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

**Variabilidade do feromônio sexual de diferentes populações
brasileiras de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera:
Noctuidae)**

Luiza Cristiane Fialho Zazycki

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

**Piracicaba
2014**

Luiza Cristiane Fialho Zazycki
Engenheira Agrônoma

**Variabilidade do feromônio sexual de diferentes populações brasileiras de
Spodoptera frugiperda (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ MAURICIO SIMÕES BENTO**

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

Piracicaba
2014

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

Zazycki, Luiza Cristiane Fialho

Variabilidade do feromônio sexual de diferentes populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae / Luiza Cristiane Fialho Zazycki. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.
88 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Feromônio 2. Variabilidade genética 3. Lagarta-do-cartucho 4. Populações
5. Semioquímicos I. Título

CDD 632.78
Z39v

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte -O autor"

DEDICATÓRIA

Aos meus exemplos de conduta,

meus maiores incentivadores.

Pelo amor incondicional,

pela compreensão,

aos meus pais

Alberto e Mara,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. José Mauricio Simões Bento, pela orientação, oportunidades, e ensinamentos, por mostrar-me que é possível viver em equilíbrio.

Ao Prof. Fernando Luis Cônsoli, pelo espaço no Laboratório de Interações em Insetos e pela orientação nas etapas das análises moleculares.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ, pelos ensinamentos e colaboração em todas as etapas de execução da tese.

A Dra. Rejane Cristina Roppa Kuss-Roggia, Dr. Edson Hirose, Dr. Rafael Major Pitta, Dra. Ana Paula Afonso, Msc. Jovenil José da Silva, Msc. Izidro dos Santos de Lima Junior e a Msc. Vânia Lúcia do Nascimento, pela colaboração na coleta do material de origem deste trabalho.

Ao grupo do Laboratório de Semioquímicos da Universidade Federal do Paraná, em especial ao aluno Diogo Vidal, pela síntese dos compostos.

Aos colegas da Pós-graduação em Entomologia em especial aos do Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos e do Laboratório de Interação em Insetos, pelos momentos e conhecimentos compartilhados.

A Dra. Rejane Kuss-Roggia, minha parceira nesse trabalho, pela acolhida, ensinamentos, dificuldades e, sobretudo amizade. Poucas pessoas conseguiriam desenvolver um trabalho tão complexo, compartilhando tarefas e reunindo esforços em prol de um objetivo comum.

Aos alunos de iniciação científica, carinhosamente “meus filhotinhos”, Camila Serra Colepicolo, Lucas Costa Sartori e Amanda Lemes pela ajuda indispensável em todas as etapas, também a Kelly Alves, Karina Bottini Liva e

Kenya Faggioni, pela colaboração durante o tempo em que trabalharam na tese.

A Arodí Prado Favaris, pelos ensinamentos em cromatografia, pelo otimismo e amizade, por toda a colaboração durante as análises.

A “fofinha” Aline Guidolin, pelo assessoramento indispensável em “assuntos moleculares”, pela paciência ao ensinar e contribuir com todas as etapas, por fazer tudo parecer relativamente simples e até divertido.

Ao amigo Oderlei Bernadi, pelo incentivo e pela ajuda, seus conselhos foram muito importantes na minha vida Piracicabana, obrigada pelos ensinamentos e a amizade durante esses dez anos.

A “florzinha”, Talita A. Silveira, pelo riso nos dias bons e conforto nos não tão bons, por acreditar nos desafios.

Ao amigo “Fernandito”, Milton Fernando Cabezas Guerrero, pelo incentivo, pelo auxílio e ensinamentos estatísticos.

A amiga Camila Costa pela boa convivência, auxílio e dicas de formatação.

A “diva” Rafaela Santos, pelas boas risadas e humor implacável.

A Carla Fávaro, pelo auxílio na confirmação dos compostos e boa convivência no período da execução da tese.

Aos meus pais, Alberto Zazycki e Mara Virginia Fialho Zazycki, pelo amor e incentivo durante minha formação e sobretudo pela compreensão nos muitos momentos em que estive ausente. Aos meus irmãos, Paulo Fialho Zazycki e Claudio Fialho Zazycki, e a minha cunhada Ana Paula Ribeiro Zazycki pelo carinho e incentivo.

Ao meu namorado Mauber Moreira, pelo apoio, positivismo, amor e compreensão nos momentos difíceis.

A Silvia M. Zinsly e Eliana M. Garcia pela compreensão e auxílio.

A todas as pessoas que encontrei durante a minha formação, cada uma com a sua história, vocês me mostraram um lindo caminho para aceitar as diferenças entre as pessoas, obrigada pelos exemplos, momentos divididos, por fazer os meus dias ainda mais “animados”.

A Universidade de São Paulo - ESALQ, pela oportunidade de fazer parte de seu corpo docente.

Ao CNPq pela concessão da bolsa, e ao ICNT: Semioquímicos na Agricultura e FAPESP pela estrutura e apoio financeiro.

*"Ninguna fuerza abatirá tus sueños,
Porque ellos se nutren con su propia luz.
Se alimentan de su propia pasión.
Renacen cada día, para ser.
Puede perseguirte la adversidad,
Aquejarte el mal físico,
Empobrecerte el medio, desconocerte el mundo,
Pueden burlarse y negarte los otros,
Pero es inútil, nada apagará la lumbre de tu antorcha"*

Atahualpa Yupanqui

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	21
1 INTRODUÇÃO	23
2 DESENVOLVIMENTO	25
2.1 Revisão Bibliográfica	25
2.1.1 Aspectos bioecológicos de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).....	25
2.1.2 Feromônios sexuais de lepidópteros	26
2.1.3 Estudos com feromônio de <i>Spodoptera frugiperda</i>	28
2.1.4 Variação na composição feromonal de <i>Spodoptera frugiperda</i>	29
2.2 Material e Métodos	31
2.2.1 Insetos	31
2.2.2 Estudos da variabilidade genética das populações de <i>Spodoptera frugiperda</i>	36
2.2.3 Cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia (CG/EAG)	40
2.2.4 Abundância relativa dos compostos e confirmação dos compostos por injeção do padrão sintético do feromônio	42
2.2.5 Bioensaios em túnel de vento	44
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.1 Diversidade genética de <i>Spodoptera frugiperda</i>	49
3.1.1 Frequência das raças ‘Milho’ e ‘Arroz’ nas populações	49
3.1.2 Caracterização haplotípica e análises da variabilidade genética.....	52
3.2 Análises em cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia (CG/EAG)....	59
3.3 Confirmação dos compostos sintéticos e abundância relativa dos compostos...	67

3.4 Túnel de Vento	70
4 CONCLUSÕES	75

RESUMO

Variabilidade do feromônio sexual de diferentes populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

S. frugiperda é uma praga chave no cultivo de milho. A espécie é polífaga e apresenta variações intraespecíficas, sendo caracterizada em dois grupos em função do seu hospedeiro – raça ‘Milho’ e raça ‘Arroz’ – onde indivíduos morfológicamente idênticos apresentam cargas genéticas distintas. Essas variações podem ser observadas na formação de subgrupos, os quais podem ser compostos por indivíduos geograficamente distintos ou pela forma como se distribuem dentro das populações refletindo diretamente nos padrões de acasalamento da espécie. Em razão disso, este trabalho teve por objetivo compreender a variabilidade genética de populações brasileiras de *S. frugiperda* e como ela está associada com a produção de diferentes compostos feromônais ou à variação na taxa desses compostos. Para tal, foram coletadas lagartas de *S. frugiperda* em 6 localidades brasileiras (Santo Augusto-RS, São Raimundo das Mangabeiras-MA, Dourados-MS, Sinop-MT, Assis-SP, e Santa Helena de Goiás-GO). As populações foram avaliadas quanto a sua diversidade genética, perfil cromatográfico das repostas em eletroantenografia (CG-EAG), produção do feromônio e respostas comportamentais em túnel de vento. Os resultados demonstraram uma frequência variável entre as raças de ‘Milho’ e ‘Arroz’ nas populações brasileiras de *S. frugiperda* de acordo com o local e época de amostragem. Foram constatados um elevado número de haplótipos nas populações brasileiras, e aparentemente, isto foi resultado da presença de uma alta diversidade haplotípica e das pressões do ambiente. Os machos de *S. frugiperda* responderam para até 4 compostos químicos presentes nas amostras de feromônio sexual e houve uma diferença na abundância do composto majoritário, o acetato de (Z)-9 Tetradecenila, entre as populações das diferentes localidades avaliadas. Em túnel de vento, os machos apresentaram diferentes níveis de atração para as fêmeas de *S. frugiperda* tanto para uma mesma localidade quanto para localidades distintas.

Palavras-chave: Feromônio; Variabilidade genética; Lagarta-do-cartucho; Populações; Semioquímicos

ABSTRACT

Variability of sex pheromone of different Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

S. frugiperda is a key pest in corn cultivation. This species is polyphagous and has intraspecific variation, which can be distinguished into two groups according to their host - races 'Corn' and 'Rice'. Individuals of both races are morphologically identical, but have distinct genetic loads. These variations can be observed in subgroups formation, which may consist of geographically distinct individuals or by the way they are distributed within populations reflecting directly on mating patterns of the species. For this reason, this work aims at understanding the genetic variability of Brazilian populations of *S. frugiperda* and how it is associated with the production of different pheromonal compounds or the variation in the rate of these compounds. For this, fall armyworms were collected at 6 locations in Brazil (Santo Augusto-RS, São Raimundo das Mangabeiras-MA, Dourados-MS, Sinop-MT, Assis-SP, and Santa Helena de Goiás-GO). The populations were evaluated for genetic diversity, chromatographic profile of the responses in electroantennography (GC-EAD), pheromone production and behavioral responses in a wind tunnel. Results showed a variable frequency between races 'Corn' and 'Rice' in Brazilian populations of *S. frugiperda* according to the locality and period of sampling. A large number of haplotypes in Brazilian populations were identified, and apparently, this is caused by the presence of a haplotype diversity and environmental selection pressure. Males of *S. frugiperda* responded to up to 4 chemical compounds from samples of sex pheromone and there was a difference in the abundance of the major compound, the acetate (*Z*)-9 Tetradecenila between populations of different localities evaluated. In the wind tunnel, males showed different levels of attraction to females of *S. frugiperda* to both the same site and for different site.

Keywords: Pheromone; Genetic variability; Fall armyworm; Populations; Semiochemicals

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Locais de coleta das populações de *Spodoptera frugiperda*.....32
- Figura 2 - Conjuntos utilizados para a coleta de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em campo. (A) e (B) Acomodação do material; (C) caixa térmica com os recipientes plásticos 100 mL contendo dieta artificial; e (D) material pronto antes da vedação das caixas para envio.....34
- Figura 3 - Etapas da criação de *Spodoptera frugiperda* (A) Gaiolas; (B) posturas; (C) neonatas; (D) material para multiplicação; (E) material para individualização das lagartas (100 mL); (F) individualização das lagartas (50 mL); (G) pupas; e (H) adultos.....35
- Figura 4 - Preparo das amostras de *Spodoptera frugiperda* para extração do DNA genômico: (A) visão geral dos casais já mortos e em álcool 100%; (B) detalhe do casal; (C) momento da remoção das pernas; e (D) tecido pronto para o início da extração do gDNA.....37
- Figura 5 - Obtenção do feromônio de *Spodoptera frugiperda*: (A) Fêmea no momento do chamamento (exposição da glândula produtora de feromônio); (B) detalhe da glândula de feromônio; e (C) excisão dos últimos segmentos do abdome.....40
- Figura 6 - Ensaios em cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia (CG/EAG): (A) CG/EAG; (B) macho de *Spodoptera frugiperda* antes da remoção das antenas; (C) detalhe da antena do macho em eletrodo de platina; e (D) eletrodo acoplado no eletroantenógrafo.....41
- Figura 7 - Túnel de vento utilizado para os bioensaios com *Spodoptera frugiperda*: (A) Túnel de vento; (B) gaiola em PVC para a manutenção dos insetos; (C) gaiola de liberação dos machos (seta vermelha); e (D) gaiola das fêmeas (fonte de odor – seta vermelha).....45
- Figura 8 - Esquema dos testes empregados em túnel de vento para *Spodoptera frugiperda*: Fêmeas (rosa); machos (azul); trajetória de voo (linha cheia preta); classes dos comportamentos avaliados (linha tracejada em vermelho): (0) Ausência de resposta; (I) resposta inicial; (II) atinge 50% do túnel; (III) aproxima-se da fonte; (IV) tentativa de cópula (*vide descrição das classes no texto para maiores detalhes*)46

- Figura 9 - Padrões obtidos em reação de digestão do fragmento de DNA de diferentes populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda* pela enzima EcoRV, Marcador 100pb (esq), padrão raça 'Arroz'(*) e padrão raça 'Milho'(#) 49
- Figura 10 - Percentual de indivíduos de *Spodoptera frugiperda* das raças 'Milho' e 'Arroz' (machos + fêmeas) coletados nas populações do Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Maranhão, São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul. 50
- Figura 11 - Frequência de indivíduos das raças 'Milho' e 'Arroz' em machos e fêmeas de *Spodoptera frugiperda* coletados nas populações do Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Maranhão, São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul. 51
- Figura 12 - Percentual de indivíduos coletados das raças 'Milho' e 'Arroz' em machos e fêmeas de *Spodoptera frugiperda* na cidade de Dourados – Mato Grosso do Sul, em diferentes épocas: Coleta I (abril/2011); Coleta II (abril/2012); e Coleta III (maio/2012)..... 52
- Figura 13 - Rede de haplótipos de *Spodoptera frugiperda* amostrados em seis estados brasileiros, gerada no programa TCS a partir de sequências parciais de citocromo oxidase I (953 bases). Círculos de coloração cinza representam haplótipos únicos 55
- Figura 14 - Distribuição das frequências observadas (linha vermelha) e simuladas (linha azul) do número de sequências pareadas (“*mismatch distribution*”) entre as populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda*. (A) Referente ao grupo único; e (B) Referente as raças (B' = raça 'Milho'; B'' = raça 'Arroz')..... 59
- Figura 15 – Perfil da resposta eletroantenográfica dos machos aos extratos de fêmeas de *Spodoptera frugiperda* em CG/EAG. Os números 1, 2, 3, e 4 indicam uma correspondência entre a resposta da antena (EAG) e do composto químico presente na amostra(FID). Os asteriscos (*) denotam ácidos graxos provenientes dos processo de extração, portanto compostos sem interesse na análise. Obs. *Perfil obtido pela linhagem MS306*..... 60
- Figura 16 - Cromatogramas da co-injeção dos extratos de *Spodoptera frugiperda* e dos padrões sintéticos: linha preta extrato natural de fêmeas+ acetato de

