

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

**Identificação e filogeografia molecular de broca-das-axilas (Lepidoptera:
Tortricidae) provenientes de cultivos de soja no Brasil**

Davi de Souza Fernandes

Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestre
em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2023**

Davi de Souza Fernandes
Bacharel em Ciências Biológicas

Identificação e filogeografia molecular de broca-das-axilas (Lepidoptera: Tortricidae)
provenientes de cultivos de soja no Brasil

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ALBERTO SOARES CORRÊA**

Dissertação apresentada para obtenção de título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2023

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

Fernandes, Davi de Souza

Identificação e filogeografia molecular de broca-das-axilas (Lepidoptera: Tortricidae) provenientes de cultivos de soja no Brasil / Davi de Souza Fernandes - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

78 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Broca-das-axilas 2. *Crociosema aporema* 3. DNA barcoding 4. Linhagem genética 5. Filogeografia I. Título

Dedico

A todos os pesquisadores temporários da ciência, comumente denominados de “estudantes de pós-graduação” que se submetem a fazer pesquisa e ciência com seriedade, apesar do salário tão baixo, sem perspectiva de aumento, sem participação de lucros, sem reconhecimento, sem direitos, sem férias, sem auxílio médico/odontológico, sem cesta-básica, sem auxílio transporte, sem aposentadoria, sem legislação que o auxilie, sem valorização de seu trabalho, sem o apoio da sociedade, e ainda por cima tão criticado nos últimos quatro anos. Dedico a todos esses trabalhadores que com devoção a causa se empenham para gerar conhecimento e avanço científico ao país, como bastidores da economia brasileira, sem os quais não haveria desenvolvimento tecnológico, não haveria agricultura de qualidade no ambiente tropical, e consequentemente, não teríamos um país com a importância agrícola que temos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alberto Soares Corrêa pela sua orientação, por proporcionar esse projeto, por me ensinar e me guiar durante meu mestrado, por abrir as portas de seu laboratório e me motivar a fazer ciência. Agradeço por sua amizade, companheirismo e profissionalismo no ambiente de trabalho, e por ser um profissional que enxerga a saúde e o bem-estar de seus estudantes,

Agradeço aos profissionais da Bayer, Renato Horikoshi e Patrick Dourado que providenciaram as coletas e auxiliaram na elaboração desse projeto, estendendo os valores da empresa para a sociedade.

Agradeço aos funcionários da entomologia, em especial Luiz Maluta, que me auxiliou muito nos incontáveis documentos exigidos durante o mestrado,

À Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia e Departamento de Entomologia e Acarologia, por oferecer a oportunidade de uma pós-graduação de excelência, gratuita e para todos, independentemente de sua raça, idade, gênero, convicções, estado econômico, opções sexuais e religiosas,

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo sem a qual seria impossível a realização desse projeto,

Aos colegas do laboratório e departamento, que compartilharam os momentos bons e ruins, nos motivando, ajudando e somando, sem os quais esse trabalho jamais teria sido realizado. Passamos por um período de pandemia, no qual ninguém saiu ileso de problemas emocionais e de saúde. Não foi fácil fazer pesquisa em um momento econômico incerto, com tantos ataques ideológicos contra a ciência, pesquisadores e estudantes de universidades públicas. Não foi fácil fazer pesquisa com o orçamento apertado, com bolsa atrasando, com o custo de vida alto, tendo que escolher entre o lanche ou a cerveja para os finais de semana em que tínhamos o privilégio de fazer algo diferente. Apesar disso, passamos e conseguimos nos ajudar... obviamente surtando em alguns momentos.

Agradeço meus amigos e família, que sempre estendem suas mãos para ajudar e atuar nos bastidores da minha jornada. Obrigado por trazer mais sentido à vida, me motivando, me carregando muitas vezes, e por estarem ao meu lado independente do momento.

Por fim, agradeço em especial minha esposa Mayra Moral, que aguentou ao meu lado todo esse tempo. Foram insetos no congelador de casa, noites mal dormidas, alguns finais de semana sem descanso e muito *stress*. Agradeço por todo amor e carinho, pela sua criatividade em planejar momentos incríveis e inesquecíveis em meio as dificuldades. Agradeço por ser minha confidente, auxiliadora e companheira, que me ajuda, me levanta e está comigo para somar em minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUÇÃO GERAL	9
1. REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1. Aspectos bioecológicos de <i>C. aporema</i>	15
1.2. Uma emergente praga de soja no Brasil	17
1.3. Diversidade genética, filogeografia e estrutura populacional	19
1.4. Estudos filogeográficos e demografia populacional de insetos-praga no Brasil	22
Referências	24
2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DA BROCA-DAS-AXILAS EM SOJA NO BRASIL	29
Resumo	29
Abstract.....	29
2.1. Introdução.....	30
2.2. Materiais e Métodos	33
2.2.1. Coleta dos insetos	33
2.2.2. Identificação morfológica.....	33
2.2.3. Extração de DNA, amplificação, sequenciamento e edição das sequências.	35
2.2.4. DNA barcoding	36
2.3. Resultados.....	38
2.3.1. Identificação e descrição morfológica das lagartas e adultos.....	38
2.3.2. Identificação molecular	41
2.3.1. Filogenia	42
2.4. Discussão	47
2.5. Considerações Finais	50
Referências	50
3. EXPANSÃO DEMOGRÁFICA DE <i>C. aporema</i> ESTA ASSOCIADA AOS CULTIVOS DE SOJA NO BRASIL	55
Resumo	55
Abstract.....	55
3.1. Introdução.....	56

3.2. Material e Métodos	58
3.2.1. Amostragem.....	58
3.2.2. Extração de DNA, amplificação e sequenciamento.....	59
3.2.3. Análise de Diversidade e relação genética entre haplótipos	61
3.2.4. Estrutura genética.....	61
3.2.5. Inferências genealógicas e demografia populacional.....	62
3.3. Resultados	63
3.3.1. Diversidade e relação genética entre haplótipos	63
3.3.2. Estrutura genética.....	68
3.3.3. 4.4. Demografia e história populacional	69
3.4. Discussão	72
3.5. Considerações Finais.....	74
Referências.....	75

RESUMO

Identificação e filogeografia molecular de broca-das-axilas (Lepidoptera: Tortricidae) provenientes de cultivos de soja no Brasil

A broca-das-axilas *Crociosema aporema* (Walsingham 1914) recentemente ganhou destaque pela ocorrência em cultivos de soja, onde historicamente não é reportada. Contudo, a crescente importância das broca-das-axilas como praga trouxe à tona a escassez de informações a respeito das populações que estão ocorrendo no Brasil, o que juntamente a falta de padronização na nomenclatura adotada para a espécie, e a possível presença de outras espécies de Tortricidae na cultura, levanta dúvidas da real identidade da broca-das-axilas presente em soja, no país. Além disso, a ocorrência onde frequentemente não é encontrada levanta questões acerca da demografia histórica e filogeografia dessa praga. Desse modo, os nossos objetivos foram primeiramente produzir o DNA *barcode* e avaliar as estruturas taxonomicamente importantes para a caracterização dos espécimes de broca-das-axilas coletados em áreas de soja no Brasil. Adicionalmente, nós estimamos a diversidade genética populacional e os parâmetros demográficos de *C. aporema*, por meio do sequenciamento de dois genes mitocondriais. As estruturas das asas e das genitálias estão de acordo com a descrição original para a espécie *C. aporema*. No entanto, a distância genética de 6% entre os indivíduos coletados no Brasil e indivíduos coletados na Costa Rica sugerem a presença de linhagens genéticas distintas para *C. aporema* nas Américas, separados há pelo menos 1,8 milhões de anos. Assim, não podemos descartar a possibilidade da presença de espécies crípticas, morfologicamente muito similares, ocorrendo de forma alopátrica no Brasil e Costa Rica, nem tampouco descartar a hipótese de uma mesma espécie. Por outro lado, a população presente em soja no Brasil é constituída de uma unidade geneticamente uniforme e com a diversidade distribuída homogeneamente no espaço. Essa população tem passado por um processo de expansão recente, com muitos haplótipos de baixa frequência e apenas dois haplótipos dominantes. Os resultados também revelaram que a expansão e crescimento populacional coincidem com a implementação e o aumento da área dos cultivos da soja no Brasil. Por outro lado, os índices de diversidade e o tempo de expansão semelhantes entre as populações do Sul, Sudeste e Centro-Oeste não possibilitam a inferência das rotas de dispersão histórica da espécie.

Palavras-chave: Broca-das-axilas-da-soja, *Crociosema aporema*, DNA *barcode*, Linhagem genética, Expansão populacional, Manejo de pragas

ABSTRACT

Identification and molecular philogeography of soybean bud borer (Lepidoptera: Tortricidae) from soybean fields in Brazil.

