELLI, S.; LIMA, P. F.; ZUCCHI, M. I.; OMOTO, C. Microsatellite markers for genetic studies of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 1, p. 370–380, 2013.

PASHLEY, D. P. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex?, **Annals of the Entomological Society of America**, v. 79, n. 6, p. 898–904, 1986.

PASHLEY, D. P.; MARTIN, J. A. Reproductive Incompatibility Between Host Strains of the Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 80, n. 6, p. 731–733, 1987.

PETERSON, M. A.; DENNO, R. F. The Influence of Dispersal and Diet Breadth on Patterns of Genetic Isolation by Distance in Phytophagous Insects, **The American Naturalist**, v. 152, n. 3, p. 428–446, 1998.

POGUE, M. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **American Entomological Society**, n. 43, p. 202, 2002.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population using multilocus genotype data. **Genetics**, Pittsburgh, v. 155, n. 2, p. 945–959, 2000.

ROLLINS, L. A.; WOOLNOUGH, A. P.; SHERWIN, W. B. Population genetic tools for pest management: a review. **Wildlife Research**, v. 33, n. 4, p. 251, 2006.

ROSAS-GARCÍA, N. M. et al. Identificación de Biotipos de *Spodoptera frugiperda* Provenientes de Plantas Hospederas de Maíz en Diferentes Regiones de México. **Southwestern Entomologist**, v. 41, n. 3, p. 761–770, set. 2016.

SANS, L. A.; GUIMARAES, G. P. Zoneamento Agrícola, Época de plantio do milho, in: CRUZ, I et al. (Ed.). **Cultivo do Milho: Sistema de Produção**, 2010, Sete Lagoas: EMBRAPA - CNPMS, 6ª edição, versão eletrônica, disponível em: http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/index.htm

SELKOE, K A TOONEN, R. J. REVIEWS AND Microsatellites for ecologists : a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v.9, n.5, p. 615–629, 2006.

SHELTON, A M. et al. Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 339–342, 2000.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v.139, n. 1, p.457-462, 1995.

SOUZA, I. R. P. et al. Population Structure of *Spodoptera frugiperda* Collected in Maize from Different Brazilian Geographic Regions. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 14, n. 3, p. 300–315, 2015.

SPARKS, A. N. A Review of the Biology of the Fall Armyworm. **The Florida Entomologist**, v. 62, n. 2, p. 82–87, 1979.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, n. 5, p. 199–203, 2000.

TABASHNIK, B. E. Delaying insect resistance to transgenic crops. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 49, p. 19029–19030, 2008.

TABASHNIK, B. E. et al. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 199–202, 2008.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. Micro-checker: Software for identifying and correcting genotyping error in microsatellite data, *Molecular Ecology Notes*, London, v. 4, p. 535-538, 2004.

VÉLEZ-ARANGO, A. N. A. M. et al. Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mediante marcadores mitocondriales y nucleares. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 34, n. 63, p. 145–150, 2008.

WEI, S. J. et al. Genetic Structure and Demographic History Reveal Migration of the Diamondback Moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from the Southern to Northern Regions of China. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population-Structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.

WEIR, B. S.; HILL, W. G. Estimating F- Statistics. **Annual Review of Genetics**, v. 36, p. 721-750, 2002.

WESTBROOK, J. K. et al. Modeling seasonal migration of fall armyworm moths. **International Journal of Biometeorology**, v. 60, n. 2, p. 255–267, 2016.