- (Z)-9-tetradecenila (seta) e na linha rosa: extrato natural de fêmeas (MS306).....67
- Figura 17 - Cromatogramas da co-injeção dos extratos de *Spodoptera frugiperda* e dos padrões sintéticos: linha preta extrato natural de fêmeas+ acetato de (Z)-11-hexadecenila (seta) e na linha rosa extrato natural de fêmeas (MS306). (*)Composto sem interesse para a análise.68
- Figura 18 - Concentrações do composto majoritário, acetato de (Z)-9-tetradecenila, presente no feromônio sexual de *Spodoptera frugiperda*. Comparações entre localidades: SP163; MT45; MS306; RS12; e GO120; Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P<0,05$).69
- Figura 19 - Concentrações do composto majoritário (acetato de (Z)-9-tetradecenila) presente no feromônio sexual de *Spodoptera frugiperda*. (A) Comparações entre as raças 'Arroz' (GO130) e 'Milho' (GO120); (B) Comparações entre os haplótipos H57:GO119; H7:MS301; H1:GO120; e H79:GO13070
- Figura 20 - Machos de *Spodoptera frugiperda* durante os bioensaios em túnel de vento. (A) Macho em voo próximo à fonte de odor (fêmeas); (B) macho pousando sobre a gaiola das fêmeas; e (C) macho durante o comportamento de corte expondo o tufo de pelos (seta).....71
- Figura 21 - Percentual de atração dos machos (comportamento sequencial) às fêmeas de *Spodoptera frugiperda* em túnel de vento. Em cada classe de comportamento está representada a localidade representada por indivíduos machos e fêmeas dos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul e São Paulo. Sequência dos comportamentos (Classe I: Resposta inicial do macho; Classe II: O inseto atinge 50% da extensão do túnel; Classe III: O macho aproxima-se da fonte de odor e Classe IV: tentativa de cópula). Letras iguais não diferem entre si dentro da classe de comportamento pelo teste de Tukey para comparações múltiplas de proporções ($P<0,05$)74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matriz de distâncias entre os pontos de coleta de <i>Spodoptera frugiperda</i> no Brasil.....	32
Tabela 2 - Dados de coleta das populações de <i>Spodoptera frugiperda</i>	33
Tabela 3 - Denominação e frequência dos haplótipos encontrados nas diferentes populações de <i>Spodoptera frugiperda</i> no Brasil. Haplótipos que abrigam indivíduos da raça 'Arroz' estão apresentados em negrito e os demais pertencem a raça 'Milho'.....	54
Tabela 4- Diagonal superior: número de migrantes por geração entre localidades. Diagonal inferior F_{ST} pareado de Slatkin para cada localidade de coleta de <i>Spodoptera frugiperda</i>	57
Tabela 5 - Resumo das análises de diversidade genética de <i>Spodoptera frugiperda</i> , e como grupo único e com os grupos definidos por raça a partir do programa Arlequin (DP= Desvio Padrão)	58
Tabela 6 - Respostas eletroantenográficas (picos) observadas nos perfis cromatográficos para os extratos naturais do feromônio sexual de <i>Spodoptera frugiperda</i> para as antenas dos machos de mesma linhagem	61
Tabela 7 - Respostas eletroantenográficas (picos) observadas nos perfis cromatográficos do extrato natural do feromônio sexual da linhagem MS306 de <i>Spodoptera frugiperda</i> para as antenas dos machos de outras diferentes linhagens.....	62
Tabela 8 - Respostas eletroantenográficas (picos) observadas nos perfis cromatográficos dos extratos de <i>Spodoptera frugiperda</i> para as antenas dos machos entre raças e localidades.....	63
Tabela 9 - Respostas eletroantenográficas (picos) observadas nos perfis cromatográficos dos extratos de <i>Spodoptera frugiperda</i> para as antenas dos machos entre haplótipos.....	65

1 INTRODUÇÃO

A intensificação da agricultura no Brasil para a produção de alimentos acarreta em sobreposição de culturas agrícolas, com implicações biológicas sobre as populações de insetos. A farta disponibilidade de alimento e as condições climáticas favoráveis ao longo do ano, permitem o desenvolvimento de várias gerações desses insetos num mesmo local. Um exemplo disso é o que ocorre com *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), que pode atingir até oito gerações por ano (FITT et al., 2006).

S. frugiperda é uma espécie polífaga, que apresenta variação intraespecífica, sendo caracterizada em dois grupos em função do seu hospedeiro – raças ‘Milho’ e ‘Arroz’ – onde indivíduos morfologicamente idênticos apresentam cargas genéticas distintas (PASHLEY, 1986). Além disso, essas raças possuem divergências quanto a fisiologia, comportamento reprodutivo e horário de liberação do feromônio sexual (NAGOSHI; MEAGHER, 2003; TUMLINSON et al., 1986).

Essas variações podem ser observadas na formação de subgrupos, os quais podem ser compostos por indivíduos geograficamente distintos ou pela forma como se distribuem dentro das populações (haplótipos) o que reflete diretamente nos padrões de acasalamento da espécie (NAGOSHI; MEAGHER, 2008; SALINAS-HERNANDEZ; SALDAMANO-BEJUMEA, 2011; SCHÖFL et al., 2011). Ademais, a probabilidade de existir um processo de isolamento reprodutivo da espécie (VELÁSQUEZ-VELEZ; SALDAMANO-BENJUMEA, 2011) parece trazer ainda mais complexidade para o sistema, tendo em vista a assimetria reprodutiva entre as raças (SCHÖFL; HECKEL; GROOT, 2009), a influência da movimentação dos indivíduos (NAGOSHI et al., 2012) e o desconhecimento sobre a existência de canais de comunicação ou barreiras pré-copulatórias que estariam interferindo sobre o encontro de machos e fêmeas no ambiente (LIMA; MCNEIL, 2009; PASHLEY; MARTINS, 1987).

Em razão disso, este trabalho visa compreender a variabilidade genética de populações brasileiras de *S. frugiperda* e como ela está associada com a produção de diferentes compostos feromonais ou à variação na taxa desses compostos.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 Aspectos bioecológicos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga migratória e endêmica no Hemisfério Ocidental. A elevada capacidade de dispersão dos adultos dessa praga permite que este inseto se dissemine rapidamente ao longo da faixa de distribuição de suas plantas hospedeiras (SPARKS, 1979). Em grande parte do continente americano, este inseto é um grave problema fitossanitário e tem provocado prejuízos a uma série de culturas de importância econômica (YU; NGUYEN; ABO-ELGHAR, 2003).

S. frugiperda é um inseto polífago, sendo conhecidas mais de 60 espécies de plantas hospedeiras (LUGINBILL, 1928). Preferencialmente alimenta-se de milho, porém existem relatos em arroz, sorgo, trigo, feijão e pastagens (CRUZ, 1995), além de desenvolver ciclo completo sobre plantas daninhas como o capim-arroz (BOTTON et al., 1998).

Em cultivos de milho no Brasil, *S. frugiperda* ataca as plantas desde a emergência, podendo aumentar muito a sua população, destruindo folhas jovens inclusive o cartucho do milho, e inviabilizando a produção de espigas (FERNANDES et al., 2003; CRUZ; VIANA; WAQUIL, 2008). Estima-se que este inseto seja responsável por mais de 25% dos prejuízos causados pelas pragas ao milho no Brasil, e por boa parte dos custos com pulverizações (WAQUIL; VILELA, 2003).

S. frugiperda possui de 4 a 7 ínstaros variando conforme alimentação, temperatura e características genéticas, além de alta capacidade reprodutiva, podendo produzir até 1000 ovos por fêmea (VALICENTE; COSTA (1991); PITRE; HOGG, 1983). O ciclo total (ovo-adulto) de *S. frugiperda* é de em média 30 dias e varia conforme a temperatura e disponibilidade de alimento. Durante os meses do verão, com temperaturas variando de moderadas a quentes (25°C – 28°C) o ciclo dura cerca de 30 dias, alongando-se proporcionalmente conforme a temperatura vai

caindo como nas em temperaturas de inverno (0°C a -12°C) podendo chegar aos 50 dias (LUNGIBILL, 1928).

Os fatores nutricionais oferecidos pelo hospedeiro também influenciam o desenvolvimento da praga como é o caso dos hospedeiros milho e arroz que ocasionaram redução no peso de pupas quando comparados entre si (GIOLO et al., 2002). Ainda, diferentes linhagens de milho alteram os principais parâmetros biológicos de *S. frugiperda* como o peso de machos e fêmeas, a longevidade, o número de fêmeas por geração (R_o) e ainda algumas linhagens denotaram um aumento no percentual de deformações observadas nos insetos (ROSA et al., 2012).

A espécie apresenta duas raças, 'Milho' e 'Arroz', as quais morfologicamente idênticas porem geneticamente distintas e apresentam diferenças em sua fisiologia de uma forma geral, destacando-se os aspectos reprodutivos, como o encontro entre os casais para cópula, compatibilidade reprodutiva e fecundidade (PASHLEY et al., 1987; NAGOSHI; MEAGHER, 2003; TUMLINSON et al., 1986; BUSATO et al., 2008).

Apesar de todas as estratégias já desenvolvidas para o controle de *S. frugiperda* (CRUZ, 1993; CRUZ; VIANA; WAQUIL, 2008), a lagarta do cartucho do milho como é popularmente conhecida, continua causando perdas expressivas devido a sua ampla distribuição, a sua constante ocorrência, a severidade de seus danos e as dificuldades no seu controle.

2.1.2 Feromônios sexuais de lepidópteros

Nos lepidópteros, para a maioria das espécies, o encontro entre parceiros para o acasalamento é mediado por estímulos químicos. Nestes grupos, os feromônios sexuais liberados pelas fêmeas promovem a atração de machos induzindo-os a um comportamento de pré-cópula (BARTH, 1958; CARDÉ; BAKER, 1984; CARDÉ; HAYNES, 2004).

As pesquisas mundiais desenvolvidas com feromônios, em sua grande maioria contemplam espécies de lepidópteros, principalmente aqueles que possuem importância econômica (ZARBIN; RODRIGUES; LIMA, 2009). Os feromônios identificados para os integrantes desse grupo, em sua maioria, são o resultado de uma mistura de compostos ativos em diferentes proporções (JACOBSON et al.,

1970; MITCHELL; TUMLINSON; MCNEIL, 1985; TUMLINSON et al., 1986; DESCOINS et al., 1988; CARDÉ; HAYNES, 2004; LEY; VICKERS, 2008).

Mariposas pertencentes a diversas famílias já tem seu feromônio descrito, e disponíveis em um banco de dados internacional chamado Pherobase, incluindo espécies da família Noctuidae, ao qual pertence *S. frugiperda*.

As espécies de lepidópteros tendem a dividir os mesmos compostos feromonais, e ter padrões biossintéticos semelhantes, em função de seu histórico evolucionário comum. Por exemplo, o acetato de (Z)-11-hexadecenal é um componente do feromônio sexual comum a seis famílias de lepidópteros, estando presente em nove espécies de pirálídeos e em 19 espécies de noctuídeos (CARDÉ; HAYNES, 2004).

Há relatos na literatura de que existe uma variação na composição e resposta de feromônios sexuais entre populações de lepidópteros de uma mesma espécie com distribuição geográfica distinta (CAMPION et al., 1980; TUMLINSON et al., 1986; CARDÉ, 1984; DESCOINS et al., 1988; PIRES et al., 1992; TÒTH et al., 1992; LÖFSTEDT, 1993; BELL; KIPP; COLLINS, 1994; SVENSSON; BENGTSSON; LÖFQVIST, 1997; GEMENO; LUFTALLAH; HAYNES, 2000; CARDÉ; HAYNES, 2004).

Ao avaliar a composição do feromônio sexual de fêmeas de *Agrotis segetum* (Denis e Schiffermuller) (Lepidoptera: Noctuidae) Tòth et al. (1992) esclareceram que a atratividade destes compostos se mostrava diferente para os machos de 11 locais na Europa, Ásia e África, e verificaram também alta atração para as populações da Eurásia e Norte da África com a mistura terciária de acetato de (Z)-5-decenila, acetato de (Z)-7-dodecenila, e acetato de (Z)-9-tetradecenila, enquanto que, para as populações do Sul do Sahara, apenas o acetato de (Z)-5-decenila foi atrativo.

Löfstedt (1993) também verificou esta variação na produção de feromônio em fêmeas de *A. segetum* de diferentes locais da Europa, em função da variação geográfica de suas populações. Os machos desta espécie apresentaram uma variação na proporção de receptores específicos para cada componente da mistura na antena, em função da variação geográfica.

Essa variação na composição dos feromônios sexuais em função da distribuição geográfica também foi relatada para outras espécies de lepidópteros. Quatro populações de *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae), originárias

dos EUA (Kentucky e Kansas), Egito e França apresentaram três compostos idênticos, mas em diferentes quantidades na mistura. No entanto, em laboratório, os autores, verificaram que houve atração cruzada entre indivíduos de algumas destas populações, apesar das diferentes proporções dos compostos na mistura (GEMENO; LUFTALLAH; HAYNES, 2000).

2.1.3 Estudos com feromônio de *Spodoptera frugiperda*

O monitoramento de adultos de *S. frugiperda* com feromônio sexual já é realizado em outros países há mais de 30 anos (MEAGHER; MITCHELL, 2001). No Brasil, já está registrado no MAPA o feromônio comercial BioSpodoptera® (acetato de (Z)-11-hexadecenila + acetato de (Z)-7-dodecenila + acetato de (Z)-9-tetradecenila), usado para o monitoramento desta espécie nas culturas do algodão, cana-de-açúcar, amendoim, arroz, batata, milho, pastagens, soja, sorgo, tomate e trigo (BRASIL, 2009).

Nos EUA, o primeiro trabalho que documentou a presença de uma substância liberada por fêmeas de *S. frugiperda*, capaz de atrair e estimular o comportamento copulatório em machos desta espécie foi desenvolvido por Sekul e Cox (1965). Posteriormente, Sekul e Sparks (1967) identificaram e sintetizaram o composto acetato de (Z)-9-tetradecenila, como sendo o feromônio sexual de *S. frugiperda* de populações oriundas da Geórgia, no entanto, para populações da Flórida, este composto não foi atrativo em campo quando puro (MITCHELL; DOOLITTLE, 1976).

Na Flórida, Tumlinson et al. (1986) analisaram os compostos produzidos pela glândula de feromônio de *S. frugiperda*, e verificaram a presença dos acetatos de dodecenila, 11- dodecenila, (Z)-7-dodecenila, (Z)-9-tetradecenila e (Z)-11-hexadecenila, e dos aldeídos, (Z)-9-tetradecenal e (Z)-11-hexadecenal nos voláteis emitidos pelas fêmeas (TUMLINSON et al., 1986). Mitchell; Tumlinson e McNeil (1985) verificaram que a mistura comercial de apenas quatro destes acetatos (acetatos de (Z)-7-dodecenila a 0,45%, de (Z)-9-dodecenila a 0,25%, de (Z)-9-tetradecenila a 81,61% e de (Z)-11-hexadecenila a 17,69%) foi altamente atrativa a machos de *S. frugiperda* na Flórida e na Guiana Francesa.

Posteriormente, cinco compostos minoritários foram detectados no feromônio de *S. frugiperda* (acetatos de (Z)-9-dodecenila, dodecenila, tetradecenila,

hexadecenila, (*Z*)-11-tetradecenila) os quais desempenharam um importante papel na atratividade de machos (DESCOINS et al., 1988).

As taxas de captura podem mostrar-se irregulares em diferentes localidades. Segundo Andrade; Rodriguez e Oehlschlagel (2000) alguns atrativos empregados para *S. frugiperda* na América do Norte e Inglaterra apresentaram diferenças nas taxas de captura quando aplicados na Costa Rica. Novos estudos com a reinvestigação de quatro acetatos encontrados no feromônio sexual de *S. frugiperda* na Costa Rica revelaram que a combinação binária dos acetatos de (*Z*)-7-dodecenila e de (*Z*)-9-tetradecenila aumentou consideravelmente a atração de machos de *S. frugiperda* desta região quando comparado com os atrativos provenientes de outros locais.

No Brasil, MELO (2005) testou o feromônio BioSpodoptera[®] em cultivo do milho em Dourados-MS e verificou diferenças entre a população de adultos amostrados nas armadilhas iscadas e na população de lagartas amostradas. BATISTA-PEREIRA et al. (2006) identificaram e sintetizaram o feromônio sexual de *S. frugiperda* de população brasileira oriunda de cultivo de milho em Piracicaba - SP. Estes autores encontraram os acetatos de (*Z*)-7-dodecenila, de (*E*)-7-dodecenila, de (*Z*)-9-dodecenila, de (*Z*)-9-tetradecenila, de (*Z*)-10-tetradecenila, de tetradecenila, de (*Z*)-11-tetradecenila e de (*Z*)-11-hexadecenila no extrato de glândula das fêmeas. Entretanto, apenas os acetatos de (*Z*)-7-dodecenila, de (*Z*)-9-tetradecenila e de (*E*)-7-dodecenila promoveram resposta nas antenas dos machos. Da mesma forma, este três compostos em mistura, quando testados em campo em Sete Lagoas-MG foram mais atrativos que misturas binárias.