The soybean pod borer *Crociosema aporema* (Walsingham 1914) has recently gained attention due to its occurrence in soybean crops, where it is not historically reported. However, the increasing importance of pod borers as pests has brought to light the scarcity of information regarding the populations occurring in Brazil, which, together with the lack of standardization in the nomenclature adopted for the species, and the possible presence of other Tortricidae species in the crop, raises doubts about the identity of the pod borer present in soybeans in the country. In addition, the occurrence where it is not frequently found raises questions about the historical demography and phylogeography of this pest. Thus, our objectives were firstly to produce DNA barcode and evaluate the taxonomically important structures for the characterization of the specimens of pod borers collected in soybean areas in Brazil. Additionally, we estimated the population genetic diversity and demographic parameters for *C. aporema*, through the sequencing of two mitochondrial genes. The structures of the wings and genitals are in accordance with the original description for the species *C. aporema*. However, the genetic distance of 6% between individuals collected in Brazil and individuals collected in Costa Rica suggests the presence of distinct genetic lineages for *C. aporema* in the Americas, separated by at least 1.8 million years. Thus, we cannot rule out the possibility of the presence of cryptic species, morphologically very similar, occurring allopatrically in Brazil and Costa Rica, nor can we rule out the hypothesis of a single species. On the other hand, the population present in soybeans in Brazil is composed of a genetically uniform unit with diversity distributed homogeneously in space. This population has undergone a recent expansion process, with many low-frequency haplotypes and only two dominant haplotypes. The results also revealed that the population expansion and growth coincide with the implementation and increase of soybean crops in Brazil. On the other hand, the similar diversity indices and expansion time between the populations of the South, Southeast and Midwest do not allow for the inference of the historical dispersion routes of the species.

Keywords: Soybean bud borer, Soybean, *Crociosema aporema*, Barcode DNA, COI, Philogeography, Population expansion

INTRODUÇÃO GERAL

A broca-das-axilas-da-soja ou broca-dos-ponteiros-da-soja, são os nomes comuns no Brasil para a espécie *Crociosema aporema* (Walsingham 1914), (Lepidoptera: Tortricidae). Esta espécie foi alocada inicialmente dentro do gênero *Epinotia*, sendo posteriormente transferida para o *Crociosema* (RAZOWSKI; BECKER, 2017). As lagartas desse lepidóptero atacam plantas leguminosas da família Fabaceae, com destaque para amendoim, ervilha, grão-de-bico, feijão e a soja (IEDE, 1980). A broca-das-axilas geralmente ocorre entre o final da fase vegetativa e fase reprodutiva da planta causando poucos prejuízos à cultura (CORREA; SMITH, 1976; FOERSTER et al., 1983). A lagarta geralmente ataca a região das axilas, ponteiros e hastes em desenvolvimento, ou com menor frequência, flores e vagens. Por conta dos danos característicos à região das axilas da soja, é que recebe o nome de broca-das-axilas (CORREA; SMITH, 1976).

O ciclo de vida da broca-das-axilas é muito curto, e o tempo de desenvolvimento de ovo a adulto pode chegar a 30 dias. Em geral, uma fêmea adulta passa a copular a partir do segundo dia de escotofase, e pode colocar até 180 ovos individualizados sobre as folhas de soja (IEDE, 1980). Em laboratório, várias gerações podem ocorrer ao longo de um ano em um mesmo hospedeiro, geralmente em torno de quatro a cinco (ALTESOR et al., 2010; IEDE, 1980). Fatores biológicos e ambientais direcionam o tamanho populacional da broca-das-axilas, mas em geral, as maiores densidades se encontram nos meses mais quentes e ensolarados nas regiões mais ao Sul do Brasil (CORREA; SMITH, 1976). Contudo, o dano causado pela broca-das-axilas geralmente não compromete a produção e qualidade das sementes, podendo a planta tolerar um certo limite de dano (HAYASHIDA et al., 2022; SIQUEIRA; SIQUEIRA, 2012). Na cultura da soja, o nível de controle da lagarta foi inicialmente proposto para quando 30% dos brotos amostrados estão atacados (FOERSTER et al., 1983) mas estudos recentes sugerem que esse valor pode ser 50% pois o tipo de dano não compromete a produtividade final (HAYASHIDA et al., 2022)

Atualmente, a cultura da soja no Brasil ultrapassa 50 milhões de hectares (CONAB 2022), boa parte contendo a proteína inseticida Cry1Ac produzida pela bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (CATTELAN; AGNOLL, 2018). A proteína inseticida Cry1AC expressa pela variedade de soja MON 87701 × MON 89788 (Intacta RR2 PRO®), desde 2013/14 presente no país, têm como alvo as principais lagartas desfolhadoras da soja (HORIKOSHI et al., 2021a). Complementarmente, a soja transgênica também apresenta defesa contra certas

pragas não alvo, o que inclui a broca-das-axilas (BERNARDI et al., 2012). Contudo, em decorrência das mudanças na paisagem, intensificação agrícola e mudanças de manejo, o cenário das pragas da soja tem sido modificado e a preocupação com a evolução da resistência nas populações têm sido recorrentes (TABASHNIK; CARRIÈRE, 2017; HORIKOSHI et al., 2021a). Recentemente, houve relatos de ataque de broca-das-axilas sobre áreas de soja com a tecnologia *Bt* têm ocorrido, na região Sul e regiões ao norte do Sudeste brasileiro, bem como a presença da lagarta em Goiás e Minas (HORIKOSHI et al., 2021b). No entanto, pouco se sabe sobre a diversidade genética dessas populações ou ainda se pertencem a um único táxon ou a um complexo de espécies crípticas. Esse contexto justifica os estudos taxonômicos, demográficos e populacionais de *Crociosema aporema* em soja (HORIKOSHI et al., 2021b).

Os marcadores moleculares têm colaborado na identificação de espécies e caracterização de linhagens genéticas de insetos na paisagem agrícola (BEHURA, 2006). O uso dessa técnica tem contribuído na identificação de espécies principalmente nos casos em que os caracteres morfológicos importantes no reconhecimento taxonômico não são de separação óbvia dos táxons. Em mosca-branca, *Bemisia tabaci* (Gennadius 1989) marcadores nucleares e mitocondriais são importantes na separação e identificação das espécies que ocorrem em soja, no Brasil (FERNANDES et al., 2022). Por outro lado, em Noctuídeos, os marcadores moleculares têm auxiliado na distinção entre as espécies do gênero *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuídae) (GILLIGAN et al., 2015; LEITE et al., 2016). Além disso, os marcadores também têm auxiliado na identificação das linhagens genéticas, separando as linhagens norte e sul, do percevejo-marrom da soja *Euschistus heros* (Fabricius 1978) (SOARES et al., 2018), ou entre as raças milho e arroz das lagarta-do-cartucho-do-milho *Spodoptera frugiperda* (Smith 1797) (ARIAS et al., 2019).

A filogeografia procura investigar como a diversidade genética se distribui dentro de uma espécie ao longo do espaço geográfico e no tempo, estabelecendo as relações entre as proximidades genéticas e geográficas (LOWE et al., 2017). Para esses objetivos, parâmetros de diversidade populacional bem como estruturação são estimados, analisando a diversidade e distância genética, diversidade haplotípica (h), diversidade nucleotídica (π), além de sinais de estruturação entre os haplótipos ao longo do espaço geográfico (EXCOFFIER; LISCHER, 2000; ROZAS, 2017). De forma complementar, os estudos demográficos auxiliam no entendimento de como a diversidade observada pode ser decorrente de eventos de expansão, retração ou estagnação populacional, tanto em área, quanto no tamanho efetivo da população (ROGERS; HARPENDING, 1992). Assim, é possível compreender se a espécie se apresenta como uma unidade reprodutiva singular ao longo do espaço, ou se pode ser dividida em

diferentes unidades, ambas sendo influenciadas por eventos de expansão e ou retração populacional, ou sob diferentes pressões seletivas (FREELAND; KIRK, 2011).

Os estudos filogeográficos e filogenéticos para *C. aporema* são extremamente escassos, não só no Brasil, mas para toda a região Neotropical, impossibilitando a compreensão de como as populações estão distribuídas no espaço. Dessa forma, entender os parâmetros populacionais e ecológicos da broca-das-axilas, como demografia histórica, estrutura populacional, diversidade genética e fluxo gênico, podem auxiliar no manejo integrado dessa praga (ARIAS, et al., 2019; SILVA et al., 2020). Com esse intuito, indivíduos de broca-das-axilas, de diferentes regiões brasileiras produtoras de soja foram coletados, sequenciados para dois genes mitocondriais, e analisados quanto as questões taxonômicas, filogeográficas, de diversidade genética e demográficas das populações.

Referências

- ARIAS, O.; CORDEIRO, E.; CORRÊA, A. S.; DOMINGUES, F. A.; GUIDOLIN, A. S.; OMOTO, C. Population genetic structure and demographic history of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): implications for insect resistance management programs. **Pest Management Science**, v. 75, n. 11, p. 2948–2957, 2019.
- ALTESOR, P.; HORAS, V.R.; GARCIA, M.P.; ROSSINI, C.; ZARBIN, P. H. G.; GONZÁLEZ, A. Reproductive Behaviour of *Crociosema (=Epinotia) aporema* (Walsingham, 1914) (Lepidoptera: Tortricidae): Temporal Pattern of Female Calling and Mating. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 3, p. 324–329, 2010.
- BEHURA, S.K. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. **Molecular Ecology**, v. 15, pg. 3087–3113, 2006.
- BERNARDI, O. et al. Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701× MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatilis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Manag. Sci.** v. 68, 1083–1091, 2012.
- CATTELAN, A. J.; DALL’AGNOL, A. The rapid soybean growth in Brazil. **Oilseeds Fats Crops Lipids** 25, D102, 2018.
- CONAB—Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. v.7 - safra 2021/22 - n. 12 - Décimo segundo levantamento. <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4684-producao-de-graos-e-estimada-em-272-5-milhoes-de-toneladas-com-clima-favoravel-para-as-culturas-de-2-safra> (2022).