O uso de feromônio sexual para o monitoramento ou controle é uma das técnicas mais adequadas para o manejo de *S. frugiperda*, não só na cultura do milho, mas em muitos de seus hospedeiros por ser uma tecnologia que poderia melhorar a eficiência de outros métodos de controle.

2.1.4 Variação na composição feromonal de *Spodoptera frugiperda*

As fontes de variabilidade genética nas populações são decorrentes da ocorrência de mutação e adaptação às pressões de seleção do meio, o que reflete no processo de evolução das espécies. Ainda a migração de uma espécie, pode trazer novas combinações de genes ampliando essa variabilidade (BUSATO et al.,

2004), como é o caso de *S. frugiperda*, onde a ampliação da variabilidade genética das populações em função das migrações é bastante provável, visto que esta espécie pode movimentar-se a longas distâncias (JOHNSON, 1987).

Nagoshi e Meagher (2008) relataram *S. frugiperda* infestando a parte Central e Oriental dos EUA e o Canadá, em função da migração do Texas e Flórida, durante a entressafra. Estes mesmos autores discutiram ainda, a possibilidade de uma heterogeneidade genética de populações de *S. frugiperda*, o que poderia aumentar a variabilidade fenotípica dos biótipos relacionados a planta hospedeira levantando a possibilidade de existirem subgrupos (diferentes haplótipos) dentro do mesmo biótipo.

Lima e McNeil (2009) relataram que as variações na produção e liberação de feromônios em populações de *S. frugiperda* são consequência da variabilidade genética nos biótipos milho e arroz, mas que também, é possível que essa variação ocorra em populações geograficamente distantes, e que o estudo destas diferenças pode facilitar o entendimento das migrações das raças 'Milho' e 'Arroz'.

No entanto, para *S. frugiperda* a seleção natural a partir da planta hospedeira, parece ter orientado as populações a uma maior adaptação ao milho ou arroz (PASHLEY, 1986; PASHLEY; MARTINS, 1987; PASHLEY; HAMMOND; HARDY, 1992; DRÈS; MALLET, 2002; MARTINELLI et al., 2006; BUSATO et al., 2008; GROOT et al., 2008; LIMA; MCNEIL, 2009; SCHÖFL; HEICKEL; GROOT, 2009). O arroz, por exemplo, é um hospedeiro que apresenta maior teor de sílica, o que ocasiona um desgaste às mandíbulas das lagartas (BUSATO et al., 2002). Tendo em vista estes fatores, acredita-se também, que outros fatores ambientais que não só o alimento possam estar interferindo na adaptação de biótipos em locais específicos. Um exemplo disso é a variação na produção de feromônios em *S. frugiperda* nas raças 'Milho' e 'Arroz' da Flórida, e também no seu tempo de atividade sexual durante a noite, que pode ser explicada em parte, pela ocorrência das diferentes raças nas diferentes regiões (GROOT et al., 2008).

No Brasil, Busato et al. (2004) verificaram uma diversidade genética de 12% entre populações de *S. frugiperda* de Santa Rosa e Uruguaiana no RS (distantes 300 km), enquanto a diversidade genética entre os biótipos 'Milho' e 'Arroz' foi de 88%. Resultados semelhantes foram encontrados por Martinelli et al. (2006), que detectaram uma diversidade genética de 18% entre populações de *S. frugiperda* de

algumas regiões do Brasil dentro do mesmo biótipo, e para os biótipos milho e arroz a variabilidade genética foi de 82%.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Insetos

Diferentes populações de *S. frugiperda* foram estabelecidas em laboratório partir da obtenção de lagartas em seis localidades brasileiras no período de março a maio de 2011, sendo: (i) Santo Augusto-RS: 430 lagartas; (ii) São Raimundo das Mangabeiras – MA: 158; (iii) Dourados-MS: 250; (iv) Sinop-MT: 253; (v) Assis-SP: 244; e (v) Santa Helena de Goiás-GO: 170 (Figura 1).

A escolha dos locais levou em consideração a distância geográfica entre os pontos de coleta e a complexidade do cenário agrícola, como sucessão de cultivos, clima e manejo, representando assim a realidade dos mais diversos panoramas da cultura do milho no país.

Figura 1 - Locais de coleta das populações de *Spodoptera frugiperda*

A distância em linha reta entre os pontos de coleta variou de 533 a 2.463 km e foi obtida por meio do software Google Earth® (Tabela 1).

Tabela 1 - Matriz de distâncias entre os pontos de coleta de *Spodoptera frugiperda* no Brasil

KM	GO	MA	MT	MS	RS	SP
GO	.	1.314	837	657	1.156	533
MA		.	1.226	1.951	2.463	1.808
MT			.	1.150	1771	1.307
MS				.	627	452
RS					.	670
SP						.

Fonte: Google Earth®

Durante as coletas dos insetos foram obtidas informações sobre as áreas e seu entorno como, por exemplo, o hospedeiro (cultivar e finalidade), coordenadas geográficas e os cultivos antecessores criando um banco de dados sobre a origem dos insetos (Tabela 2). Um total de 1261 lagartas distribuídas nas seis localidades foram trazidas para o laboratório, sendo que com o passar do tempo muitas destas apresentaram infecção por entomopatógenos e parasitismo.

Em cada local de coleta foram utilizadas duas caixas térmicas para o melhor armazenamento e assim proporcionar temperatura adequada para as lagartas, e recipientes plásticos com tampa (cerca de 400 potes com capacidade de 100 mL) preenchidos com dieta artificial (Figura 2). Os recipientes foram cuidadosamente acondicionados nas caixas com o auxílio de proteção para embalagens em poliestireno e enviadas ao destino de coleta. Após serem coletadas, as lagartas foram enviadas ao Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos para dar início a realização das criações de manutenção e as etapas de análise da variabilidade genética dos insetos.

Tabela 2 - Dados de coleta das populações de *Spodoptera frugiperda*

Local	Hospedeiro	Cultivo do Entorno	Cultivo Anterior	Coordenadas	
				Latitude (S)	Longitude (W)
Goiás	Milho BRS 1010	Algodão e Sorgo	Algodão	17°49'23.25"	50°35'18.23"
Maranhão	Milho (refúgio de Bt)	Milho	Soja	7°1'19.96"	45°28'54.49"
Mato Grosso	Milho AG7088 (refúgio de Bt)	Milho Bt e Algodão Safrinha	Soja	11°52'39.75"	55°29'52.34"
Mato Grosso do Sul	Milho DKB 390	Milho e <i>Brachiaria</i>	Soja	22°13'18.54"	54°48'23.09"
Rio Grande do Sul	Milho SG6418	Milho, <i>Tifton-85</i> e Aveia	Soja	27°51'2.07"	53°46'33.50"
São Paulo	Milho.	Milho e Milho Bt	Soja	22°39'38.22"	50°24'15.73"

Figura 2 - Conjuntos utilizados para a coleta de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em campo. (A) e (B) Acomodação do material; (C) caixa térmica com os recipientes plásticos 100 mL contendo dieta artificial; e (D) material pronto antes da vedação das caixas para envio

Após coletadas e devidamente transportadas, as lagartas foram conduzidas até a fase de pupa em copos plásticos com um volume de 100 mL, contendo dieta artificial. As pupas foram removidas, separadas por sexo e acondicionadas em recipientes plásticos até a emergência dos adultos. Os casais foram formados aleatoriamente ($n=50$), e transferidos para gaiolas de postura, onde permaneceram até a obtenção dos ovos para a manutenção da população. Os adultos foram alimentados com solução aquosa de mel a 10%, a qual foi substituída periodicamente. As posturas foram coletadas diariamente para a finalidade de incubação, mantendo o registro de origem de cada linhagem (Figura 3).

Após a eclosão, as neonatas devidamente identificadas por linhagem, foram transferidas para um novo recipiente com capacidade de 100 mL contendo dieta artificial (adaptada de GREENE; LEPLA; DICKERSON, 1976), onde foram mantidas até o segundo ínstar, quando então foram individualizadas em recipientes transparentes, com capacidade para 50 mL fechados por uma placa acrílica de mesmo diâmetro. Transcorridos o período larval da praga, as pupas foram

acondicionadas em recipientes plásticos (7 cm X 15 cm X 12 cm) contendo papel filtro umedecido e tampa que permitisse a aeração (Figura 3).

Figura 3 - Etapas da criação de *Spodoptera frugiperda* (A) Gaiolas; (B) posturas; (C) neonatas; (D) material para multiplicação; (E) material para individualização das lagartas (100 mL); (F) individualização das lagartas (50 mL); (G) pupas; e (H) adultos

Após a eclosão, as larvas obtidas de cada casal individualizado foram mantidas como descrito anteriormente, para o estabelecimento de isolinhagens. Os parentais de cada isolinhagem estabelecida foram preservados em etanol absoluto para sua caracterização molecular (haplótipo e raça).

No decorrer da 5ª geração dos insetos em laboratório, a contaminação de algumas linhagens por *Nosema* sp. (Microsporidia: Nosematidae) foi detectada e o agente causal confirmado pela presença de esporos no corpo dos insetos, pela equipe do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ. Esse fungo é de ocorrência natural em populações de insetos e outros organismos (VOSSBRINCK et al., 2004; ALVES, 1998; BECNEL; ANDREADIS, 1999; ALVES; PEREIRA, 1998) e entre as consequências dessa patologia estão a interferência nos parâmetros reprodutivos do insetos interferindo drasticamente na oviposição e na viabilidade dos ovos, o que acometeu gravemente a população oriunda do Maranhão culminando na extinção das linhagens já em análise de variabilidade genética e por esse motivo as análises em feromônios não contemplam dados da sexta população estudada.

2.2.2 Estudos da variabilidade genética das populações de *Spodoptera frugiperda*

Após o estabelecimento das criações em laboratório e com a geração filha de cada casal já sendo conduzidos separadamente, os parentais machos e fêmeas (mantidos em etanol absoluto) foram analisados para avaliar a frequência de raças nas populações amostradas ($n= 564$) e apenas as fêmeas para a caracterização dos haplótipos ($n=194$) e análises da variabilidade genética. Para tal procedeu-se a extração de DNA a partir de duas pernas de cada adulto, as quais após serem removidas do inseto, foram conservadas em etanol absoluto, possibilitando assim a caracterização dos pais (Figura 4).

As pernas dos insetos selecionados para a extração do DNA foram removidos do etanol absoluto e colocados em tubos de 1,5 ml até a completa evaporação do etanol a qual foi realizada no SpeedVac (Concentrator 5301- eppendorf). Após a secagem dos tecidos, foram adicionados ao tubo 400 μ L do tampão de extração TEN (10mM Tris-HCl pH 8,0; 2mM EDTA pH 8,0; 0,4M NaCl) acrescidos de 40 μ L SDS a 20%, 8 μ L de proteinase-K a 20mg/ml e 10 μ L de RNase (adaptado de SUNNUCKS; HALLES, 1996).

O material foi macerado com o auxílio de pistilo e incubado a 55°C por pelo menos 1 hora. Após este período, 300 μ L de solução aquosa saturada de cloreto de sódio (5M NaCl) foram adicionados, e logo em seguida a amostra foi vigorosamente agitada em vórtex por 30 segundos e centrifugada a 14,000g a temperatura de 25°C durante 30 minutos. O sobrenadante (600 μ L) foi transferido para um novo tubo e o volume semelhante de isopropanol gelado foi adicionado para a precipitação do DNA após incubação a - 20°C por, no mínimo, 4 horas.

Figura 4 - Preparo das amostras de *Spodoptera frugiperda* para extração do DNA genômico: (A) visão geral dos casais já mortos e em álcool 100%; (B) detalhe do casal; (C) momento da remoção das pernas; e (D) tecido pronto para o início da extração do gDNA

O material foi então centrifugado (14,000g a 4°C durante 20 min) e o pellet de DNA foi lavado em banhos sucessivos de etanol absoluto (1x) e 70% etanol (2x), e novamente centrifugado a 14,000g a 4°C por 5 min, após cada lavagem. Ao término das lavagens, a amostra foi mantida por 20 min em SpeedVac (Concentrator 5301-eppendorf) para completa evaporação do etanol. O pellet de DNA obtido foi ressuspensão em 20 µL de água Milli-Q autoclavada, e armazenado a -20°C até sua utilização (SUNNUCKS; HALES, 1996). A integridade do DNA obtido foi avaliada via eletroforese em gel de agarose a 0,8%, contendo 0,5 µg.mL⁻¹ de brometo de etídio, em tampão tris-acetato-EDTA (TAE) a 5 V.cm⁻¹, e visualizada em transluminador.

2.2.2.1 Estudo da frequência das raças de *Spodoptera frugiperda*

A caracterização de indivíduos como pertencentes as raças 'Milho' e 'Arroz' foi realizada segundo Nagoshi; Silvie; Meagher (2007a). Nessa etapa, foi necessário amplificar o fragmento de interesse e submeter o produto desta reação a um processo de digestão enzimática a partir da qual foi possível verificar a raça de cada indivíduo analisado e determinar a frequência de ambas as raças nas populações de

S. frugiperda amostradas. Os processos envolvidos nessa etapa estão descritos detalhadamente a seguir.

O fragmento do gene mitocondrial da Citocromo oxidase I (COI) de interesse, foi amplificado em reação de PCR em volume total de 25 μL , contendo 1 μL de DNA genômico (aproximadamente 20 ng de gDNA), ColorfullTaq Buffer (1x), 1,5 mM MgCl_2 , 10 mM de dNTP, 0,32 mM de cada um dos iniciadores COI - 893F (5' – CACGAGCATATTTTACATCWGCA - 3') e COI - 1303R (5' – CAGGATAGTCAGAATATCGACG - 3') e 0,625 unidades de GoTaqPolymerase.

A amplificação foi conduzida em reação programada em termociclador a 94°C (2') para a desnaturação inicial, 35 ciclos a 92°C (45"), 50°C (45"), 72°C (1'), como extensão final a 72°C (5'). Os produtos de amplificação foram visualizados em transiluminador após resolução do produto de amplificação em gel de agarose a 1.5%, contendo 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de brometo de etídio, em tampão tris-acetato-EDTA (TAE) a 5 V.cm⁻¹.

Para as análises de restrição enzimática para a identificação das raças de *S. frugiperda*, 3 μL do produto de amplificação de cada amostra analisada foram acrescidos de 1,5 μL do tampão da enzima (10x), 0,25 μL da enzima EcoRV (10u. μL^{-1}) e 10,25 μL de água estéril, e mantidos a 37°C por no mínimo 5 horas (NAGOSHI; SILVIE; MEAGHER, 2007a). Após esse período, 7 μL do produto dessa reação foi utilizado para verificar o padrão de digestão obtido o qual foi visualizado em transiluminador após resolução do produto de digestão em gel de agarose a 1,8%, contendo 0,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de brometo de etídio, em tampão TAE a 5 V.cm⁻¹.

2.2.2.2 Caracterização haplotípica das diferentes populações de *Spodoptera frugiperda*

A partir das amostras de DNA uma nova reação de amplificação (PCR) do fragmento de interesse foi realizada com outro par de iniciadores (1490F e 2198R). O produto dessa amplificação foi purificado e enviado para sequenciamento bidirecional e assim por meio do resultado do sequenciamento, foram analisados e caracterizados os haplótipos encontrados. Os processos para esta etapa foram determinados por Nagoshi; Silvie; Meagher (2007a) e estão descritos a seguir:

Os fragmentos em estudo foram reproduzidos em reação de amplificação contendo 1 µL de gDNA (aproximadamente 20 ng), ColorfullTaq Buffer (1x), 2,0mM MgCl₂, 10mM de dNTP, 0,32 mM de cada um dos iniciadores para a região da citocromo oxidase I: LCO - 1490 (5' - GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG - 3') e HCO - 2198 (5' - TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA - 3'), descritos em Simmon et al. (1994), e 0,625 unidades de GoTaqPolymerase.