- CORREA, B. S.; SMITH, J. G. Ocorrência e danos de *Epinotia aporema* (Walsingham, 1914) (Lepidoptera: Tortricidae) em soja. **An. Soc. Entomol. Brasil**, v. 5, n. 1, p. 74–78, 1976.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, pg. 564–567, 2000.
- FERNANDES, D.S.; OKUMA, D.; PANTOJA-GOMEZ, L.; CUENCA, A.; CORRÊA, A.S. *Bemisia tabaci* MEAM1 ainda é a espécie dominante em cultivos a céu aberto no **Brasil**. **Braz. J. Biol.**, v. 84, 2022. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.256949>.
- FOERSTER, L. A.; IEDE, E. T.; SANTOS, B. B. Efeitos do ataque de *Epinotia aporema* (Walsingham, 1914) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) em diferentes períodos de desenvolvimento da soja. **An. Soc. Entomol. Brasil**, v. 12, n. 1, p. 53–59, 1983.
- GILLIGAN, T. M.; TEMBROCK, L. R.; FARRIS, R. E.; BARR, N. B.; VAN DER STRATEN, M. J.; VAN DE VOSSENBERG, B. T. L. H.; METZ-VERSCHURE, E. 2015. A multi-plex real-time PCR assay to diagnose and separate *Helicoverpa armigera* and *H. zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in the New World. *PLoS One*, v. 10, p. e0142912, 2015.
- FREELAND, J.; KIRK, H. *Molecular ecology*. 2nd ed., 1 ed. Oxford Hoboken, NJ: Oxford Wiley-Blackwell Hoboken, NJ, 2011.
- HAYASHI, J.-I.; TAGASHIRA, Y.; YOSHIDA, M. C. Absence of extensive recombination between inter- and intraspecies mitochondrial DNA in mammalian cells. *Experimental Cell Research*, v. 160, n. 2, p. 387–395, out. 1985. {<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014482785901855>>.
- HORIKOSHI, R.J.; DOURADO, P.M.; BERGER, G.U.; FERNANDES, D.S.; OMOTO, C.; WILLSE, A.; MARTINELLI, M.; HEAD, G.P.; CORRÊA, A.S. Large-scale assessment of lepidopteran soybean pest and efficacy of Cry1Ac soybean in Brazil. **Scientific Reports**, 11, 15956, 2021a.
- HORIKOSHI, R.J.; BERNARDI, O.; GODOY, D.N.; SEMEÃO, A.A.; WILLSE, A.; CORAZZA, G.O.; RUTHES, E.; FERNANDES, D.S.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; BUENO, A.F.; OMOTO, C.; BERGER, G.U.; CORRÊA, A.S.; MARTINELLI, S.; DOURADO, P.M.; GRAHAM H. Resistance status of lepidopteran soybean pests following large-scale use of MON 87701 × MON 89788 soybean in Brazil. **Scientific Reports**, 11, 21323, 2021b.

- IEDE, E.T. *Biologia de Epinotia aporema* (Walsingham,1914) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) e efeito de seu ataque em diferentes períodos de desenvolvimento da soja. 1980. LEITE, N.A.; PEREIRA, A.A; CORRÊA, A.S.; ZUCCHI, M.I.; OMOTO, C. Cross-species amplification and polymorphism of microsatellite loci in *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazilian cropping systems. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, 2016.
- LOWE, W. H.; KOVACH, R. P.; ALLENDORF, F. W. Population genetics and demography unite ecology and evolution. **Trends in Ecology; Evolution**, v. 32, n. 2, pg. 141–152, 2017.
- ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology; Evolution**, v. 9, pg. 552–569, 1992.
- ROZAS, J. et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 12, p. 3299–3302, 2017. {<http://academic.oup.com/mbe/article/34/12/3299/4161815>}.
- SILVA, C. S.; CORDEIRO, E.M. G.; PAIVA, J.B.; DOURADO, P.M.; CARVALHO, R.A.; HEAD, G.; MARTINELLI, S.; CORREA, A.S. Population expansion and genomic adaptation to agricultural environments of the soybean looper, *Chrysodeixis includens*. **Evolutionary Applications**, v. 13, n. 8, p. 2071–2085, 2020. DOI: 10.1111/eva.12966.
- SIQUEIRA, P.R.E.; SIQUEIRA, P.R.B. Incidência de danos da broca dos ponteiros em diferentes genótipos de soja. **Ciência Rural**, v. 42, n. 12, p. 2120–2126, 2012.
- SOARES, P. L. et al. The reunion of two lineages of the Neotropical brown stink bug on soybean lands in the heart of Brazil. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2496, 6 dez. 2018. {<http://www.nature.com/articles/s41598-018-20187-6>}.
- TABASHNIK, B.E.; CARRIÈRE, Y. Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nature**, 2017. DOI: 10.1038/nbt.3974.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Aspectos bioecológicos de *Crociosema aporema*

A lagarta de *C. aporema* (Walsingham 1914) (Lepidoptera: Tortricidae) popularmente conhecida como broca-das-axilas ou broca-dos-ponteiros-da-soja, recebe esse nome devido a característica de causar danos nos ponteiros, brotos e axilas das folhas de seus hospedeiros (CORREA; SMITH, 1976). O ciclo de vida da broca-das-axilas se inicia com a fase de ovo, passando por diferentes instares na fase de lagarta, pupa e finalizando na fase adulta. Os ovos levam cerca de 5 dias para se desenvolver em temperaturas de 23°C, e são geralmente depositados de forma individual sobre o pecíolo, nós e inter-nós das plantas hospedeiras (IEDE, 1980).

No primeiro instar, as lagartas da broca-das-axilas se alimentam do limbo foliar, das gemas e brotos, formando galerias entre as folhas novas. À medida que cresce, a lagarta junta as extremidades da folha jovem e macia de seu hospedeiro, unindo-as com seda, formando um “rolinho de folhas” próximos a região de brotação da planta, onde passa a se alimentar e se abrigar nos instares seguintes. Quando a lagarta atinge estádios mais avançados, o cartucho em que se abriga apodrece e a lagarta desce para a região das axilas das folhas, penetrando o caule e se alimentando das hastes (CORREA; SMITH, 1976). Vale destacar que a maior ocorrência da praga na região da haste se deve a diminuição do número de brotos presentes na soja, região preferida da broca-da-axilas (SANTOS, 1978). O tempo de desenvolvimento da fase de lagarta leva em torno de 15 a 20 dias sob 23°C para se completar (IEDE, 1980 SOSA-GOMES et al., 2014). As larvas são esbranquiçadas, podendo apresentar tons esverdeados ou amarelados. A capsula cefálica da lagarta nos instares iniciais é pequena e preta, passando a marrom e adquirindo uma faixa específica na parte lateral da cabeça, a partir do terceiro instar (GILLIGAN; PASSOA, 2014; GILLIGAN; EPSTAIN, 2014). Com tamanho diminuto, as lagartas crescem até atingir em torno de 9 a 15 mm de comprimento, e entram no estágio de pupa. Algumas estruturas morfológicas permitem a identificação e reconhecimento das lagartas, como a posição das cerdas abdominais a forma e posição dos crochets, estruturas esclerotizadas na ponta dos falsos pés abdominais (pseudópodes) das lagartas. Os crochets são uni-seriais, bi-ordinais, dispostos em círculo, contendo entre 30 e 40 crochets em cada falsa perna abdominal (GILLIGAN; PASSOA, 2014; GILLIGAN; EPSTAIN, 2014).

Os adultos são pequenos, variando entre 13 e 16 mm de comprimento, geralmente acinzentados e amarronzados, com pequenas manchas claras nas asas anteriores e com hábitos

noturnos (GILLIGAN; PASSOA, 2014; GILLIGAN; EPSTAIN, 2014). As cópulas ocorrem entre o segundo e sétimo dia da escotofase, em que as fêmeas raramente acasalam mais de uma vez, o que sugere um comportamento monândrico, para a espécie (ALTESOR et al., 2010). Vale ressaltar que no primeiro dia de escotofase os adultos não copulam e nenhum comportamento de dispersão ativa no primeiro dia após a emergência foi observado (ALTESOR et al., 2010). Além disso, uma fêmea adulta pode colocar seus ovos a partir do quarto dia após a emergência, podendo efetuar a oviposição de 180 ovos em média, com viabilidade média de 78% (SOSA-GOMES et al., 2014). Em geral os machos vivem um pouco mais do que as fêmeas, ambos atingindo por volta de 20 a 25 dias de duração na fase adulta (ALTESOR et al., 2010).

Ao longo de um ano, muitas gerações podem ocorrer no campo, mas geralmente entre 4 e 6 gerações por ano (CORRÊA; SMITH, 1976). Os adultos e lagartas coexistem em uma mesma localização no mesmo intervalo de tempo, havendo sobreposição de ciclos (ALTESOR et al., 2010). O tempo de vida de uma geração varia por volta de 30 a 46 dias, a partir do ovo, sob temperatura entre 21 e 23°C (SOSA-GOMES et al., 2014). Assim, os períodos mais quentes, entre setembro e abril, são mais favoráveis para o desenvolvimento da população da broca, que tem sua faixa de desenvolvimento ótimo próximo aos 25°C (CORRÊA; SMITH, 1976).