A amplificação foi conduzida em reação programada em termociclador a 94°C (2') para a desnaturação inicial, 35 ciclos a 92°C (45"), 50°C (45"), 72°C (1'), como extensão final a 72°C (5'). Os produtos de amplificação foram visualizados em transiluminador após resolução do produto de amplificação em gel de agarose a 1,5%, contendo 0,5 µg.mL⁻¹ de brometo de etídio, em tampão TAE. Fragmentos com o tamanho esperado (953 pb) foram posteriormente purificados e enviados para sequenciamento bidirecional pelo Centro de Biotecnologia Agrícola (CEBTEC)/ESALQ/USP.

2.2.2.3 Análises da variabilidade genética

A partir do sequenciamento bidirecional, para estudar a variabilidade genética intra e inter populacional das diferentes populações de *S. frugiperda* foi realizada a edição manual das sequências por meio do programa FINCH TV 1.4.0 (GEOSPIZA RESEARCH, 2006), o seu alinhamento e a estimativa da distância genética inter e intra populacional por meio do programa MEGA 5.05 (TAMURA et al., 2011).

As inferências sobre o relacionamento entre os haplótipos foram realizadas com confiabilidade de 99% com o auxílio do programa TCS v. 1.21:2 (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000). Para verificar a diferenciação entre os grupos, foram realizados os testes de variância molecular (AMOVA), de estruturação populacional (Fst), eventos de expansão (Fu e D de Tajima) e o teste de Mantel foram obtidos com o auxílio do programa ARLEQUIM 3.5.1.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2009).

2.2.2.4 Obtenção dos extratos de feromônio de *Spodoptera frugiperda*

A obtenção dos extratos foi realizada por meio da extração direta da glândula produtora de feromônio, que se localiza no final do abdômen das fêmeas entre os

segmentos VII e IX, no período da 1^a a 3^a hora da escotofase que é o horário de maior chamamento das fêmeas de *S. frugiperda* (ZAZYCKI et al., 2011)

Um total de 100 fêmeas virgens vivas por extrato por linhagem (1equivalente.fêmea⁻¹), com idade de 48 horas foram anestesiadas com CO₂ e tiveram suas glândulas dissecadas com auxílio de bisturi cirúrgico e micropinças (Figura 5). Os três últimos segmentos do abdômen de cada fêmea, depois de dissecados, foram imersos em solvente hexano (SupraSolv - 98%, Merk) por aproximadamente 3 min.

Transcorrido esse tempo, a fração líquida do extrato foi colhida com pipeta Pasteur estéril e filtrada com lã de vidro no mesmo tipo de pipeta a fim de retirar resíduos de escamas e tecidos, e transferido para 'vials' e armazenado a -20°C.

Figura 5 - Obtenção do feromônio de *Spodoptera frugiperda*: (A) Fêmea no momento do chamamento (exposição da glândula produtora de feromônio); (B) detalhe da glândula de feromônio; e (C) excisão dos últimos segmentos do abdome

2.2.3 Cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia (CG/EAG)

As antenas dos machos de *S. frugiperda* foram extraídas cuidadosamente na sua base (BJOSTAD, 1998), e os últimos artículos da porção distal da antena foram cortados para facilitar o contato elétrico (Figura 6). As extremidades da antena foram colocadas em eletrodo de platina, conectado a um amplificador com software eletroantenográfico (EAG) (Syntech - versão 4.6, Hilversum, The Netherlands) o qual revela a resposta da antena pela medida da diferença de potencial nos eletrodos, os quais foram preenchidos com gel condutor de eletricidade (Signa gel), e tanto a extração da antena do macho, como a sua preparação foram feitas em lupa de 40x de aumento.

Após o eletrodo com a antena estar conectado ao eletroantenógrafo (Syntech), foi injetado 1 μL do extrato natural no cromatógrafo à gás Shimadzu (GC, série 2010). O cromatógrafo, com controle de pressão eletrônico, foi operado no modo “splitless” (250°C), contendo uma coluna capilar HP-5 (30m x 0,25mm D. I. x 0,25 μm de espessura do filme). A programação de temperatura foi a seguinte: temperatura inicial de 50°C/min, com aumento de 7°C/min até 250°C, a qual foi mantida por 10 minutos. A linha de transferência operou a 270°C, aproximadamente, e o Hélio foi usado como gás de arraste com fluxo de 1mL.min⁻¹.

Figura 6 - Ensaio em cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia (CG/EAG): (A) CG/EAG; (B) macho de *Spodoptera frugiperda* antes da remoção das antenas; (C) detalhe da antena do macho em eletrodo de platina; e (D) eletrodo acoplado no eletroantenógrafo

A sequência de injeções foi determinada de acordo com os resultados de variabilidade genética e dos testes preliminares com feromônios. Para esta etapa, foram consideradas quatro fases de teste utilizando um mínimo de 6 repetições do mesmo padrão de resposta da antena dos machos para cada linhagem, o que totalizou um mínimo de 140 injeções por fase. Para a primeira fase de testes a

resposta dos machos aos extratos do feromônio sexual das fêmeas da própria linhagem foi verificada. Após a análise dos cromatogramas, a linhagem que apresentasse o maior número de repostas foi utilizada para avaliar como machos de linhagens diferentes respondem ao ser expostos a um mesmo extrato de feromônio (fase dois de teste). Na terceira e quarta fase os testes foram realizados comparando as linhagens a partir da formação de grupos de interesse.

Para avaliar a resposta dos machos utilizando o grupo formado pelas 'Raças Milho e Arroz' foram testadas linhagens de mesma localidade, porém com raças distintas, para isso as linhagens MS301 e MS306 representaram a raça 'Arroz' e a raça 'Milho', respectivamente. Já nos testes com o grupo formado pelas 'Localidades' linhagens coletadas nos diferentes estados brasileiros foram confrontadas a fim de compreender como machos de locais geograficamente próximos ou muito distantes respondem aos extratos do feromônio das fêmeas. Ainda numa última etapa de comparação da resposta dos machos aos extratos das fêmeas, foram realizados confrontos intencionais entre os haplótipos comparando diferentes indivíduos dentro do haplótipo com o maior número de indivíduos (H1), além de comparar as demais possibilidades disponíveis estando mais próximos ou mais distantes dele.

Para tal foram utilizados insetos provenientes das 24 linhagens pertencentes a 5 localidades diferentes as quais foram inicialmente testadas quanto a resposta de machos pertencentes a mesma linhagem da qual foi obtido o feromônio das fêmeas. Após a obtenção dos resultados, as repostas das antenas foram cuidadosamente analisadas e comparadas entre si, a fim de obtermos os padrões das linhagens e as relações entre elas.

2.2.4 Abundância relativa dos compostos e confirmação dos compostos por injeção do padrão sintético do feromônio

Para ter uma confirmação do composto majoritário da mistura foi calculado o índice de Kovats (KOVATS, 1958), o qual foi obtido a partir da utilização do tempo de retenção do composto de interesse e a sua relação com o tempo de retenção dos hidrocarbonetos de referência quando submetidos as mesmas condições de análise.

Os hidrocarbonetos de referência utilizados foram os que compreendem os carbonos C7 até o C28 e o índice foi calculado a partir da fórmula citada por Marques; McElfresh; Millar (2000) e comparada aos resultados demonstrados para os compostos do feromônio de diversos lepidópteros.

$$IK = 100 \times \left[n + (N - n) \frac{(\log (Tr_{desc.}) - (\log (Tr_n) / (\log (Tr_N) - \log (Tr_n))) \right]$$

Onde:

IK = índice de Kovats;

n= número do carbono menor;

N= número do carbono maior;

Tr_{desc.} = Tempo de retenção do composto que se quer descobrir;

Tr_n = Tempo de retenção do “Carbono menor”;

Tr_N = Tempo de retenção do “Carbono maior”.

Para confirmar os demais compostos presentes em menor quantidade na mistura e a resposta obtida nas antenas de machos de *S. frugiperda* aos padrões sintéticos das substâncias que integram a mistura feromonal da praga, foram utilizados os padrões produzidos pela equipe do Laboratório de Semioquímicos da Universidade Federal do Paraná.

Os padrões testados foram escolhidos com base na literatura pré-existente listadas na Pherobase (EL-SAYED, 2012). Os compostos testados foram os acetatos (Z)-9-tetradecenila, (Z)-7-dodecenila, (Z)-11-hexadecenila, (Z,E)-9,12-tetradecenila e ao (Z)-11-hexadecenal, os quais foram injetados na concentração de 10 ppm em cromatógrafo gasoso com detecção por ionização de chamas (GC/FID) utilizando o mesmo programa de temperatura e as condições das demais análises já descritas.

A diferença de concentração da mistura feromonal entre as fêmeas dos diferentes locais do país foi calculada para o composto majoritário acetato de (Z)-9-tetradecenila a partir da área dos picos fornecida automaticamente pelo software GC-Solution (Shimadzu) e comparado ao octadecano (Sigma Aldrich), utilizado como padrão externo de referência com concentração de 40 ng.µL⁻¹. Para isso os mesmos extratos e o padrão de referência foram injetados (1 µL) em cromatógrafo gasoso com detecção por ionização em chama (GC/FID) utilizando a mesma

programação de temperaturas descrita anteriormente e teve seus cromatogramas cuidadosamente analisados.

Para esta etapa foram utilizadas linhagens como representantes de cada localidade (GO120; MT45; MS306; SP163; RS12) sendo que todas as linhagens pertencem a raça 'Milho' e ao haplótipo dominante H1 com exceção da linhagem RS12 que pertence ao H12, o qual está diretamente ligado ao dominante o que confere a eles carga genética muito próxima. Para testar a variação entre as raças foram utilizadas raças de mesma localidade, sendo a raça 'Milho' representada pela linhagem GO120 (H1) e a raça 'Arroz' pela linhagem GO 130 (H79). A fim de inferir sobre a variação entre haplótipos uma comparação entre os haplótipos H1 (GO120), H79 (GO130), H57(GO119) e H7 (MS301) foram comparados quanto a variação na concentração do composto majoritário, acetato de (*Z*)-9-Tetradecenila, da mistura feromonal de *S. frugiperda*.

Para obter a abundância relativa dos compostos, foi calculada a área média dos picos do padrão externo (octadecano) e comparada com a área média dos picos dos diferentes extratos. Valendo-se da concentração conhecida de octadecano injetada, foi possível descobrir qual a concentração do composto estavam sendo produzidos por fêmea de cada linhagem. As concentrações obtidas nos diferentes grupos foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando-se o procedimento PROC GLM do SAS (SAS INSTITUTE, 2002).

2.2.5 Bioensaios em túnel de vento

Os bioensaios para verificar a resposta de machos ao feromônio natural das fêmeas de *S. frugiperda* foram conduzidos em túnel de vento (Figura 7A), confeccionado em acrílico (60 cm x 60 cm x 180 cm), com duas portas de acesso e operado com uma velocidade de vento constante de 0,2m/s. A sala exclusiva para os bioensaios em túnel de vento possui uma iluminação especial no comprimento de luz monocromática vermelha (~700 nm), que apresenta baixa sensibilidade pelos insetos, com $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, e umidade relativa $70 \pm 10\%$.

Os insetos foram mantidos na mesma sala durante todo o período dos experimentos (Figura 7B), e cerca de dois minutos após ligar e estabilizar o fluxo de ar no equipamento, o macho a ser testado era colocado dentro do túnel em uma

gaiola a qual permitia a passagem de ar (Figura 7C). Transcorrido outros dois minutos (aclimação), duas fêmeas da linhagem de interesse foram colocadas em uma pequena gaiola (fonte de odor), fixada nas hastes do túnel do lado oposto aos machos, permitindo a passagem de ar, mas não a saída das fêmeas (Figura 7D).

Figura 7 - Túnel de vento utilizado para os bioensaios com *Spodoptera frugiperda*: (A) Túnel de vento; (B) gaiola em PVC para a manutenção dos insetos; (C) gaiola de liberação dos machos (seta vermelha); e (D) gaiola das fêmeas (fonte de odor – seta vermelha)

As fêmeas utilizadas nos bioensaios foram selecionadas aleatoriamente durante seu 'horário de chamamento' (SCHOFL; HECKEL; GROOT, 2009), e só então os machos foram liberados e seu comportamento observado e cronometrado. Uma vez utilizado para os testes, machos e fêmeas foram descartados. Cada macho foi considerado uma repetição, e um mínimo de 8 repetições foi utilizado para cada grupo de testes (tratamentos).

Cada bioensaio teve a duração de até 10 minutos, dependendo da resposta dos machos aos tratamentos, caracterizados nas 5 classes de respostas comportamentais (Figura 8), assim descritos:

(Classe 0) Ausência de Resposta: caracterizado pela ausência de excitação ou movimentação do macho dentro da gaiola de liberação;

- (Classe I) Resposta Inicial: caracterizado pelo início da excitação e/ou movimentação do macho mesmo dentro da gaiola de liberação ou próximo a ela porém não atingindo a metade da extensão do túnel;
- (Classe II) Atinge 50% do túnel: caracterizado pela movimentação do macho desde a gaiola de liberação até atingir a metade da extensão do túnel de vento (60 cm);
- (Classe III) Aproxima-se da fonte: caracterizado pela orientação do macho na pluma e pela aproximação da fonte de odor a pelo menos 30 cm da gaiola onde estavam as fêmeas;
- (Classe IV) Tentativa de cópula: caracterizado pela aproximação dos machos da gaiola das fêmeas, pousando na plataforma ou sobre a gaiola, expondo o tufo de pelos realizando o comportamento de corte para as fêmeas caracterizando a tentativa de cópula.

Figura 8 - Esquema dos testes empregados em túnel de vento para *Spodoptera frugiperda*: Fêmeas (rosa); machos (azul); trajetória de voo (linha cheia preta); classes dos comportamentos avaliados (linha tracejada em vermelho): (0) Ausência de resposta; (I) resposta inicial; (II) atinge 50% do túnel; (III) aproxima-se da fonte; (IV) tentativa de cópula (*vide descrição das classes no texto para maiores detalhes*)

As linhagens utilizadas para os testes em túnel de vento foram escolhidas como representantes de localidade (GO120; RS61; MT45; MS305; SP163), e foram

testadas de forma aleatória no mesmo dia, buscando eliminar os efeitos da variação da pressão atmosférica. As linhagens testadas pertencem a raça 'Milho' e ao haplótipo dominante H1 com exceção da linhagem RS61 que pertence ao haplótipo 11 o qual está diretamente ligado ao H1, portanto muito próximo da carga genética do dominante.

O experimento foi conduzido num delineamento inteiramente casualizado, e os dados transformados conforme Freeman; Tukey (1950). As comparações entre as proporções de resposta dos machos dentro das classes de comportamentos por localidade foi analisada pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) para múltiplas comparações de proporções conforme descrito por Zar (1999) a partir do PROC-FREQ macro comprop (ELLIOTT; REISCH, 2006) do SAS INSTITUTE (2002).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Diversidade genética de *Spodoptera frugiperda*

3.1.1 Frequência das raças ‘Milho’ e ‘Arroz’ nas populações

Nas seis populações estudadas de *S. frugiperda* (n= 564), verificou-se a presença de indivíduos das raças ‘Milho’ e ‘Arroz’, em diferentes proporções.

O fragmento produzido pela reação de amplificação com o par de iniciadores 893F – 1303R resultou em 410 pb, sendo que após o processo de digestão com a enzima Eco RV o fragmento que permaneceu íntegro caracterizou os indivíduos da raça ‘Milho’, e o outro que dividiu-se em dois menores (289pb e 121pb) caracterizou os indivíduos pertencentes a raça ‘Arroz’ (Figura 9).