A broca-das-axilas se alimenta de plantas nativas e cultivadas, dentre as quais se destacam o amendoim (*Arachis hypogaea* L.), a alfafa (*Medicago sativa* L.), o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), o grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.), a lentilha (*Lens culinaris* Medikus), ervilha (*Pisum sativum* L.) e a soja (*Glycine max* L. Merril) (SOSA-GOMES et al., 2014). As lagartas dessa espécie têm preferência por leguminosas e geralmente atacam as regiões das gemas, pecíolos, caules e eventualmente botões florais ou vagens (FOERSTER et al., 1983).

Alguns fatores culturais, como por exemplo, a plantação da soja logo após o feijão, ou sucessão de semeadura de outras leguminosas de forma mais tardia favorecem a broca-das-axilas, que aproveita os hospedeiros para continuar seu ciclo de vida (FOERSTER et al., 1983). A densidade populacional geralmente atinge o máximo crescimento no final da fase vegetativa, permanecendo em menor densidade nas fases reprodutivas, com lagartas de instares mais avançados e atacando principalmente as axilas da planta (SANTOS, 1978). Nas primeiras gerações, a praga ocorre em plantas cultivadas de menor importância, ou plantas daninhas. Já nas gerações seguintes, a praga geralmente se expande para a cultura da soja (FOERSTER et al., 1983).

A ocorrência e densidade da praga são diretamente influenciadas por condições meteorológicas anuais e fatores culturais. Essas condições também determinam o status de preocupação da praga e sua ocorrência estacional (SOSA-GOMES et al., 2014). Rotações de cultura, datas de semeadura, práticas culturais, ou mesmo temperaturas de frio ou calor mais extremos, podem reduzir as populações, impactar os hospedeiros naturais, afetar a sobrevivência e conseqüentemente a manutenção da densidade populacional da broca-das-axilas, modificando o tamanho populacional inicial na soja (SOSA-GOMES et al., 2014). Acreditava-se que o momento da semeadura, ou mesmo o tempo de desenvolvimento das variedades de soja fosse determinante no tamanho populacional da broca, que teria preferência por variedades tardias. Entretanto verificou-se que algumas variedades de soja são atacadas mais próximo das fases iniciais, enquanto outras nas fases finais e que esse fato pode estar ligado às condições ambientais e/ou respostas fisiológicas das diferentes cultivares (SIQUEIRA; SIQUEIRA, 2012).

1.2. Uma emergente praga de soja no Brasil

Os registros de broca-das-axilas no Brasil se iniciaram a partir de 1960, na região do Rio Grande do Sul, em que a praga estaria atacando a cultura do feijão, alfafa, e a soja, apesar de ser uma espécie nativa (BIEZANKO, 1961). Até que na década de setenta, os pesquisadores passaram a registrar surtos de populações de *Crociosema* sob à soja na região do Paraná, colocando-a como uma das principais pragas da cultura (CORRÊA, 1974; CALDERON, 1976). Parte da importância de *C. aporema* na soja esteve ligada à expansão da cultura, colocando algumas pragas olífagas associadas a família das leguminosas, ex. a broca-das-axilas, como foco dos estudos (GAZZONI, 1977; GUILLEN, 1977; SANTOS, 1978; IEDE, 1980). Os registros de distribuição e ocorrência da espécie *C. aporema* apenas foram até então concentrados nas regiões do Rio Grande do Sul e Paraná, se referindo a recente importância da espécie como praga (GAZZONI, 1977; GUILLEN, 1977; SANTOS, 1978; IEDE, 1980; FOERSTER, 1983; SIQUEIRA & SIQUEIRA, 2012). Após 1990, os registros da praga diminuíram, em partes pela melhora e adoção de técnicas de manejo para a cultura da soja, incluindo a utilização do feromônio para o monitoramento da espécie (GONZÁLES et al., 2012), emprego de variedades mais resistentes (PEREYRA & SNACHEZ, 1998), até mesmo o estabelecimento de níveis de controle para a lagarta (FOERSTER et al., 1982), o que pode ter resultado na diminuição de estudos e registros de ocorrência da praga.

A presença da broca nos cultivos de soja pode ser identificada pelos danos nas regiões das axilas foliares, folhas encarquilhadas e os abrigos feitos pelas lagartas com seda (SOSA-GOMES et al., 2014). O controle da broca-das-axilas é indicado quando seu nível populacional atinge 30% dos brotos amostrados contendo a praga. Assim, a presença da lagarta abaixo dessa quantidade não se caracteriza como um problema, uma vez que as plantas conseguem suportar os danos da lagarta e manter a produtividade, com a baixa densidade populacional da praga (SIQUEIRA E SIQUEIRA, 2012). Porém, ainda que a broca-das-axilas não se equipare as lagartas desfolhadoras da soja, altas infestações, principalmente em momentos mais iniciais, podem levar a deficiência no crescimento das plantas, aumentar o perfilhamento, prejudicar a floração e impactar a produção e qualidade dos grãos, exigindo controle populacional (SOSA-GOMES et al., 2014).

Em um estudo experimental, a alta infestação do inseto levou a redução da produtividade em mais de 25%, por exemplo, na variedade de soja *C.v. Clark*, até o final da fase de florescimento, quando os ataques se iniciaram na fase vegetativa (SIQUEIRA; SIQUEIRA, 2012). Desse modo, os prejuízos à cultura podem ser preocupantes caso haja entre 40 e 50% das plantas atacadas (SOSA-GOMES et al., 2014). Esse cenário pode se intensificar em certos casos, por exemplo, quando em stress hídrico, possivelmente levando a danos mais severos (SOSA-GOMES et al., 2014). Ademais, seu hábito de formar um abrigo, com folhas e seda onde pode se esconder, dificulta seu controle, tanto químico, quanto a ação de inimigos naturais (LILJESTHRÖM; FAJARDO, 2005).

Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores de soja do mundo, vivenciando uma crescente na produtividade e na extensão das áreas (CONAB 2020). O aumento dessa produção se deve em partes pela expansão da soja a partir da região sul para novas regiões, como por exemplo o Centro-Oeste brasileiro, em áreas de cerrado e pela adoção de novas técnicas de cultivo, como a tecnologia *Bt* (CATTELAN; AGNOLL, 2018). A adoção da tecnologia transgênica *Bt* contendo a proteína inseticida Cry1AC, especialmente pela variedade MON 87701 × MON 89788 (Intacta RR2 PRO®) desde 2013/14 no país, também foi um dos fatores importantes na mudança de manejo e expansão da soja (HORIKOSHI et al., 2021a).

A soja que expressa a proteína Cry1AC tem demonstrado eficiência contra os danos causados pelas principais lagartas da cultura, como *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Erebidae), *Chrysodeixis includens* (Walker [1858]), *Chloridea virescens* (Fabricius, 1777) e *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (BERNARDI et al., 2012). Mas, além das pragas-alvo, a tecnologia também pode afetar pragas não-alvo, incluindo como

exemplo a *C. aporema* (BERNARDI et al., 2012; HAYASHIDA et al., 2022). Conseqüentemente, o emprego dessa tecnologia tem mantido essas populações sob controle e em menores densidades populacionais (HORIKOSHI et al., 2021a). Subjacente a isso, em áreas com adoção da tecnologia transgênica, pragas secundárias ou não-alvo podem ganhar importância, exigindo muitas vezes atenção e controle (HORIKOSHI et al., 2021a).

Nos últimos dois anos, houve relatos de falha no controle de broca-das-axilas em campos de soja *Bt* contendo a proteína inseticida Cry1Ac (HORIKOSHI et al., 2021b). Aparentemente a evolução dessa resistência na broca-das-axilas pode estar ligada à sua biologia, intensificada pela forte pressão de seleção, sob seu ciclo de vida curto (HORIKOSHI et al., 2021b). Porém, não se sabe o quão semelhantes essas populações, oriundas dos locais com menor susceptibilidade à tecnologia, são em comparação com aquelas comumente identificadas, ou se essas populações estão melhor se adaptando à soja transgênica, ou ainda se são espécies crípticas. Desse modo, ainda que a ocorrência e densidade populacional de *C. aporema* não sejam expressivas sendo a praga mais restrita a região Sul do Brasil, entender melhor os parâmetros populacionais dessa praga e a forma como ela está se adaptando às tecnologias disponíveis no campo pode auxiliar táticas de manejo futuras para a cultura (HORIKOSHI et al., 2021b). Vale reforçar que o cenário de ocorrência das pragas da soja no Brasil tem se alterado nos últimos anos, e populações que se apresentam mais suscetíveis hoje, podem variar na frequência da resistência às tecnologias empregadas e se tornar maiores problemas no futuro (HORIKOSHI et al., 2021a).

A evolução da resistência à proteína *Bt* nas populações tem sido apontada como uma das maiores preocupações para a falha da tecnologia de plantas transgênicas (FARIAS et al., 2014). Nesse sentido, o conhecimento sobre os parâmetros populacionais das pragas é de extrema importância, uma vez que auxilia no desenvolvimento de táticas para a manutenção de insetos suscetíveis na população (TABASHNIK; CARRIÈRE, 2017). Assim, a presença de populações estruturadas no espaço, pode exigir diferentes estratégias de manejo e sobretudo maior conhecimento ecológico e demográfico das pragas.