Figura 9 - Padrões obtidos em reação de digestão do fragmento de DNA de diferentes populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda* pela enzima EcoRV, Marcador 100pb (esq), padrão raça ‘Arroz’(*) e padrão raça ‘Milho’(#)

Considerando-se todas as populações amostradas, as maiorias dos insetos coletados pertenciam à raça ‘Milho’ (Figura 10). Para esta raça, as maiores frequências de indivíduos foram observadas no estado do Maranhão (97,5%; n=40), Mato Grosso (93,2%; n=74), Goiás (92,7%; n=68) e Rio Grande do Sul (90,4%; n=86), respectivamente.

Para a raça 'Arroz' a maior frequência de indivíduos foi observada no estado de Mato Grosso do Sul (25%; n=194), seguida da população de São Paulo (18%; n=102) (Figura 10).

Figura 10 - Percentual de indivíduos de *Spodoptera frugiperda* das raças 'Milho' e 'Arroz' (machos + fêmeas) coletados nas populações do Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Maranhão, São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul

A coexistência de raças distintas em um mesmo ambiente é um fenômeno comum às populações de *S. frugiperda*, já demonstrado por outros autores em diversos cultivos no mundo, com uma predominância de indivíduos da raça 'Milho', como constatado também neste trabalho (SCHÖFL; HECKEL; GROOT, 2009; MACHADO et al., 2008; NAGOSHI; MEAGHER, 2003; VELÁSQUEZ-VÉLEZ; SALDAMANO-BENJUMEA; RIOS-DÍEZ, 2011; VÉLEZ-ARANGO et al., 2008; SALINAS-HERNANDEZ; SALDAMANO-BENJUMEA, 2011; BELAY et al., 2012).

No que se refere a frequência das raças e sua distribuição entre os sexos houve uma predominância de indivíduos da raça 'Milho' tanto para machos (85,4%) quanto para fêmeas (84,5%). Levando-se em conta a frequência da raça 'Arroz' em machos e fêmeas de *S. frugiperda* analisados, com cerca de 15%, notou-se uma grande variação entre as localidades. No Maranhão, por exemplo, não foram

encontrados machos da raça 'Arroz', enquanto que no Mato Grosso do Sul a frequência foi de 23,7% (Figura 11).

Figura 11 - Frequência de indivíduos das raças 'Milho' e 'Arroz' em machos e fêmeas de *Spodoptera frugiperda* coletados nas populações do Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Maranhão, São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul.

Os resultados indicaram também que a frequência de raças observadas em *S. frugiperda* foi variável conforme a época em que foram realizadas as coletas. As coletas na localidade de Dourados no Mato Grosso do Sul, por exemplo, foram inicialmente de 58,2% de indivíduos da raça 'Milho' e 41,8% da raça 'Arroz' na coleta I (abril/2011, n=98). No ano seguinte cerca de 92% desses indivíduos foram pertencentes à raça 'Milho', para as coletas II (abril/2012, n= 56) e III (maio/2012, n= 40), respectivamente; denotando significativa redução, na frequência de indivíduos da raça 'Arroz' num período de cerca de 12 meses, correspondente à aproximadamente 11 gerações do inseto (Figura 12).

A diversidade de ocorrência de raças 'Arroz' e 'Milho' observada nas distintas épocas de coleta pode ocorrer naturalmente devido à separação temporal da reprodução entre as raças, mostrando uma variação menos pronunciada na frequência das raças em determinadas épocas do ano. Essas alterações podem estar associadas a um complexo controle genético e de alto custo adaptativo, como

por exemplo, os distintos modos de herança frente aos comportamentos envolvidos na reprodução (SCHÖFL; HECKEL; GROOT, 2009).

Figura 12 - Percentual de indivíduos coletados das raças 'Milho' e 'Arroz' em machos e fêmeas de *Spodoptera frugiperda* na cidade de Dourados – Mato Grosso do Sul, em diferentes épocas: Coleta I (abril/2011); Coleta II (abril/2012); e Coleta III (maio/2012).

A frequências diferentes das raças entre as localidades, entre os sexos e também nas épocas de amostragem observadas neste trabalho podem ser produto de uma instabilidade reprodutiva dos cruzamentos, pois não se conhece o grau em que ocorrem os encontros naturalmente e ainda existem relatos de que exista um isolamento reprodutivo entre as raças (VELÁSQUEZ-VÉLEZ; SALDAMANO-BENJUMEA; RIOS-DÍEZ, 2011; NAGOSHI; MEAGHER, 2003; JUÁREZ et al., 2012) ou ainda que essas alterações sejam o resultado de um período de especiação (VÉLEZ-ARANGO et al., 2008).

3.1.2 Caracterização haplotípica e análises da variabilidade genética

Para a caracterização da diversidade genética de *S. frugiperda*, as análises populacionais utilizaram 194 sequências referentes aos seis pontos de coleta, com a amplificação de 953 bases do gene da citocromo oxidase I, sendo encontrados 98

sítios variáveis e uma distância genética medida pelo modelo de distância p de 0,004. Deste modo definiu-se 79 haplótipos sendo 58 deles de ocorrência única.

O estado do Mato Grosso do Sul foi o que abrigou o maior número de haplótipos (32), seguido por São Paulo (24) e Goiás (19), respectivamente. Já, o menor número de haplótipos foi observado no Maranhão (11) (Tabela 3). A maior frequência de indivíduos do H1 (dominante) foi obtida nas amostras oriundas de Goiás e Mato Grosso, ambos com 12 indivíduos.

Os polimorfismos que definem os haplótipos e sua implicação na adaptação da praga e seu comportamento ainda estão pouco elucidados e as variações podem estar ligadas não somente à deriva e gargalos populacionais bem como à persistência das diferenças entre os grupos por diversos anos consecutivos (NAGOSHI et al., 2012).

Os haplótipos caracterizados formam uma rede complexa e bastante interligada na qual os haplótipos H1 e H2 apresentaram frequência alta com 48 e 13 indivíduos, respectivamente. O haplótipo H1 e os que estão ligados a ele formam uma estrela, e este está conectado por um passo mutacional ao H2 (Figura 13). Apesar do haplótipo H1 estar relacionado com muitos haplótipos únicos, este tem muitas conexões intermediárias que dão origem a outros haplótipos com múltiplas ocorrências. Os haplótipos H6 e H7 também formam uma estrela e estão interligados entre si, porém não estão ligados ao haplótipo dominante H1, bem como os haplótipos H10, H22, H23, H46 e H56 que não estão relacionados com nenhum outro haplótipo. A distribuição dos haplótipos denota uma clara formação de dois grupos, denominados raça 'Arroz' e raça 'Milho', respectivamente (Figura 13).

Tabela 3 - Denominação e frequência dos haplótipos encontrados nas diferentes populações de *Spodoptera frugiperda* no Brasil. Haplótipos que abrigam indivíduos da raça 'Arroz' estão apresentados em negrito e os demais pertencem a raça 'Milho'.

Local de Coleta	Denominação do haplótipo (número de indivíduos)
São Paulo	H1(8), H2(4), H3(1), H4(3), H5(1), H6(2), H7(3) , H8(2), H14(3), H19(2), H21(2), H25(1) , H26(1), H38(1), H41(1), H42(1), H51(1) , H52(1), H53(1), H66(1), H67(1) , H74(1), H76(1), H77(1)
Mato Grosso do Sul	H1(10), H2(2), H3(2), H5(3), H6(2), H7(2) , H8(2), H9(3), H10(1), H11(1), H12(1), H13(3), H15(1), H16(1), H17(2), H20(2), H27(1), H29(1), H30(1), H33(1), H34(1), H44(1), H49(1), H50(1), H58(1), H61(1), H63(1), H63(1), H64(1), H65(1), H68(1), H72(1)
Goiás	H1(12), H2(3), H3(2), H4(3), H5(2), H7(1), H8(1), H10(1), H15(1), H18(1), H24(1), H35(1), H43(1), H46(1), H57(1), H59(1), H75(1), H78(1), H79(1)
Rio Grande do Sul	H1(4), H2(1), H3(1), H6(2), H10(1), H11(1), H12(2), H16(1), H22(1), H23(1), H36(1), H37(1), H39(1), H40(1), H48(1), H71(1) H73(1)
Mato Grosso	H1(12), H2(3), H3(2), H4(1), H5(1), H10(1), H18(1), H28(1), H31(1), H47(1), H56(1), H69(1), H70(1)
Maranhão	H1(2), H3(1), H4(1), H9(1), H11(1), H32(1), H45(1), H54(1), H55(1), H60(1), H62(1)

O cenário complexo e de numerosos haplótipos bem como a presença de um ou mais haplótipos com maior frequência (dominante) foi observado também em indivíduos da Colômbia, onde Salinas-Hernandez; Saldamano-Benjumea (2011) obtiveram 43 haplótipos com a presença de um dominante.

Figura 13 - Rede de haplótipos de *Spodoptera frugiperda* amostrados em seis estados brasileiros, gerada no programa TCS a partir de sequências parciais de citocromo oxidase I (953 bases). Círculos de coloração cinza representam haplótipos únicos

A estrutura genética das populações de *S. frugiperda* analisadas foi estabelecida calculando-se o índice de fixação com a análise AMOVA. Houve um baixo índice de fixação ($F_{ST} = 0,011$), para os locais de coleta reunidos em um só grupo. Contudo, para análise de raças como formadores de grupos o índice de fixação ($F_{ST} = 0,71$) foi alto. Esses resultados indicam que não existe estruturação genética por localidades, e sim a estruturação genética foi dada pela raça dos insetos. Isto vai de encontro à publicações de outros grupos, os quais sugerem que a variação geográfica existente na comunicação sexual, pode ser explicada, em parte, pela ocorrência das distintas raças nas diferentes regiões (DRÈS; MALLET, 2002; BUSATO et al., 2004; 2008; LEWTER et al., 2006; MARTINELLI et al., 2006; NAGOSHI et al., 2006; 2007b; 2008; NAGOSHI; SILVIE; MEAGHER, 2007a; GROOT et al., 2008; LIMA; MCNEIL, 2009; SCHÖFL; HECKEL; GROOT, 2009).

O F_{ST} de Slatkin variou de 0 a 0,03812, sendo o maior valor encontrado para as amostras do Mato Grosso do Sul (Tabela 4). O número de migrantes estimado pela estatística F variou de 11,2 migrantes/geração até um número infinito de migrantes por geração. A maior movimentação de migrantes foi observada entre os estados do Mato Grosso, Goiás e Mato Grosso do Sul onde um alto número de migrantes foi detectado pelo software Arlequin (denotado na Tabela 4 como “inf” = infinitos migrantes). A movimentação entre indivíduos do estado do Maranhão e São Paulo mostrou-se restrita, e entre os demais locais houve uma movimentação em intensidade baixa a moderada. O teste de Mantel mostrou alta correlação ($r = 0,647$) entre distância genética linear e distância geográfica ($p = 0,003$) denotando que as diferenças encontradas neste trabalho estão fortemente influenciadas pela distância geográfica dos pontos amostrados.

Tabela 4- Diagonal superior: número de migrantes por geração entre localidades. Diagonal inferior F_{ST} pareado de Slatkin para cada localidade de coleta de *Spodoptera frugiperda*

Número de Migrantes (Nm)						
Local	GO	MA	MT	MS	RS	SP
GO		31	inf*	inf	103,15	34,2
MA	0,01610		86.8	13	11,2	5,5
MT	0	0,00576		inf	27,3	13,5
MS	0	0,03812	0		2851	42
RS	0,00485	0,04434	0,01825	0,00018		Inf
SP	0,01460	0,09005	0,03701	0,01189	0	
Matriz de Slatkin (F_{ST})						

*inf – número infinito de migrantes

GO = Goiás, MA = Maranhão, MT = Mato Grosso, MS = Mato Grosso do Sul, RS = Rio Grande do Sul, e SP = São Paulo

Por meio da matriz de migrantes obtida para as populações analisadas de *S. frugiperda* pode se verificar uma alta movimentação natural desta espécie por geração, o que pode ter ocorrido em função das variações climáticas no período estudado. Sparks et al. (1979) e Luginbill (1928), observaram durante as estações de inverno e verão que a espécie movimenta-se do sul dos Estados Unidos até o sul do Canadá quando as temperaturas e o crescimento das plantas favorecem o seu desenvolvimento, colonizando novas áreas em ondas ou surtos.

Em países com invernos severos, parece existir uma movimentação dos insetos para os locais mais quentes onde colonizarão estas áreas. Para tal, estes insetos acabam passando por um ponto comum nos caminhos dessa movimentação onde acontece uma primeira troca de material genético, e logo os grupos que ali se formaram, tornam a se separarem pela interferência de barreiras físicas ou ambientais (NAGOSHI et al., 2008; 2009; 2010; 2012).

Os índices de diversidade molecular indicaram grande variabilidade de haplótipos e baixa diversidade genotípica, ou seja, existem muitos haplótipos geneticamente próximos entre si. Outras análises indicaram teste de neutralidade com valores negativos e $\theta\pi < 0$ (Tabela 5). Todas essas características indicam um cenário de expansão populacional.

Tabela 5 - Resumo das análises de diversidade genética de *Spodoptera frugiperda*, e como grupo único e com os grupos definidos por raça a partir do programa Arlequin (DP= Desvio Padrão)

	Diversidade haplotípica ± DP	Diversidade nucleotídica ± DP	D de Tajima	F de Fu	$\Theta\pi$	θS
Grupo único	0,927±0,014	0,008±0,004	-2,03 (p=0,00)	-24,45 (p=0,00)	8,10 (DP=4,17)	16,43 (DP=3,88)
Raças						
‘Arroz’	0,889±0,054	0,006±0,003	-1,44 (p=0,05)	-2,41 (p=0,00)	6,25 (DP=3,46)	7,32 (DP=2,80)
‘Milho’	0,914±0,016	0,0057±0,003	-1,77 (p=0,19)	-25,10 (p=0,00)	5,42 (DP=2,90)	15,34 (DP=3,70)

As indicações da expansão populacional de *S. frugiperda* no Brasil foram posteriormente corroboradas pelas análises de distribuição par a par (“*mismatch distribution*”), que testam para uma expansão demográfica repentina. Essas análises resultaram em curvas multimodais para todas as amostras tratadas como um grupo único [SSD= 0,011 p (sim≥obs) = 0,45; raggedness = 0,007 p (sim≥obs) = 0,92], indicando a ocorrência de populações em expansão (Figura 14A). Para o grupo definido pelas raças as análises também resultaram em curvas multimodais para os indivíduos da raça ‘Milho’ (Figura 14B’) e ‘Arroz’ (Figura 14B’’) [SSD = 0,178 p (sim≥obs) = 0,01; raggednes = 0,02 p (sim≥obs) = 1,0 e SSD= 0,003 p (sim≥obs) = 0,47; raggednes = 0,0102 p (sim≥obs) = 0,89], o que condiz com os resultados para o grupo único.

A diversidade genética encontrada pode estar relacionada à diversos fatores. Dentre elas, as pressões de seleção provocadas pelos sistemas de cultivo e manejo de pragas (BELAY et al., 2012), tendo em vista as condições intensas de cultivo encontradas nas regiões de coleta. Ademais, a migração de insetos entre as localidades demonstrando a influência do ambiente na variação encontrada.

Figura 14 - Distribuição das frequências observadas (linha vermelha) e simuladas (linha azul) do número de sequências pareadas ("mismatch distribution") entre as populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda*. (A) Referente ao grupo único; e (B) Referente as raças (B' = raça 'Milho'; B'' = raça 'Arroz')

3.2 Análises em cromatografia gasosa acoplada a eletroantenografia (CG/EAG)

A resposta eletrofisiológica da antena dos machos de *S. frugiperda* aos extratos naturais do feromônio sexual, permitiu caracterizar o perfil das diferentes linhagens em função do número de respostas (picos) observadas no EAG. Para tanto, foram confrontadas as atividades eletrofisiológicas das antenas dos machos com extratos do feromônio natural de *S. frugiperda* das próprias linhagens, linhagens diferentes, raças e localidades, bem como entre haplótipos.

As respostas observadas nas antenas dos machos ocorreram para até quatro compostos químicos distintos, com tempos de retenção (TR) em 22,9; 24,6; 27; e 29 minutos, respectivamente (Figura 15). Em razão do elevado número de possibilidades de comparações entre os grupos de interesse, linhagens por

localidades e demais grupos (raças e haplótipos), estas foram selecionadas privilegiando todas as combinações possíveis, e de acordo com a disponibilidade de insetos e sua capacidade de desenvolvimento em laboratório.

Figura 15 – Perfil da resposta eletroantenográfica dos machos aos extratos de fêmeas de *Spodoptera frugiperda* em CG/EAG. Os números 1, 2, 3, e 4 indicam uma correspondência entre a resposta da antena (EAG) e do composto químico presente na amostra (FID). Obs. Perfil obtido pela linhagem MS306.

* Ácidos graxos provenientes dos processos de extração (contaminantes).

Na primeira etapa de comparações eletroantenográficas foram confrontadas as respostas para machos da mesma linhagem da fêmea. Neste caso, todas as linhagens empregadas dos estados de MS, MT, SP, GO e RS apresentaram ao menos uma resposta (pico), notavelmente para o composto 2 (TR= 24,6min) (Tabela 6). As linhagens do RS não apresentaram resposta aos compostos 1 (TR=22,9 min), 3 (TR= 27min), e 4 (TR=29min), assim como SP aos compostos 3 e 4; e GO ao composto 1. De modo inverso, boa parte das linhagens do MS (305, 306, 307, 309, 312, e 314) apresentaram 4 respostas eletrofisiológicas, sendo todas as fêmeas pertencentes a raça ‘Milho’, exceto a linhagem MS314 que era representado pela raça ‘Arroz’.

Tabela 6 - Respostas eletroantenográficas (picos) observadas nos perfis cromatográficos para os extratos naturais do feromônio sexual de *Spodoptera frugiperda* para as antenas dos machos de mesma linhagem

Linhagens ^a	Picos observados ^b				Raça e Haplótipo ^c	
	1	2	3	4		
MS301	X	X	X		H7	A
MS302	X	X		X	H64	M
MS304		X	X		H16	M
MS305	X	X	X	X	H1	M
MS306	X	X	X	X	H1	M
MS307	X	X	X	X	H15	M
MS308	X	X	X		H27	M
MS309	X	X	X	X	H8	M
MS310	X	X	X		H3	M
MS312	X	X	X	X	H1	M
MS313		X	X	X	H2	M
MS314	X	X	X	X	H7	A
MS72		X	X		H1	M
MT33		X	X	X	H3	M
MT45	X	X	X		H1	M
SP163	X	X			H8	M
SP184		X			H14	M
GO120		X	X		H1	M
GO138		X	X		H4	M
GO130		X	X		H79	A
GO119		X	X	X	H57	M
RS12		X			H12	M
RS61		X			H11	M

^a(MS= Mato Grosso do Sul; MT= Mato Grosso; SP= São Paulo; GO= Goiás; RS= Rio Grande do Sul)

^bConforme resposta eletroantenográfica (EAG) ao(s) composto(s) químico(s) presente na amostra (FID)

^c(H= haplótipo; A= raça 'Arroz'; B= raça 'Milho')

Numa segunda etapa de comparações foi testada a resposta da antena dos machos de linhagens diferentes para um mesmo extrato (MS306). Os resultados indicaram que não houve resposta eletroantenográfica para todas as linhagens testadas, incluindo as linhagens MS304, 307, 308, 312, e 72. Diferentemente dos machos comparados com os extratos da fêmea de mesma linhagem, a resposta ao composto 2 nem sempre esteve presente nesta etapa, particularmente nas linhagens do MS, pertencentes ao mesmo estado do extrato utilizado (MS306). Nas demais linhagens, dos demais estados a resposta ao composto 2 sempre ocorreu.

Tabela 7 - Respostas eletroantenográficas (picos) observadas nos perfis cromatográficos do extrato natural do feromônio sexual da linhagem MS306 de *Spodoptera frugiperda* para as antenas dos machos de outras diferentes linhagens

Linhagens ^a	Picos observados ^b				Raça e Haplótipo ^c	
	1	2	3	4		
MS301	X	X	X	X	H7	A
MS302		X			H64	M
MS304					H16	M
MS305	X	X	X	X	H1	M
MS306	X	X	X	X	H1	M
MS307					H15	M
MS308					H27	M
MS309	X				H8	M
MS310	X				H3	M
MS312					H1	M
MS313		X			H2	M
MS314					H7	A
MS72					H1	M
MT33	X	X	X	X	H3	M
MT45	X	X	X	X	H1	M
SP163	X	X	X	X	H8	M
SP184		X			H14	M
GO120	X	X	X	X	H1	M
GO138		X			H4	M
GO130		X			H79	A
GO119		X			H57	M
RS12		X			H12	M
RS61		X			H11	M

^a(MS= Mato Grosso do Sul; MT= Mato Grosso; SP= São Paulo; GO= Goiás; RS= Rio Grande do Sul)

^b Conforme resposta eletroantenográfica (EAG) ao(s) composto(s) químico(s) presente na amostra (FID)

^c(H= haplótipo; A= raça 'Arroz'; B= raça 'Milho')

Quando testadas as respostas cruzadas entre machos e fêmeas das raças 'Milho' e 'Arroz', observou-se que utilizando fêmeas (extrato) da mesma raça 'Milho', (MS306) houve a resposta para 4 compostos da amostra, independente da raça do macho utilizado, sendo que o mesmo não ocorreu para o confronto inverso (Tabela 8).

Quando comparados machos e fêmeas de localidades diferentes foi possível observar uma resposta consistente em todas linhagens ao composto 2. Neste caso, não ocorreram respostas aos 4 compostos (Tabela 8).

Tabela 8 - Respostas eletroantenográficas (picos) observadas nos perfis cromatográficos dos extratos de *Spodoptera frugiperda* para as antenas dos machos entre raças e localidades.

Fêmea (extrato)	Macho (antenas)	Picos Observados ^b			
		1	2	3	4
Entre Raças ^a					
‘Arroz’ (MS301)	‘Arroz’ (MS301)	X	X	X	
‘Arroz’ (MS301)	‘Milho’ (MS306)		X	X	
‘Milho’ (MS306)	‘Milho’ (MS306)	X	X	X	X
‘Milho’ (MS306)	‘Arroz’ (MS301)	X	X	X	X
Entre Localidades ^a					
MS (MS305)	GO (GO120)		X	X	
MS(MS305)	SP (SP163)	X	X	X	
MS (MS305)	MT (MT45)		X		
MS (MS305)	RS (RS61)		X	X	
RS (RS61)	GO (GO120)		X		
RS (RS61)	MS (MS305)		X	X	
RS (RS61)	SP (SP163)		X	X	
RS (RS61)	MT (MT45)		X		X
SP (SP163)	MS (MS305)		X		
SP (SP163)	RS (RS61)		X	X	
SP (SP163)	MT (MT45)		X		
SP (SP163)	GO (GO120)		X	X	
GO (GO120)	SP (SP163)		X		
GO (GO120)	MS (MS305)		X		
GO (GO120)	RS (RS61)	X	X		
GO (GO120)	MT (MT45)		X		
MT (MT45)	SP (SP163)		X		
MT (MT45)	MS (MS305)		X	X	
MT (MT45)	RS (RS61)		X		
MT(MT45)	GO (GO120)		X		

^a(MS= Mato Grosso do Sul; MT= Mato Grosso; SP= São Paulo; GO= Goiás; RS= Rio Grande do Sul)

^b Conforme resposta eletroantenográfica (EAG) ao(s) composto(s) químico(s) presente na amostra (FID)

Ao compararmos as respostas obtidas entre as diferentes linhagens, mas todas pertencentes ao haplótipo H1, foi possível verificar que a localidade parece influenciar nesse padrão de respostas visto que as linhagens são da mesma raça e do mesmo haplótipo, e ainda sim apresentaram diferenças quanto a resposta (Tabela 9).

Analisando os extratos dos haplótipos que estão ligados ao dominante (H1) por um ou por poucos passos mutacionais como, por exemplo, H2, aparentemente este haplótipo apresentou o mesmo padrão de resposta observado para o H1. No entanto, à medida que a distância entre esses haplótipos vai aumentando, o número de respostas observadas vai diminuindo, como é o caso dos haplótipos H79, H64, onde as respostas ao composto 4 deixam de ser observadas, e ainda, ligados a eles também estão os haplótipos H4 e H57 apenas com resposta ao composto 2 da mistura (Tabela 9).

Tabela 9 - Respostas eletroantenográficas (picos) observadas nos perfis cromatográficos dos extratos de *Spodoptera frugiperda* para as antenas dos machos entre haplótipos

Fêmea (extrato) ^a	Macho (antenas) ^a	Picos Observados entre Haplótipos ^{b, c}			
		1	2	3	4
H1 (MS306)	H1 (MS305)	X	X	X	X
H1 (MS305)	H1 (MS306)	X	X	X	X
H1 (MS306)	H1 (MT45)	X	X	X	
H1 (MT45)	H1 (MS306)		X	X	
H1 (GO120)	H1 (MS306)		X	X	
H1 (MS306)	H1 (GO120)	X	X	X	
H1 (GO120)	H1 (MT45)		X		
H1 (GO120)	H1 (MT305)	X	X		
H1(MS306)	H2(MS313)		X	X	
H1(MS306)	H3(MS310)		X	X	
H1(MS306)	H4(GO138)		X	X	
H1(MS306)	H7(MS301)	X	X	X	X
H1(MS306)	H8(SP163)		X	X	
H1(MS306)	H11(RS61)		X	X	
H1(MS306)	H14(SP184)		X		
H1(MS306)	H57(GO119)		X	X	
H1(MS306)	H64(MS302)	X	X	X	
H1(MS306)	H79(GO130)		X	X	
H2(MS313)	H1(MS306)	X	X	X	X
H3(MS310)	H1(MS306)	X	X		
H4(GO138)	H1(MS306)		X		
H7(MS301)	H1(MS306)	X	X	X	X
H8(SP163)	H1(MS306)		X	X	
H11(RS61)	H1(MS306)		X	X	
H14(SP184)	H1(MS306)		X	X	
H57(GO119)	H1(MS306)		X		
H64(MS302)	H1(MS306)	X	X		
H79(GO130)	H1(MS306)	X	X	X	
H8(SP183)	H11(RS61)		X	X	
H11(RS61)	H8(SP163)		X	X	

^a(MS= Mato Grosso do Sul; MT= Mato Grosso; SP= São Paulo; GO= Goiás; RS= Rio Grande do Sul)

^b Conforme resposta eletroantenográfica (EAG) ao(s) composto(s) químico(s) presente na amostra (FID)

^c Os testes foram realizados intencionalmente entre haplótipos próximos e distantes do dominante, únicos e com frequência superior a um, conforme Figura 13.

A variação na produção de feromônio em *S. frugiperda* nas raças ‘Milho’ e ‘Arroz’, é relatada por Groot et al. (2008). Contudo, observamos que a variação na produção de feromônio está ligada não somente a raça hospedeira ‘Milho’ e ‘Arroz’, mas também a variação haplotípica, demonstrando uma tendência para um cenário extremamente complexo. Este panorama instiga a necessidade de conhecermos

mais regiões do genoma desta espécie visando encontrar variabilidade genotípica a ser estudada e correlacionada com a estrutura química do feromônio sexual de *S. frugiperda*, visando o entendimento tanto da produção quanto da percepção deste sinal químico, visto que existe padrões diferentes de recepção e resposta destes compostos já demonstradas para outras espécies do gênero (QUERO et al., 1996). As respostas observadas para machos de haplótipos distintos parece estar relacionado às variações intraespecíficas de *S. frugiperda* e ainda as demais forças que atuam sobre a formação desse grupo, como por exemplo, o haplótipo dominante o qual está sob o efeito das localidades, uma vez que ele abriga 138 indivíduos distribuídos entre os diferentes locais de coleta.

As diferenças entre a atividade reprodutiva das raças nos insetos e consequentemente, no seu feromônio tem sido descrita sob diferentes enfoques, seja como uma diferença entre “canais de comunicação” entre as raças, ou a presença de barreiras pré-copulatórias que interfiram no acasalamento entre os grupos. Assim como neste trabalho, as diferenças entre o feromônio das fêmeas de *S. frugiperda* oriundas de diferentes localidades bem como as diferenças sazonais observadas na frequência de raças, parece ser o produto de uma combinação de fatores relacionados ao comportamento reprodutivo, variação no feromônio, maturidade sexual alocrônica em ambiente natural, influências climáticas, entre outras (PASHLEY; MARTINS, 1987; PASHLEY; HAMMOND; HARDY, 1992; LIMA; MC NEIL, 2009).

Ao comparar as respostas das antenas dos machos ao feromônio das fêmeas dentro de cada haplótipo foi possível observar que os fatores que separam esses grupos podem interferir também no número de respostas observadas para os haplótipos mais distantes do dominante. Estas variações não podem ser isoladas dos demais fatores tendo em vista a existência de todos os locais amostrados integrando o haplótipo dominante o que gera uma ampla variação dentro do próprio H1, resultado de uma grande diversidade genética conforme apresentado anteriormente.

Com base nos resultados observados, pode-se afirmar que existe uma variação na resposta entre as linhagens estudadas, o que certamente foi uma consequência da variação na produção do feromônio – objeto desse estudo – ou ainda produto da diferença nos mecanismos de recepção da mistura feromonal

pelos machos, o que não foi mensurado. Isto indica que uma mesma fêmea pode mostrar-se atraente aos indivíduos de diferentes locais do país, tendo em vista os resultados aqui apresentados entre diversas localidades, raças e haplótipos.

3.3 Confirmação dos compostos sintéticos e abundância relativa dos compostos

Dentre os compostos candidatos ao feromônio sexual de *S. frugiperda* foi possível confirmar a presença do acetato (*Z*)-9-tetradecenila (Figura 16) e do acetato de (*Z*)-11-hexadecenila (Figura 17), que correspondem aos picos 2 e 3, observados nas respostas eletroantenográficas, respectivamente (Figura 15).

Figura 16 - Cromatogramas da co-injeção dos extratos de *Spodoptera frugiperda* e dos padrões sintéticos: linha preta extrato natural de fêmeas+ acetato de (*Z*)-9-tetradecenila (seta) e na linha rosa: extrato natural de fêmeas (MS306).

Figura 17 - Cromatogramas da co-injeção dos extratos de *Spodoptera frugiperda* e dos padrões sintéticos: linha preta extrato natural de fêmeas+ acetato de (Z)-11-hexadecenila (seta) e na linha rosa extrato natural de fêmeas (MS306).

* Ácidos graxos provenientes dos processos de extração (contaminantes).

No que se refere a concentração do composto majoritário, acetato de (Z)-9-tetradecenila houve diferença entre as fêmeas para as diferentes localidades do país. A abundância relativa do composto majoritário no feromônio variou de 0,42 a 4,79 ng.μL⁻¹ (0,42 a 4,79 ng.fêmea⁻¹)(Figura 18). A linhagem que apresentou maior concentração do composto majoritário foi a representada pelos indivíduos oriundos de Goiás com 4,79 ng.μL⁻¹ seguida pela linhagem representante dos indivíduos do Rio Grande do Sul com 1,86 ng.μL⁻¹.

As linhagens representantes de Mato Grosso do Sul e São Paulo apresentaram 0,92 ng.μL⁻¹ e 0,99 ng.μL⁻¹, respectivamente e a linhagem que apresentou menor concentração foi a dos indivíduos do Mato Grosso a qual possuíam 0,42 ng.μL⁻¹ (Figura 18).