1.3. Diversidade genética, filogeografia e estrutura populacional

O domínio das técnicas moleculares e do estudo do DNA dos organismos ampliaram a abordagem e entendimento dos estudos ecológicos (FREELAND; KIRK, 2011; PORTER; HAJIBABAEI, 2018; ZUCCHI et al., 2019). Essas inovações científicas revolucionaram o

modo como análises de migração, fluxo gênico, invasões biológicas, padrões demográficos de uma população, e diversas outras abordagens ecológicas são estudadas (AVISE, 2000; MANDAL et al., 2014). Entretanto, o acesso a informações moleculares dos organismos exige primeiramente o uso de marcadores moleculares, porções do DNA ou proteínas que apresentam variações intraespecíficas, ou seja, polimorfismos (FREELAND; KIRK, 2011). Essas variações podem ser fruto de mutações, inversões, deleções, que alterem as sequências nucleotídicas e podem ser herdáveis (FREELAND; KIRK, 2011).

Um exemplo de marcador molecular é o DNA mitocondrial, presente nas mitocôndrias dos organismos eucariotos. O DNA mitocondrial é formado por um único cromossomo circular, mais simples do que o nuclear, com alta densidade gênica, sem a presença de alelos, sem recombinação e sem duplicações gênicas, como nos cromossomos nucleares (HAYASHI et al., 1985; AVISE, 2000; FREELAND; KIRK, 2011; MANDAL et al., 2014). Mesmo assim, devido ao código genético degenerado, ainda menos específico nas mitocôndrias, e a menor eficiência na reparação do material genético, o DNA mitocondrial pode acumular mutações ao longo do tempo a uma taxa relativamente rápida quando comparada ao DNA nuclear, sem sofrer ação direta da seleção natural, pois essas mutações são na maior parte silenciosas, não deletérias. Assim, é possível se rastrear um histórico das linhagens de um organismo a partir desses polimorfismos, por esse acúmulo de mutações ao longo do tempo evolutivo (AVISE, 2000; FREELAND; KIRK, 2011; LOWE, 2017).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos a partir do DNA mitocondrial, devido a essa alta variabilidade intraespecífica e interespecífica (CHOUPINA; MATINS, 2015). Relações filogenéticas podem ser investigadas devido à similaridade no genoma, em que organismos próximos geneticamente apresentam menos mutações divergentes acumuladas ao longo da evolução do que os indivíduos mais distantes (AVISE et al., 1987). Nessa mesma lógica, uma região específica do DNA mitocondrial, a porção do *citocromo c oxidase subunidade I*, foi definida como DNA *barcode*, e pode auxiliar na separação e distinção de espécies, pelos polimorfismos característicos que cada uma apresenta (HEBERT, et al. 2003). A mesma lógica pode ser aplicada para dentro de uma mesma espécie, onde os organismos mais próximos geneticamente, compartilham menos diferenças nucleotídicas entre si em seus genes mitocondriais. Contudo, uma vez que o DNA mitocondrial não está sobre a ação direta da seleção natural, a deriva genética é a principal responsável pela variabilidade desse genoma e, portanto, o marcador mitocondrial permite inferências filogeográficas associadas a eventos de deriva genética e expansão populacional (NEIMAN; TAYLOR, 2009; FREELAND; KIRK, 2011).

A diversidade genética em uma população depende diretamente das forças evolutivas de deriva genética e seleção natural que agem de forma distinta nas populações de uma espécie, espalhadas em um espaço geográfico ao longo do tempo (FREELAND; KIRK, 2011; LOWE, 2017). Dentro disso, certos fenômenos naturais e biológicos podem resultar na diminuição da diversidade genética em uma população, como o fluxo gênico, pressão de seleção local, tipo de reprodução, e histórico da população. Como exemplo, uma espécie que chega a um novo local onde não ocorria pelo simples efeito da deriva, dá início a uma população com uma baixa diversidade genética (SLATKIN, 1987). Por outro lado, o isolamento entre populações, a distância geográfica, eventos estocásticos, diferenças nas interações bióticas e ambientais, e o espaço geográfico em si, podem ampliar a diversidade e distância genética entre populações (SLATKIN, 1993). Nesse contexto, a filogeografia busca entender como se dá a distribuição espacial, geográfica, dos grupos filogenéticos e haplótipos, dentro de uma espécie e as relações de proximidade entre esses haplótipos (LOWE et al., 2017).

Os índices como diversidade haplotípica (h) (NEI, 1987), diversidade nucleotídica (π) (ROZAS et al., 2017), o número de diferenças nucleotídicas, o índice de endogamia (F_{st}), podem auxiliar na estimativa da diversidade genética dentro e entre certos grupos ou locais geográficos (ROZAS et al., 2017). Já as estimativas da distância genética (*pairwise distance*), a estruturação das populações pela análise de variância molecular AMOVA, os parâmetros de heterozigotidade entre populações, dentro de populações e entre indivíduos dentro das populações, são exemplos de cálculos que auxiliam na investigação de como a diversidade está sendo distribuída no espaço geográfico (TAJIMA, 1989; FU, 1997; EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Adicionalmente, as relações entre esses indivíduos, haplótipos, pode ser realizada através da análise filogenética bayesiana ou análise network (OLIVEIRA et al., 2013).

Além das inferências mencionadas, a maneira como os grupos filogenéticos estão distribuídos ao longo do espaço também se relaciona ao histórico da população. Portanto, é essencial compreender também os processos demográficos envolvidos, como retração ou expansão populacional, se recente ou não (ROGERS; HARPENDING, 1992; LOWE et al., 2017). Os diferentes índices demográficos tomam por base a abundância ou escassez de alelos raros na população (nesse caso, haplótipos), as distâncias genéticas e as diversidades haplotípica e nucleotídica para checar se a população está em expansão, retração, ou

equilíbrio, tanto em tamanho populacional, quanto em área (WRIGHT, 1951; TAJIMA, 1989; ROGERS; HARPENDING, 1992; FREELAND; KIRK, 2011).

A interação entre os resultados filegeográficos e demográficos permitem assim inferir: se a população forma uma única unidade populacional; ou se essas populações se estruturam no espaço; se a população está passando por eventos estocásticos significativos; expansão para novas áreas ou regiões; se o aparecimento das linhagens encontradas se deu de forma recente ou mais antiga (WRIGHT, 1951; SLATIKIN, 1987, 1983; FREELAND; KIRK, 2011).

1.4. Estudos filogeográficos e demografia populacional de insetos-praga no Brasil

No Brasil, os estudos ecológicos moleculares têm contribuído para a compreensão das populações de espécies de importância econômica, e em última análise, auxiliado no manejo dessas populações (ARIAS et al., 2019). Boa parte das lagartas de importância agrícola, em especial que atacam soja, não apresentam estruturação nem por hospedeiro nem por região geográfica. Em *S. frugiperda*, os estudos de filogeografia confirmaram a presença das linhagens referidas como milho e arroz, no Brasil, sem, contudo, revelar estruturação por hospedeiro ou distância, e reforçaram a hipótese de que os haplótipos predominantes dentro de cada linhagem surgiram antes do cultivo de seus hospedeiros no país (MARTINELLI et al., 2007; ARIAS et al., 2019). Resultados semelhantes foram encontrados para *Helicoverpa armigera* (Hubner 1808), *Chloridea virescens* (Fabricius 1777) e *Chrysodeixis includens* (Walker 1858) (ALBERNAZ et al., 2012; LEITE et al., 2014; GONÇALVES et al., 2019; SILVA et al., 2020).

No caso da *H. armigera*, a falta de estruturação foi atribuída principalmente a invasão e expansão no território brasileiro num tempo extremamente curto, com o aumento populacional ocorrendo sob baixa diversidade de haplótipos (LEITE et al., 2014; GONÇALVES et al., 2019). Já para *Cl. virescens* e *Ch. includens*, acredita-se que a capacidade de dispersão e principalmente a recente expansão populacional, acompanhou a expansão agrícola, levando a uma população com características filogenéticas homogêneas, sem estruturação entre os haplótipos (ALBERNAZ et al., 2012). Isso tem implicações diretas no manejo pois indica uma conexão entre as subpopulações independente da cultura ou local. Consequentemente, ações fitossanitárias para a espécie em uma dada cultura, como a soja, também podem afetar outras culturas, como exemplo o algodão, independente da localidade (ALBERNAZ et al., 2012; ARIAS et al., 2019). Vale ressaltar que essas espécies de lagartas

mencionadas tiveram grande impacto com a expansão agrícola no Brasil, sobretudo em relação a expansão da soja e do algodão substratos para o crescimento demográfico populacional dessas espécies de pragas.

Para *A. gemmatalis*, SOSA-GOMEZ (2004a) estudou a variabilidade genética intraespecífica envolvendo quatro regiões Brasileiras, uma região da Argentina e uma região dos EUA. Houve baixa variabilidade intraespecífica, sugerindo se tratar de uma população homogênea, composta por indivíduos migrantes e não migrantes. Vale destacar que houve alta similaridade entre as populações do Paraná, com uma população amostrada nos EUA sugerindo conexão entre elas (SOSA-GOMEZ, 2004a). Entretanto, além da baixa amostragem utilizada, os estudos com RAPD não são muito precisos e os resultados precisam ser interpretados com cuidado. Isso reflete o quão escasso são os dados de filogeografia e estrutura populacional para muitas espécies praga presentes no Brasil, sendo os poucos estudos envolvendo principalmente métodos antigos e pouco precisos.