Figura 18 - Concentrações do composto majoritário, acetato de (Z)-9-tetradecenila, presente no feromônio sexual de *Spodoptera frugiperda*. Comparações entre localidades: SP163; MT45; MS306; RS12; e GO120; Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Outras comparações para uma melhor compreensão da dinâmica da variação feromonal de *S. frugiperda* foram realizadas por meio dos dados de variabilidade genética. Assim, entre as raças 'Milho' e 'Arroz' não foi observado um efeito das raças dentro da mesma localidade (Goiás), sendo que para a raça 'Milho' a concentração encontrada foi de $0,23 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$, e de $0,49 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ para a raça 'Arroz' (Figura 19A). Em comparação semelhante Unbehend et al. (2013) relata diferenças entre as raças para o composto majoritário da mistura feromonal de *S. frugiperda* acetato de (Z)- 9-tetradecenila, além do acetato de (Z) -7-dodecenila.

Ao compararmos alguns haplótipos de interesse foi possível analisar a relação existente entre esses grupos. A medida que a distância do haplótipo dominante H1 aumenta, como é o caso do H57 que está separado do H1 por 12 passos mutacionais observou-se uma redução da concentração do composto de $0,23 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ para $0,05 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$. Quando observamos a variação das concentrações dos haplótipos que representam a segunda estrela da rede haplotípica e estão separados por infinitos passos mutacionais da estrela do dominante, observamos que há uma concentração maior do composto majoritário para estes haplótipos H7 e

H79 com $0,33 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ e $0,49 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ respectivamente (Figura 19B). Convém ressaltar que esses haplótipos H7 e H79 representam indivíduos da raça 'Arroz', o que corrobora com a comparação anterior, entre as raças.

Figura 19 - Concentrações do composto majoritário (acetato de (Z)-9-tetradecenila) presente no feromônio sexual de *Spodoptera frugiperda*. (A) Comparações entre as raças 'Arroz' (GO130) e 'Milho' (GO120); (B) Comparações entre os haplótipos H57:GO119; H7:MS301; H1:GO120; e H79:GO130

3.4 Túnel de Vento

Ao analisar a resposta dos machos às fêmeas pertencentes a sua mesma localidade (linhagem) foi verificada um alto percentual de atração, incluindo uma aproximação da fonte de feromônio (classes de resposta I, II e III) (Figura 21). Entretanto, tentativas de cópula (classe de resposta IV) para a mesma linhagem não foram comuns para os indivíduos do MS e SP, sugerindo uma não preferência por acasalamentos consanguíneos neste caso. Esse fato já foi anteriormente relatado para outros lepidópteros da família Noctuidae (GEMENO; LUTFALLAH; HAYNES, 2000), onde as diferenças de atração entre indivíduos de mesma população ou de populações diferentes está atribuído à características evolutivas e variação na proporção dos principais compostos da mistura feromonal.

O comportamento dos machos observado nos testes entre grupos diferentes apresentou um padrão característico. O macho ao ser liberado orienta-se em direção a fêmea (comportamento da classe 0), estabelece uma trajetória de voo em zigue-zague, também descrita por Murlis e Bettany (1977) encontrando a pluma de feromônio (comportamento das classes I e II), porém, ao chegar próximo da fonte de odor (comportamento da classe III), o macho parece não identificar a fêmea, visto que ultrapassa a gaiola onde estão as fêmeas sem pousar ou realizar o comportamento de tentativa de cópula ou ainda não chega até a gaiola que abriga as fêmeas (Figura 20). Este macho acaba pousando na estrutura do túnel (fundo, piso ou laterais), e não se aproxima mais da fonte de odor, ou em alguns casos acaba retornando ao ponto de liberação e torna a investir em uma nova aproximação.

Isso provavelmente se deve ao fato de que o macho ao perceber o feromônio das fêmeas de linhagem diferente, exibe o comportamento inato da espécie orientando-se em direção à fonte emissora do odor, porém logo, tem o seu interesse reduzido ou até desiste de tentar a cópula com essa fêmea, e acaba por aguardar um novo sinal.

Figura 20 - Machos de *Spodoptera frugiperda* durante os bioensaios em túnel de vento. (A) Macho em voo próximo à fonte de odor (fêmeas); (B) macho pousando sobre a gaiola das fêmeas; e (C) macho durante o comportamento de corte expondo o tufo de pelos (seta)

Quando analisados de forma sequencial as classes de comportamentos descritas, observou-se que para algumas localidades a resposta dos machos se altera somente ao atingir o comportamento de classe III (cerca de 20 a 30 cm da fonte de odor). Para os indivíduos de SP, por exemplo, essa resposta já era inicialmente menor, muito provavelmente por uma condição intrínseca da linhagem.

Machos do RS foram altamente atraídos para fêmeas de GO e igualmente atraídos para as fêmeas de MS e SP, e pouco atraídos para as fêmeas do MT. Essa alta atração para fêmeas de GO poderia ser explicada pela alta concentração do composto majoritário da mistura encontrado no extrato de fêmeas desta localidade, e para esse confronto observou-se duas respostas eletroantenográficas. Já a baixa atração para as fêmeas do MT poderia ser explicada por apresentar resposta eletroantenográfica apenas para o composto majoritário.

Machos do MT foram igualmente atraídos para as fêmeas de GO e do RS, porém não foram atraídos para as fêmeas de MS. Isto poderia estar relacionado com a ampla variação encontrada nessa localidade, com o maior número de haplótipos e de indivíduos da raça 'Arroz', além de ser a localidade que apresentou o maior número de respostas na eletroantenografia. Outro fato a ser levado em consideração é que os machos do MT, os quais interromperam o comportamento de corte foram aqueles coletados sob área de refúgio de Milho *Bt* e considerando a alta movimentação dos insetos observada neste trabalho, os insetos podem estar sob a influência da pressão de seleção e esta atuando nas características comportamentais e reprodutivas dos insetos (GASSMANN; CARRIERE; TABASHNIK, 2009).

Foi observado um alto percentual de resposta dos machos de GO para as fêmeas do MS e SP o que não aconteceu para as fêmeas do MT e RS, em função da resposta exclusiva para o composto majoritário da mistura nas análises em eletroantenografia, o que sugere uma menor habilidade dos machos em reconhecer outros compostos, ou a concentração em que estavam presentes. Vale ressaltar que para as localidades onde a atração dos machos de GO foi maior houve uma melhor resposta eletroantenográfica.

Os machos do MS apresentaram um maior percentual de tentativas de cópula para as fêmeas do MT e SP em detrimento das fêmeas da própria localidade. Para fêmeas do RS e GO os machos do MS mostram-se igualmente atraídos.

Neste trabalho as avaliações priorizaram as características das fêmeas e sua atração aos machos dentro dos grupos analisados, não estando assim descartada a influência das variações advindas da carga genética dos machos, da composição dos híbridos de raças ou da avaliação da capacidade sensorial de outras linhagens que não as escolhidas. Indiscutivelmente as variações encontradas neste estudo

estão sob o efeito das características específicas de cada linhagem, da variação individual e do potencial de resposta de cada macho.

Figura 21 - Percentual de atração dos machos (comportamento sequencial) às fêmeas de *Spodoptera frugiperda* em túnel de vento. Em cada classe de comportamento está representada a localidade representada por indivíduos machos e fêmeas dos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio Grande do Sul e São Paulo. Sequência dos comportamentos (Classe I: Resposta inicial do macho; Classe II: O inseto atinge 50% da extensão do túnel; Classe III: O macho aproxima-se da fonte de odor e Classe IV: tentativa de cópula). Letras iguais não diferem entre si dentro da classe de comportamento pelo teste de Tukey para comparações múltiplas de proporções ($P < 0,05$)

4 CONCLUSÕES

- A frequência das raças 'Milho' e 'Arroz' nas populações brasileiras de *Spodoptera frugiperda* varia de acordo com o local e época de amostragem;
- Existe um elevado número de haplótipos nas populações brasileiras amostradas de *S. frugiperda* e este é resultado de uma alta diversidade haplotípica e das pressões do ambiente;
- Machos respondem para até 4 compostos químicos presentes nos extratos naturais do feromônio sexual de *S. frugiperda*, dependendo da localidade estudada no Brasil;
- Existe uma diferença na abundância do composto majoritário presente na mistura do feromônio sexual de *S. frugiperda*, o acetato de (Z)-9 Tetradecenila, entre as populações das diferentes localidades avaliadas;
- Existem diferentes níveis de atração dos machos para as fêmeas de *S. frugiperda* entre indivíduos de uma mesma localidade ou entre localidades distintas.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT - SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Coordenação - Geral de Agrotóxicos e Afins/DFIA/DAS. Brasília, 2009. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 21 jul. 2013.
- ANDRADE, R.; RODRIGUEZ C.; OEHLSCHALAGER, A.C. Optimization of a Pheromone Lure for *Spodoptera frugiperda* (Smith) in Central America. **Journal Brazilian Chemical Society**, Campinas, v.11, n.6, p. 609-613, 2000.
- ALVES, S.B. Microorganismos associados a insetos In: ALVES, S.B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. cap. 4, p. 75 - 96
- BATISTA-PEREIRA, L.G. STEIN K.; DE PAULA, F. A.; MOREIRA, A. J.; CRUZ, I. FIGUEIREDO M. L. C.; PERRI, J. JR.; CORRÊA J. G. Isolation, Identification, Synthesis, and Field Evaluation of the Sex Pheromone of the Brazilian Population of *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 32, n. 5, p. 1085-1099, 2006.
- BARTH, R. Estímulos químicos como meio de comunicação entre os sexos em Lepidópteros. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 3, p. 343-362, 1958.
- BECNEL, J. JAMES.; ANDREADIS, G. THEODORE. **Microsporidia in insects**. In: WITTNER, M. ; WEISS, L.M. (Ed.). *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Washington: American Society for Microbiology, 1999. cap. 14, p. 447-516.
- BELAY, D. K.; CLARK, P. L.; SKODA, S. R.; ISENHOUR, D. J.; MOLINA-OCHOA, J.; GIANNI, C.; FOSTER, J. E. Spatial genetic variation among *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) sampled from the United States, Puerto Rico, Panama, and Argentina, **Annals the Entomological Society of America**, Columbus, v. 105, n. 2, p.359- 367, Mar, 2012.
- BELL, W.J.; KIPP, L.R.; COLLINS, R.D. The role of chemo-orientation in search behavior. In: CARDÉ, R.T.; BELL, W.J. **Chemical ecology of insect 2**. New York: Chapman & Hall, 1994. cap.4, p.105-152.

BENTO, J.M.S. Fundamentos do monitoramento, da coleta massal e do confundimento de insetos-praga. In: VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. (Ed.)

Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas.

Ribeirão Preto: Holos, 2001, cap.16, p. 135-144.

BENTO, J.M.S.; PARRA-PEDRAZZOLI, A.L. Feromônios e controle biológico de pragas. In: SENE PINTO, A.; NAVA, D.E.; ROSSI, M.M. MALERBO-SOUZA, D.T.

Controle biológico de pragas na prática. Piracicaba: CP2, 2006, cap. 17, p. 213-219.

BIRCH, M.C.; POPPY, G.M.; BAKER, T.C. Scents and eversible scent structures of males moths. **Annual Review Entomology**, Stanford, v. 35, p. 25-58, 1990.

BJOSTAD, L.B. Electrophysiological methods. In: HAYNES, K.F.; MILLAR, J.G.

Methods in chemical ecology: chemical methods. London, v. 1, 1998. p. 339-369.

BOTTON, M. CARBONARI, J. J.; GARCIA, M. S.; MARTINS J. F. S. Preferência alimentar de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em arroz e capim-arroz. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 27, p. 207-212, 1998.

BUSATO, G.R.; GRÜTZMACHER A. D.; GARCIA, M. S.; GIOLO, F. P.; ZOTTI, M. J.; STEFANELLO JR., G. J. Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, das culturas do milho e do arroz irrigado. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 525-529, 2002.

BUSATO, G.R.; GRÜTZMACHER, A. D.; OLIVEIRA, A. C.; VIEIRA, E. A.; ZIMMER, P. D.; KOPP, M. M.; BANDEIRA, J. M.; MAGALHÃES, T. R. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas do milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 709-716, 2004.

BUSATO, G.R.; LOECK, A. E.; GARCIA, M. S.; BERNARDI, O.; ZART, M.; NUNES, A. M.; ZAZYCKI, L. C. F. Compatibilidade reprodutiva entre os biótipos “milho” e “arroz” de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 14, n. 2, p.273-278, 2008.

BUTT, B. A.; CANTU, E. **Sex determination of lepidopterous pupae.** Washington: USDA, 1962. 7p.

CAMPION, D.G; HUNTER-JONES, P.;MCVEIGH, L. J.; HALL, D.R.;LESTER, R.; NESBITT, B. F. Modification of the attractiveness of the primary pheromone component of the Egyptian cotton leafworm, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae), by secondary pheromone components and related chemicals. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 70, n. 3, p. 417-434, 1980.

CARDÉ, R. T.; BAKER, T. C. Sexual communication with pheromones. In: BELL, W.J.; CARDÉ, R.T. **Chemical ecology of insects**. London : Chapman & Hall , 1984.p.356-383.

CARDÉ, R.T.; HAYNES, K.F. Structure of the pheromone communication channel in moths. In: CARDÉ, R.T.; MILLAR, J. **Advances in insect chemical ecology**. New York : Cambridge University Press, 2004, cap.8, p.283-322.

CLEMENT, M.; D; POSADA; K.; A. CRANDALL. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, Oxford, v.9, n.10, p.1657-1660, 2000.

CRUZ, I. **Recomendações técnicas para o cultivo do milho**: principais pragas e seu controle. Brasília: Embrapa/SPI, 1993. 204p. (Documentos, 204).

CRUZ, I. **A lagarta do cartucho na cultura do milho**. Sete Lagoas:EMBRAPA CNPMS1995. 45p. (Circular Técnica, n. 21).

CRUZ, I.; VIANA, P. A.; WAQUIL, J. M. **Cultivo do milho. Sete Lagoas**: Embrapa Milho e Sorgo, 2008. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/Fontes HTML/Milho/CultivodoMilho_4ed/prvegetativa.htm>Acesso em: 22 jul. 2009. (Sistemas de Produção, 2).

DESCOINS, C.; SILVAIN, J.F.; LALANNE-CASSOU, B.; CHÉRON, H. Surveillance d'insectes ravageurs des cultures par piégeage sexuel des males dans les départements de la Guadeloupe et la Guyane. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Philadelphia, v. 21, p. 53-65, 1988.

DRÈS, M.; MALLET, J. Host races in plant-feeding insects and their importance sympatric speciation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 357, n. 1420, p. 471-492, 2002.

EHLER, L. Perspective integrated pest management (IPM): definition, historical development and implementation, and the other IPM. **Pest Management Science**, Sussex, v. 62, p. 787-789, 2006.

ELLIOTT, A.C.; REISCH, J.S. Implementing a multiple comparison test for proportions in a 2xC crosstabulation in SAS®. **Proceedings of the SAS Users Group International 31**, San Francisco, CA, March 26–29, 2006. Paper 204-31. (<http://www2.sas.com/proceedings/sugi31/204-31.pdf>), 2006.

EI-SAYED, A. M. **The Pherobase**: Database of Pheromones and Semiochemicals. Disponível em: <http://www.pherobase.com.2012>.

EXCOFFIER; L.; LISCHER, H. **Arlequin ver. 3.5**: An integrated software package for population genetics data analysis. Institute of Ecology and Evolution University of Berne. Bern, Switzerland. Disponível em: <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>. Acesso em: Mar. 2011.

FITT, G.P.; ANDOW, D. A.; CARRIÈRE, Y.; MOAR, W. J.; SCHULER, T. H.; OMOTO, C., KANYA, J.; OKECH, H.; ARAMA, P.; MANIANIA, N. K. Resistance risks of *Bt* cotton and their management in Brazil. In: HILBECK, A. ANDOW, D.A ; FONTES, E.M.G. (Ed.). **Environmental risk assessment of genetically modified organisms: Methodologies for assessing Bt cotton in Brazil**. Cambridge: CABI Publishing, 2006, p.300-345.