Outro estudo sugeriu que as populações de *E. heros* estavam estruturadas geograficamente, e que a baixa no fluxo gênico poderia ser fruto da pouca mobilidade do inseto (SOSA et al., 2004b). Entretanto, SOARES et al. (2018) descobriram que se tratava de duas linhagens, uma Norte outra Sul, com distanciamento genético comparáveis a espécies crípticas, isoladas pelo menos há 3 milhões de anos atrás, muito antes da soja chegar ao Brasil. Essas divergências podem ter resultados e implicações em termos de manejo, pois ao contrário de uma população única e homogênea, populações geograficamente isoladas podem se comportar de maneira distinta (SOARES et al., 2018).

Até o momento, estudos envolvendo a diversidade genética, demografia populacional ou qualquer outro assunto dentro dessa abordagem para *C. aporema* no Brasil são inexistentes. Por outro lado, o emprego da espécie *Crociosema aporema* tem sido substituído por *C. opposita* em trabalhos de importância taxonômica o que cria dúvidas a respeito da real identidade da espécie. Portanto, o presente trabalho tem por objetivo gerar a região do DNA Barcode para as populações de *C. aporema* que estão ocorrendo no Brasil, estudar a filogeografia e demografia histórica dessas populações.

Referências

- ALBERNAZ, K. C.; SILVA-BRANDÃO, K. L.; FRESIA, P.; CÔNSOLI, F. L.; OMOTO, C. Genetic variability, and demographic history of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Brazil inferred by mtDNA sequences. **Bulletin of Entomological Research**, v. 102, n. 3, p. 333–343, 2012.
- ARIAS, O.; CORDEIRO, E.; CORRÊA, A. S.; DOMINGUES, F. A.; GUIDOLIN, A. S.; OMOTO, C. Population genetic structure and demographic history of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): implications for insect resistance management programs. **Pest Management Science**, v. 75, n. 11, p. 2948–2957, 2019.
- AVISE, J. C. et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, n. 1, p. 489–522, 1987. {<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.es.18.110187.002421>}.
- AVISE, J. C. Phylogeography the history and formation of species. Cambridge, Mass. London: Cambridge, Mass. Harvard University Press London, 2000.
- BERNARDI, O. et al. Assessment of the high-dose concept and level of control provided by MON 87701× MON 89788 soybean against *Anticarsia gemmatalis* and *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Manag. Sci.** 68, 1083–1091, 2012.
- BIEZANKO, C.M. (1961). Olethreutidae, Tortricidae, Phalonidae, Aegeriidae, Glyphipterygidae, Yponomeutidae, Gelechiidae, Oecophoridae, Xylorictidae, Lithocolletidae, Cecidoseidae, Ridiashinidae, Acrolophidae, Tineidae e Psychidae da zona sueste do Rio Grande do Sul. **Arquivos de Entomologia da Escola de Agronomia Eliseu Maciel**, Série A, p.1-16.
- CATTELAN, A. J.; DALL'AGNOL, A. The rapid soybean growth in Brazil. *Oilseeds Fats Crops Lipids* 25, D102, 2018.
- CHOUPINA, A.; MARTINS, I. Molecular markers for genetic diversity, gene flow and genetic population structure of freshwater mussel species. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 3 suppl 1, p. s167–s170, 2015.
- CHORLANGO, M. P. L. Contribución al estudio de la familia Tortricidae Latreille, 1803 (lepidoptera), con especial referencia a la fauna Neotropical. Tesis Doctoral. [s.l: s.n.]. 2015.
- CLARKE, J. F. G. The correct name for a pest of legumes. [s.l: s.n.]. **Entomological Society Washiton**, v.56, n.6, p. 309-310, 1954.

- CORREA, B. S.; SMITH, J. G. Ocorrência e danos de *Epinotia aporema* (WALSINGHAM, 1914) (Lepidoptera: Tortricidae) em soja. **ANAIS da S.E.B.**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 74–78, 1976.
- CONAB—Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos. V.7 - SAFRA 2019/20 - N. 12 - Décimo segundo levantamento. {<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>} (2020).
- CORRÊA, B.S.; SMITH, J.G. Ocorrência e danos de *Epinotia aporema* (Walsingham, 1914) Lepidoptera: Tortricidae em soja. **Anais da S.E.B.**, v (5), n. 1, pg. 74-78, 1976.
- FARIAS, J. R. et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Prot.** 64, 150–158, 2014.
- FOERSTER, L. A.; IEDE, E. T.; SANTOS, B. B. Efeitos do ataque de *Epinotia aporema* (Walsingham, 1914) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) em diferentes períodos de desenvolvimento da soja. **An. Soc. Entomol. Brasil**, v. 12, n. 1, p. 53–59, 1983.
- FREELAND, J. AND KIRK, H. Molecular ecology. 2nd ed., 1 ed. Oxford Hoboken, NJ: Oxford Wiley-Blackwell Hoboken, NJ, 2011.
- FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, n. 2, p. 915–925, 1997.
- GUILLEN, E. E. A. Efeito de inseticidas sobre as pragas da soja e seus predadores. Curitiba, 1977
- GILLIGAN TM, PASSOA SC, LepIntercept—An identification resource for intercepted Lepidoptera larvae. Identification Technology Program (ITP), Fort Collins, CO. {<http://idtools.org/id/leps/lepintercept/key.html>} (2014).
- GILLIGAN, T. M. AND EPSTEIN, M. E. Tortricids of Agricultural Importance: *Crociosema aporema*. United States Department of Agriculture, Colorado State University. 2014 http://idtools.org/id/leps/tortai/Crociosema_aporema.html.
- GILLIGAN, T. M.; TEMBROCK, L. R.; FARRIS, R. E.; BARR, N. B.; VAN DER STRATEN, M. J.; VAN DE VOSSENBERG, B. T. L. H.; METZ-VERSCHURE, E. 2015. A multi-plex real-time PCR assay to diagnose and separate *Helicoverpa armigera* and *H. zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in the New World. PLoS One, v. 10, p. e0142912, 2015.
- GREGORY, B. M.; JOHNSON, S. J.; LIEVENS, A. W.; HAMMOND, A. M. JR.; SALINAS, A. D. A Midlatitude Survival Model of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Entomological Society of America**, v. 19, n. 4, 1017-1023, 1990.

- HAYASHI, J.-I.; TAGASHIRA, Y.; YOSHIDA, M. C. Absence of extensive recombination between inter- and intraspecies mitochondrial DNA in mammalian cells. **Experimental Cell Research**, v. 160, n. 2, p. 387–395, out. 1985. {<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014482785901855>>.
- HEBERT, P. D. N., A. CYWINSKA, S. L. Ball and J. R. de WAARD. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*. 270: 313–321.
- HORIKOSHI, R.J., DOURADO, P.M., BERGER, G.U., FERNANDES, D.S., OMOTO, C., WILLSE, A., MARTINELLI, M., HEAD, G.P., CORRÊA, A.S. Large-scale assessment of lepidopteran soybean pest and efficacy of Cry1Ac soybean in Brazil. **Scientific Reports**, 11, 15956, 2021a.
- HORIKOSHI, R.J., BERNARDI, O., GODOY, D.N., SEMEÃO, A.A., WILLSE, A., CORAZZA, G.O., RUTHES, E., FERNANDES, D.S., SOSA-GÓMEZ, D.R., BUENO, A.F., OMOTO, C., BERGER, G.U., CORRÊA, A.S., MARTINELLI, S., DOURADO, P.M., GRAHAM H. Resistance status of lepidopteran soybean pests following large-scale use of MON 87701 × MON 89788 soybean in Brazil. **Scientific Reports**, 11, 21323, 2021b.
- JI, Y.-J.; ZHANG, D. X.; HE, L.-J. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 581–585, 2003.
- KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.
- LEITE, N.A.; PEREIRA, A.A.; CORRÊA, A.S.; ZUCCHI, M.I.; OMOTO, C. Cross-species amplification and polymorphism of microsatellite loci in *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazilian cropping systems. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, 2016.
- LILJESTHRÖM, G.; ROJAS-FAJARDO, G. Parasitismo larval de *Crociosema* (= *Epinotia*) *aporema* (Lepidoptera: Tortricidae) en el noreste de la provincia de Buenos Aires (Argentina). **Rev. Soc. Entomol. Arg.**, v. 64, n. 2, pg. 37-44, 2005.
- LOWE, W. H.; KOVACH, R. P.; ALLENDORF, F. W. Population genetics and demography unite ecology and evolution. **Trends in Ecology; Evolution**, v. 32, n. 2, pg. 141–152, 2017.

- MANDAL, S. De; CHHAKCHHUAK, L.; GURUSUBRAMANIAN, G.; KUMAR, N. S. Mitochondrial markers for identification and phylogenetic studies in insects – A Review. *DNA Barcodes*, v. 2, n. 1, 2014.
- MARTINELLI, S.; CLARK, P.L.; ZUCCHI, M.I.; SILVA-FILHO, M.C.; FOSTER, J.E.; OMOTO, C. Genetic structure, and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. **Bull. of Entomo. Res.**, v. 97, p. 225-231, 2007
- MOREY, C.S. Biología y morfología larval de *Epinotia aporema* (Wals. 1914)(Lepidoptera: Oletreutidae). Montevideo, **Univ. Rep. Fac. Agron.**, 14, p. 123, 1972.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceed. of the Nation. Acad. of Scien. of the USA*, v. 70, p. 3321–3323.
- NEIMAN, M.; TAYLOR, D. R. The causes of mutation accumulation in mitochondrial genomes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 276, n. 1660, p. 1201–1209, 2009.
- OLIVEIRA, M.R.C.; CORRÊA, A.S.; SOUZA, G.A.D.; GUEDES, R.N.C.; OLIVEIRA, L.O. Mesoamerican Origin and Pre- and Post-Columbian Expansions of the Ranges of *Acanthoscelides obtectus* Say, a Cosmopolitan Insect Pest of the Common Bean. *PLoS ONE* 8(7): e70039. 2013.
- PORTER, T.M.; HAJIBABAEI, M. Scaling up: A guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. **Molecular Ecology**, v. 27, p. 313–338, 2008.
- ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology; Evolution**, v. 9, pg. 552–569, 1992.
- ROZAS, J. et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 12, p. 3299–3302, 1 dez. 2017. {<http://academic.oup.com/mbe/article/34/12/3299/4161815>>.
- SANTOS, B. B. Manejo dos insetos-praga da soja no Centro-Sul do Paraná, p. 26-80, 1978.
- SILVA, C.S.; CORDEIRO, E.M.G.; PAIVA, J.B.De.; DOURADO, P.D.; CARVALHO, R.A.; HEAD, G.; MARTINELLI, S.; CORREA, A.S. Population expansion and genomic adaptation to agricultural environments of the soybean looper, *Chrysodeixis includens*. **Evolutionary Applications**, v. 13, n. 8, p. 2071-2085, 2020
- SIQUIERA, P.R.E.; SIQUEIRA, P.R.B. Incidência de danos da broca-dos-ponteiros em diferentes genótipos de soja. **Ciência Rural**, v. 42, n. 12, pg. 2120-2126, 2012.

- SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v. 236, n. 4803, p. 787–792, 15 maio 1987. {<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.3576198>}.
- SLATKIN, M. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. **Evolution**, v. 47, n. 1, p. 264, fev. 1993. {<https://www.jstor.org/stable/2410134?origin=crossref>}.
- SOARES, P. L. et al. The reunion of two lineages of the Neotropical brown stink bug on soybean lands in the heart of Brazil. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2496, 6 dez. 2018. {<http://www.nature.com/articles/s41598-018-20187-6>}.
- SOSA-GÓMEZ, D. R. Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 3, p. 378–384, 2004a.
- SOSA-GOMEZ, D.R.; DELPIN, K. E.; ALMEIDA, A.M.R.; HIROSE, E. Genetic Differentiation among Brazilian Populations of *Euschistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) Based on RAPD Analysis. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 2, p. 179–187, 2004b.
- SOSA-GÓMEZ, D. R. et al. Manual de Identificação de Insetos e Outros Invertebrados da Cultura da Soja (Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E), 2014.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 585–595, 1989. {<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6374681>}.
- TABASHNIK BE AND CARRIÈRE Y, Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nat Biotechnol**, 35:926–935, 2017.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, v. 15, n. 1, p. 323–354, 1951. {<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x>}.

2. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DA BROCA-DAS-AXILAS EM SOJA NO BRASIL

Resumo

A broca-das-axilas tem sido historicamente relatada em cultivos de soja na região Sul do Brasil. Contudo, recentemente a espécie foi reportada até mesmo em regiões ao Centro-Oeste do Brasil, onde comumente não ocorre. Desse modo, a presença da broca-das-axilas nessas localidades incomuns e a possibilidade da presença de outras espécies de Tortricidae na cultura da soja, com sintomas semelhantes de ataques aos brotos, juntamente à falta da adoção do nome científico correto para a espécie sugerem a necessidade de se investigar melhor a identidade da broca-das-axilas presente no país. Por este motivo, lagartas de broca-das-axilas foram coletadas ao longo de três anos consecutivos em soja, nas regiões onde recentemente foram reportadas, para a caracterização morfológica e produção do DNA *barcode*. Algumas lagartas foram mantidas em laboratório até a fase adulta para a descrição morfológica das genitálias e asas. Todas as lagartas coletadas e os adultos tiveram a região do DNA *barcode* (fragmento do gene *citocromo c oxidase subunidade I* – COI) sequenciados e comparados com sequências provenientes do banco de dados BOLD, por meio de uma análise filogenética bayesiana acompanhada de uma estimativa do tempo de divergência entre as linhagens, usando relógio molecular. A morfologia das asas e genitálias dos adultos coletados estiveram de acordo com o descrito para *Crociosema aporema*. As sequências de DNA *barcode* também indicaram a presença de *C. aporema*, sendo inclusive a espécie dominante e presente nas regiões onde historicamente não era reportada. Os resultados também revelaram a presença das espécies polífagas *Argyrotaenia sphaleropa* e *Platynota meridionalis*, ambas da família Tortricidae, ocorrendo de forma pontual. Essas duas espécies também podem formar abrigos de seda, atacando a região dos ponteiros da soja. Contudo, as sequências de *C. aporema* coletadas no Brasil revelaram uma grande distância genética, de em média 6%, em comparação com sequências disponíveis no BOLD, oriundas da Costa Rica. A árvore filogenética posicionou as sequências do Brasil com a da Costa Rica em ramos diferentes da árvore, separados há pelo menos 1.8 milhões de anos. Logo, a broca-das-axilas que ocorre no Brasil forma uma linhagem única de *C. aporema*, geneticamente distinta. Mas, não foi possível descartar a possibilidade da existência de espécies crípticas evoluindo de forma alopátrica no Brasil e na Costa Rica. Desse modo, os resultados demonstram que a principal espécie de Tortricidae presente na cultura da soja é *C. aporema* e justifica um amplo monitoramento dessa praga na cultura. Além disso, há a necessidade de uma revisão mais detalhada para a espécie, por meio da taxonomia integrativa, para determinar corretamente se as diferenças genéticas encontradas entre as linhagens dão suporte para a existência ou não de espécies crípticas.

Palavras-chave: Broca-das-axilas-da-soja, DNA barcoding, Linhagens genéticas, Tortricidae, Pragas agrícolas

Abstract

The soybean pod borer has historically been reported in soybean crops in the southern region of Brazil. However, recently the species has also been reported in even more uncommon regions in the Midwest of Brazil. The presence of the soybean pod borer in these unusual localities and the possibility of the presence of other species of Tortricidae in soybean culture, with similar symptoms of attacks on shoots, along with the lack of adoption of the correct scientific name for the species suggest the need for better investigation of the identity

of the soybean pod borer present in the country. For this reason, soybean pod borer caterpillars were collected over three consecutive years in soybean crops in the recently reported regions for morphological characterization and DNA barcode production. Some caterpillars were kept in the laboratory until adulthood for the morphological description of genitalia and wings. All collected caterpillars and adults had the region of the DNA barcode (fragment of the cytochrome c oxidase subunit I gene – COI) sequenced and compared with sequences from the BOLD database through Bayesian phylogenetic analysis accompanied by an estimate of the divergence time between lineages using a molecular clock. The morphology of the wings and genitalia of the collected adults were consistent with those described for *Crociosema aporema*. The DNA barcode sequences also indicated the presence of *C. aporema*, which was even the dominant species in regions where it was historically not reported. The results also revealed the presence of the polyphagous species *Argyrotaenia sphaleropa* and *Platynota meridionalis*, both from the Tortricidae family, occurring in a punctual way. These two species can also form silk shelters, attacking the soybean tip region. However, the *C. aporema* sequences collected in Brazil revealed a huge genetic distance, in average of 6%, compared to sequences available in BOLD, originating from Costa Rica. The phylogenetic tree positioned the sequences from Brazil and Costa Rica on different branches of the tree, separated by at least 1.8 million years. Therefore, the soybean pod borer that occurs in Brazil forms a genetically distinct unique lineage of *C. aporema*. However, it was not possible to rule out the possibility of the existence of cryptic species evolving in an allopatric way in Brazil and Costa Rica. Thus, the results demonstrate that the main species of Tortricidae present in soybean culture is *C. aporema* and justifies a broad monitoring of this pest in the culture. In addition, there is a need for a more detailed review of the species through integrative taxonomy to determine correctly whether the genetic differences found between lineages support the existence or not of cryptic species.