FERNANDES, O.D.; PARRA, J. R. P.; NETO, A. F.; PÍCOLI, R; BORGATTO, A. F.; DEMÉTRIO, C. G. B. Efeito do milho geneticamente modificado (MON810) sobre a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 2, p. 25-35, 2003.

FREEMAN, MF.; TUKEY, J.W. Transformation related to the angular and the square root. **The Annals of Mathematical Statistics**, Durham, v. 21, n. 4, p. 607-611, 1950.

GASSMAN, A.J. ; CARRIERE, Y.; TABASHNIK, B.E. Fitness Costs of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, Standford, v.54, p.147-163, 2009.

GEMENO, C.; LUFTALLAH, A. F.; HAYNES, K. F. Pheromone blend variation and cross-attraction among populations of Black cutworm moth (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 93, n. 6, p.1322-1328, Nov., 2000.

GEOSPIZA RESEARCH **Finch tv version 1.4.0**, 2006. Disponível em www.geospiza.com/finchtv >. Acesso em:30 jun.2011.

GIOLO, F. GIOLO, GRÜTZMACHER, A. D.; GARCIA, M. S.; BUSATO, G. R. Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (LEP.: Noctuidae) oriundas de diferentes localidades e hospedeiros, **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 8, n. 3, p. 219-224, set-dez, 2002.

GREENE, G.L.; LEPPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.

GROOT, A.T.; MARR, M.; HECKEL, D.; SCHOFEL, G. Host strain specific sex pheromone variation in *Spodoptera frugiperda*. **Frontiers in Zoology**, London, v. 5, n. 20, p. 1-13, 2008.

JACOBSON, M. REDFERN, R. E.; JONES, W. A.; ALDRIDGE, M. H. Sex pheromones of the southern armyworm moth: isolation, identification, and synthesis. **Science**, Washington, v. 170, n. 3957, p. 542-544, 1970.

JOHNSON, S.F. Migration and the life history strategy of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in the Western Hemisphere. **Insect Science and its Application**, Elmsford v. 8, p. 543-549, 1987.

JUÁREZ M.; MURÚA, G.; GARCÍA, G. M.; ONTIVERO, M.; VERA, M. T.; VILARDI, J. C.; GROOT, A.T.; CASTAGNARO, A. P.; GASTAMINZA, G.; WILLINK, E. Host association of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Corn and Rice strains in Argentina, Brazil, and Paraguay **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 105, n. 2, p. 573 – 582, Abril, 2012

KOGAN, M. Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 43, p. 243-270, 1998.

KOGAN, M.; BAJWA, W.I. Integrated pest management: a global reality? **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 28, n. 1, p.1-25, 1999.

KOVATS, E. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindung enTeil 1 : Retentions indices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. **Helvetica Chimica Acta**, v. 41, fasc. 7,n. 206, p. 1925-1932,1958.

LEAL, W.S.; BENTO, J. M. S.; MURATA, Y.; ONO, M.; PARRA, J. R. P.; VILELA, E. F. Identification, synthesis, and field evaluation of the sex pheromone of the citrus borer *Ecdytoplopha aurantiana* (Lepidoptera: Tortricidae) **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 27,n. 10,p. 2041-2051, 2001.

LEY, H.; VICKERS, N. Central processing of natural odors mixtures in insects. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 34, n. 7, p. 915-927, 2008.

LEWTER, J.A.; SZALANSKI, A. L.; NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L. JR.; OWENS, C.B.; LUTTRELL, R. G. Genetic variation within and between strains of the Fall Armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, Vickery, v. 89, n. 1, p. 63-68, Mar., 2006.

LIMA, E.R.; MCNEIL, J.N. Female sex pheromones in the host races and hybrids of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Chemoecology**, Basel, v.19, n. 1, p. 29-36, 2009.

LÖFSTEDT, C. Moth pheromone genetics and evolution. **Philosophical Transactions of the Royal Society** London, Series B, v. 340, p.167-177, 1993.

LUGINBILL, P. The fall armyworm. **Technical Bulletin, United States Department of Agriculture**, U. S. Department Printing Office:Washington, v.34, p. 1- 91, Feb., 1928.

MACHADO, V.; WUNDER, M.; BALDISSERA, V. D.; OLIVEIRA, J. V.; FIUZA, L. M.; NAGOSHI, R. N. Molecular Characterization of Host Strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Southern Brazil, **Annals the Entomological Society of America**, Columbus, v. 101, n. 3, p. 619-626, May, 2008

MARQUES, F.A.; MCELFFRESH, J.S.; MILLAR, J.G. Kovats Retention Indexes of Monounsaturated C12, C14, and C16 Alcohols, Acetates and Aldehydes Commonly Found in Lepidopteran Pheromone Blends. **Journal Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 11, n. 6, p. 592-599, 2000.

MARTINELLI, S.; BARATA, R. M.; ZUCCHI, M. I.; SILVA-FILHO, M. C.; OMOTO, C. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crop in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, n. 2, p. 519-526, 2006.

MEAGHER, R.L.; MITCHELL, E.R. Collection on fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) using selected pheromone lure and trap designs. **Journal Entomological Science**, Griffin, v. 36, n. 2, p.135-142, 2001.

MELO, E.P. **Desempenho de armadilhas à base de feromônio sexual para o monitoramento de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) na cultura do milho**. Dourados, 2005. 54p. Dissertação (Mestrado em

Agronomia). - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campus de Dourados, 2005.

MITCHELL, E.R.; DOOLITTLE, R.E. Sex pheromones of *Spodoptera exigua*, *S. eridania* and *S. frugiperda*: bioassays for field activity. **Journal of Economic Entomologist**, Lanham, v. 69, p. 324-326, 1976.

MITCHELL, E.R.; TUMLINSON, J.H.; McNEIL, J.N. Field evaluation of commercial pheromone formulations and traps using a more effective sex pheromone blend for the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 78, p. 1364-1369, 1985.

MONTI, L.; LALANNE-CASSOU, B.; LUCAS, P.; MALOSSE, C.; SILVAIN, J. Differences in sex pheromone communication systems of closely related species: *Spodoptera latifascia* (Walker) and *S. descoinsi* Lalanne-Cassou e Silvain (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 21, n. 5, p. 641-660, Jan., 1995.

MURLIS, J.; BETTANY, B.W. Night flight towards a sex pheromone source by male *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae), **Nature**, London, v. 268, n. 4, p. 433- 435, Aug, 1977.

NAGOSHI, R.N.; MEAGHER, R.L. *FR* Tandem-Repeat Sequence in Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Host Strains. **Annals the Entomological Society of America**, Columbus, v. 96, n.3, p. 329-335, May, 2003

NAGOSHI, R. MEAGHER, R. L.; ADAMCZYK, J. J. JR.; BRAMAN, S. K.; BRANDENBURG, R. L.; NUESSELY, G. New restriction fragment length polymorphisms in the cytochrome oxidase I gene facilitate host strain identification of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the Southeastern United States. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, n. 3, p. 671-677, 2006.

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**, Lanham, v. 100, n. 3, p. 954-961, 2007a.

NAGOSHI, R., SILVIE, P.; MEAGHER, R. L.; LOPEZ, J.; MACHADO, V. Identification and comparison of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in Brazil, Texas, and Florida. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 100, n. 3, p. 394-402, 2007b.

NAGOSHI, R., MEAGHER, R. L.; FLANDERS, K.; GORE, J.; JACKSON, R.; LOPEZ, J.; ARMSTRONG, J. S.; BUNTIN, G. D.; SANSONE, C.; LEONARD, B. R. Using haplotypes to monitor the migration of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) corn-strain populations from Texas and Florida. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, n. 3, p. 742-749, 2008.

NAGOSHI, R.N.; FLEISCHER, S.; MEAGHER, R.L. Texas Is the overwintering Source of Fall Armyworm in Central Pennsylvania: Implications for Migration Into the Northeastern United States. **Environmental Entomology**, Lanham, v. 38, n.6, p. 1546-1554, Dec., 2009

NAGOSHI, R.N.; MEAGHER, R.L.; JENKINS, D.A.J. Puerto Rico Fall Armyworm Has Only Limited Interactions with Those from Brazil or Texas but Could Have Substantial Exchanges with Florida Populations, **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.103, n. 2, p.360-367, April, 2010.

NAGOSHI, R.; MURÚA, M. G.; HAY-ROE, M.; JUÁREZ, M. L.; WILLINK, E.; MEAGHER, R. L. Genetic characterization of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Host Strains in Argentina. **Journal Economic Entomology**, Lanham, v. 105, n. 2, p. 418- 428, April, 2012.

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

PASHLEY, D.P.; MARTINS, J.A. Reproductive incompatibility between host strains of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 80, n. 6, p. 731-733, 1987.

PASHLEY, D.P.; HAMMOND, A.M.; HARDY, T.N. Reproductive isolation mechanisms in fall armyworm host strains (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v.85, n.4, p. 400-405, 1992.

PARRA-PEDRAZZOLI, A.L. **Isolamento, identificação, síntese e avaliação de campo do feromônio sexual do minador-dos-citros, *Phyllocnistis citrella* Stainton, 1856 (Lepidoptera: Gracillariidae)**. 2006. 81p.Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

PIRES, C.S.S.; VILELA, E.F.; VIANA, P.A.; FERREIRA, J.T.B. Avaliação no campo do feromônio sexual sintético de *Elasmopalpus lignosellus* (Lepidoptera: Pyralidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Jaboticabal, v. 21, n. 1, p. 59-68, 1992.

PITRE; H.N.; HOGG, D.B. Development of the fall armyworm on cotton, soybean and corn. **Journal of the Georgia Entomological Society**, Athens, v.18, n.2, p. 182-187, 1983.

QUERO, C.; LUCAS, P.; RENOU, M.; GUERRERO, A. Behavioral responses of *Spodoptera littoralis* males to sex pheromone components and virgin females in wind tunnel. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 122, n. 6, Jan.,p. 1087-1102,1996.

ROSA, A.P.A.; TRECHA, C.O.; ALVES, A.C.; GARCIA, L.; GONÇALVES, V.P. Biologia e tabela de vida de fertilidade de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) em linhagens de milho. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 1, p. 39-45, jan./mar., 2012

RYAN, T.A. Significance tests for multiple comparison of proportions, variances, and other statistics. **Psychological Bulletin**, Washington, v. 57, n. 4, p. 318-328, 1960.

SALINAS-HERNANDEZ; H.; SALDAMANO-BEJUMEA, C. I. Haplotype Identification within *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) Corn and Rice Strains from Colombia, **Neotropical Entomology**, Piracicaba, v. 40, n. 4, p. 421-430, Jan., 2011

SAS INSTITUTE **SAS System - SAS/STAT 9.1**, Cary, NC. SAS Institute, 2002.

SCHÖFL, G.; HECKEL, D.G.; GROOT, A.T. Time-shifted reproductive behaviours among fall armyworm (Noctuidae: *Spodoptera frugiperda*) host strains: evidence for differing modes of inheritance. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 22, n. 7, p. 144-1459, 2009.

SCHÖFL, G.; DILL, A.; HECKEL, D.G.; GROOT, A.T. Allochronic separation versus mate choice:nonrandom patterns of mating between fall armyworm host strains. **The American Naturalist**, Chicago, v. 177, n. 4, p. 470-485, April, 2011.

SEKUL, A.A.; COX, H.C. Sex pheromone in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith). **Bioscience**, Washington, v. 15, n. 10, p. 670-671, 1965.

SEKUL, A.A.; SPARKS, A.N. Sex pheromone of the fall armyworm moth: isolation, identification, and synthesis. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 60, n. 5, p. 1270-1272, Oct. 1967.

SIMMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 87, n. 6, p. 651-701, Nov., 1994.

SPARKS, A.N. A review of the biology of the fall armyworm. **Florida Entomologist**, Vickery, v. 62, p. 82-87, June, 1979.

SVENSSON, M.G.E.; BENGTSSON, M.; LÖFQVIST, J. Individual variation and repeatability of sex pheromone emission of female turnip moths *Agrotis segetum*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 23, n. 7, p.1833-1850, 1997.

SUNNUCKS, P.; HALLES, D.F. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae). **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 13, n. 3, p.510-524, 1996.

TAMURA K.; PETERSON D.; PETERSON N.; STECHER G.; NEI M.; KUMAR S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** (submitted), 2011.

TÒTH, M.; LÖFSTEDT, C.; BLAIR, B.W.; CABELLO, T.; FARAG, A.I.; HANSSON, B.S.; KOVALEV, B.G.; MAINI, S.; NESTEROV, E.A.; PAJOR, I.; SAZONOV, A. P.; SHAMSHEV, I. V.; SUBCHEV, M.; SZÖCS, G. Attraction of male turnip moths *Agrotis segetum* (Lepidoptera : Noctuidae) to sex pheromone components and their mixtures at 11 sites in Europe, Asia, and Africa. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 18, n. 8, p.1337-1347, 1992.

TUMLINSON, J.H.; MITCHELL, E.R.; TEAL, P.E.; HEATH, R.R.; MENGELKOCH, L.J. Sex pheromone of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) Identification of components critical to attraction in the field. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 12, n. 9, p. 1909-1926, 1986.

UNBEHEND, M.; HANNIGER, S.; VÁSQUEZ, G.M.; JUAREZ, M.L.; REISIG, D.; MCNEIL, J.N.; MEAGHER, R.L.; JENKINS, D.A.; HECKEL, DG.; GROOT, A.T. Pheromonal divergence between two strains of *Spodoptera frugiperda*. **Journal Chemical Ecology**, New York, v. 39, n. 3, p. 364 – 376, Mar., 2013

VALICENTE; F.H.; COSTA, E.F. da. Controle da lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), com o *Baculovirus Spodoptera*, aplicado via água de irrigação. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 61- 67, 1991

VELÁSQUEZ-VÉLEZ, M.I.; SALDAMANO-BENJUMEA; C.I.; RIOS-DÍEZ, J.D. Reproductive Isolation between Two Populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Collected in Corn and Rice Fields from Central Colombia. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 104, n. 4, p. 826-833, July, 2011.

VÉLEZ-ARANGO, A. M.; ARANGO, R. E.; VILLANUEVA, D. M.; AGUILERA, E.; SALDAMANDO, C. I. Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mediante marcadores mitocondriales y nucleares. **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v. 34, n. 2, p.145-150, Ago., 2008

VILELA, E.F.; PALLINI, A. Uso dos semioquímicos no controle biológico de pragas. In: PARRA, J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M. S. (Ed) **Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. São Paulo : Manole, 2002, cap. 31, p. 529-538

VOSSBRINCK, C.R.; ANDREADIS, T.G.; WEISS, L.M. **Phylogenetics**: Taxonomy and the microsporidia as derived fungi. In *Opportunistic infections: toxoplasma, sarcocystis, and microsporidia*. World Class Parasites, 2004, v. 9, p. 189-213.

ZARBIN, P.H.G; RODRIGUES, M.A.C.M.; LIMA, E. R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 722-731, 2009.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4th ed. Prentice Hall, 1999. 564p.

ZAZYCKI, L.C.F.; KUSS-ROGGIA, R.C.R.; SUJIMOTO, F.; PARRA-PEDRAZZOLI, A.L.; ALVES, K.J.; BENTO, J.M.S. **Comportamento sexual de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)**. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ECOLOGIA QUÍMICA, 7., 2011, Niterói: Universidade Federal Fluminense, 04 a 07 de dez.2011. <https://www.metaeventos.net/inscricoes/menus1.php?id=441>

WAQUIL, J.M.; VILELLA, F.M.F. Gene bom. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, v. 49, p. 22-26, 2003.

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**, San Diego, v. 77, p. 1-11, June, 2003.