Keywords: Soybean bud borer, DNA barcode, Genetic lineages, Tortricidae, Agricultural pests

2.1. Introdução

Crociosema aporema (Walsingham 1914) foi descrita a partir de uma fêmea coletada na Costa Rica, que recebeu o nome de *Eucosma aporema*. Os parâmetros utilizados para a identificação da espécie envolvem a morfologia dos órgãos sensoriais e genitais, bem como a anatomia das asas anteriores e posteriores (CLARKE, 1954). Heinrich em 1931, descreveu a espécie *Epinotia opposita* a partir de um Holótipo macho, 3 machos e 11 fêmeas parátipos, coletados no Peru (HEINRICH, 1931). O autor se referiu a respeito da semelhança entre *E. aporema*, já descrita e *E. opposita*, principalmente em relação a genitália, mas afirmou serem espécies diferentes dada certas características presentes no par de asas anteriores. Embora, vale destacar que o autor fez menção a presença de raças distintas dentro de *E. opposita*, quando comparado exemplares do Peru com os de outras localidades, Guatemala e Costa Rica. Apesar de utilizar a morfologia dos adultos na descrição, Heinrich, 1931, apenas disponibilizou o desenho das genitálias, o que dificulta comparações. Em 1954 Clarke uniu as espécies *Epinotia aporema* e *Epinotia opposita* e como consequência, todas as sinónimas

passaram a ser denominadas de *Epinotia aporema* (Walsingham 1914). No Brasil, hora os termos foram utilizados como *E. opposita* hora como *E. aporema*, dependendo do autor do artigo, até que a espécie *E. opposita* ou *E. aporema* foi posicionado dentro do gênero *Crociosema* referida como *C. opposita* (RAZOWSKI; BECKER, 2014). Essa não padronização na utilização do nome *C. aporema* levanta dúvidas se a espécie presente no Brasil de fato pertence a *C. aporema* ou se a colocação de *C. opposita* revela uma inconsistência e desconhecimento da real identidade da espécie no Brasil.

A compreensão da diversidade de *C. aporema* que ocorre no Brasil é escassa, o que de certo modo, dificulta o posicionamento a respeito da identidade da espécie. Assim, seriam as populações brasileiras variações fenotípicas, ou espécies distintas com diferenças morfológicas significativas que justifiquem o emprego de *C. opposita*? (RAZOWSKI; BECKER, 2004). Desse modo, o uso de ferramentas moleculares como forma integrante da taxonomia pode auxiliar na melhor definição e compreensão das espécies que estão presentes no Brasil (RAZOWSKI; BECKER, 2014, 2017).

O gênero *Crociosema* Zeller 1847 apresenta mais de 50 espécies descritas, sendo boa parte de ocorrência Neotropical. Dentre elas, mais de dez espécies foram descritas a partir de material coletado no Brasil (RAZOWSKI; BECKER, 2017), o que não exclui a possibilidade de ocorrerem outras espécies Neotropicais no país. Alguns dos táxons descritos para o gênero foram realizados baseando-se apenas na morfologia somente do macho ou da fêmea o que dificulta a comparação da diversidade (RAZOWSKI; BECKER, 2017). Isso, pode levar a uma subestimativa da riqueza, bem como posicionar espécies diferentes dentro do mesmo táxon, pois pode haver semelhança entre algumas estruturas, exigindo uma comparação mais completa que envolva as asas e as genitálias de ambos os sexos (CHORLANGO, 2015). Nesse contexto, para a diversidade do grupo na região Neotropical, as relações filogenéticas e posições sistemáticas ainda são incertas (CHORLANGO, 2015; RAZOWSKI; BECKER, 2014, 2017). Ao que parece, boa parte das espécies descritas foram baseadas em tipos coletados na América Central e Norte, muitas vezes baseando-se em um gênero tipo que não ocorre na região Neotropical, com características extremamente variáveis (CHORLANGO, 2015; RAZOWSKI; BECKER, 2017). Nesse sentido estudos de ecologia molecular, que se valem de marcadores moleculares como o DNA-*barcode* podem auxiliar no direcionamento e distinção do que separa espécies crípticas de variações intraespecíficas (BOYKIN et al., 2007; DE BARRO; AHMED, 2011).

O uso de marcadores moleculares na distinção e delimitação de espécies assume uma importância fundamental naquelas de difícil separação taxonômica por meios morfológicos (BOYKIN et al., 2007; DE BARRO et al., 2011; GILLIGAN et al., 2015). Como exemplo, diferentes fenótipos de *Bemisia tabaci* (Genadius 1889) foram identificados ao longo dos anos, esses apresentando distribuições geográficas, preferência a hospedeiro, tolerância a inseticidas, entre outras características completamente distintas, além de isolamento reprodutivo (BOYKIN et al., 2007; DE BARRO; AHMED, 2011; DE BARRO et al., 2011). Assim, os métodos moleculares somados às características fenotípicas e reprodutivas permitiram a separação de mais de 30 espécies dentro do complexo *Bemisia tabaci* (DE BARRO et al., 2011). Por outro lado, em lagartas, o uso de marcadores moleculares permite a distinção e identificação de duas importantes lagartas da soja, *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) e *Helicoverpa armígera* (Hübner, 1808), cuja separação baseada em caracteres morfológicos é duvidosa (BEHERE et al., 2008; GILLIGAN et al., 2015).

A variedade de nomes adotados nos trabalhos brasileiros e que carecem de informações taxonômicas importantes, revelam a necessidade de se entender de forma mais precisa sobre as brocas-das-axilas que ocorrem em soja no Brasil, uma vez que existe uma similaridade muito grande entre os imaturos e adultos de espécies diferentes, inclusive de gêneros distintos, dentro de Eucosmini, com hábitos similares ao das brocas-das-axilas e que também se alimentam de plantas leguminosas (CHORLANGO, 2015; RAZOWSKI; BECKER, 2017; REGIER et al., 2012). Por este motivo, foi realizado um levantamento das lagartas que têm ocorrido em soja, no Brasil, ao longo de três anos, onde as lagartas da família Tortricidae foram identificadas e submetidas à análise de DNA *barcode*. Adicionalmente, alguns adultos dessas lagartas foram investigados quanto à morfologia das genitálias de machos e fêmeas com o descrito na literatura afim de se verificar a identidade da broca-das-axilas que têm ocorrido em soja no Brasil. A região do DNA *barcode* foi sequenciada para auxiliar na identificação da espécie, tomando-se por base sequências de *C. aporema* da Costa Rica disponível no BOLD. Uma análise filogenética e um relógio molecular foram realizados juntamente às sequências dos bancos de dados, para se ter uma ideia da variabilidade intraespecífica e da distância genética entre as populações geograficamente distribuídas no Brasil e Costa Rica.

2.2. Materiais e Métodos

2.2.1. Coleta dos insetos

As amostras de lagartas foram coletadas, em 6 Estados brasileiros, para 38 locais distintos, totalizando 106 indivíduos, distribuídos em importantes áreas produtoras de soja, nos estágios reprodutivos da planta, ao longo de 3 anos, 2020 a 2022. Somente o estágio larval dos insetos foi coletado e todas as coletas realizadas estiveram de acordo com os regimentos do Sistema de Autorização e Informação da Biodiversidade (SISBIO), por meio de um contrato com a empresa PROMIP (licenças números: 61826, 61824) responsável pela coleta. Os insetos foram armazenados em tubos (Falcon 15mL) contendo propileno glicol, para a conservação do material e, posteriormente levados ao laboratório de Ecologia Molecular de Artrópodes, ESALQ/USP, onde foram mantidos em álcool 100% dentro de freezer a -20°C. As amostras foram então identificadas, tomando por base os trabalhos de: GILLIGAN, (2014); GILLIGAN; EPSTEIN, (2014) e SOSA-GÓMEZ et al. (2014). Parte das lagartas, oriundas de cada um dos estados onde as coletas foram realizadas, foram levadas e criadas em laboratório, sob temperatura média de 25°C, 70% de umidade relativa, fotoperíodo de 12L:12E, por meio de dieta artificial, para posterior análise morfológica, e validação da sequência de DNA *barcode* encontradas.

2.2.2. Identificação morfológica

As lagartas das brocas-das-axilas são caracterizadas por apresentar: uma cabeça mais escurecida, uma mancha lateral a partir da sutura pós-genal, nos instares superiores; extremidade da sutura frontal, com os vértices da cabeça se estendendo para dentro do primeiro segmento do pronoto de forma visível; aparência branco-leitosa, com algumas pináculos pequenas e mais escurecidas; o integumento com micro-espinhos; 30 a 40 crochets biordinais, nas falsas pernas abdominais; tricetose característica no segmento A9. A diagnose mencionada foi utilizada na identificação das lagartas coletadas, juntamente a uma chave de identificação para imaturos de Lepidópteros praga da família Tortricidae (GILLIGAN; PASSOA, 2014; GILLIGAN; EPSTAIN, 2014).

Para a identificação dos adultos, foram realizadas a montagem das genitálias e das asas tanto dos machos quanto das fêmeas, para comparação e descrição morfológica das estruturas. Primeiramente, a região inteira do abdome foi retirada, utilizando uma Lupa estereoscópica, e

armazenada em álcool. Posteriormente, o abdome de cada inseto foi individualizado em tubos de vidro contendo aproximadamente 50 mL de solução aquosa de KOH (10%) a quente. As amostras foram mantidas por alguns minutos (entre 3 e 5 min, dependendo do tamanho do abdome) para a digestão de lipídeos, gorduras e clarificação das estruturas a serem analisadas, de forma individual. Após a clarificação, o excesso de escamas foi retirado com o auxílio de pincel, e as genitálias retiradas cuidadosamente por meio de pinças cirúrgicas. Uma vez retiradas, as genitálias foram colocadas em um tubo contendo glicerina líquida para posterior análise. As genitálias foram gentilmente montadas em lâminas de vidro, imersas em álcool 100% para desidratar, possibilitando o posicionamento ideal para as fotografias. Após a secagem do álcool, as genitálias foram imersas em lubrificante KY®, visualizadas e fotografadas por meio de microscópio estereoscópico (câmera e software, Leica Digital DFC450, integrada a Leica MDG41, *Leica Microsystems, Heerbrugg, Switzerland*) no laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos (ESALQ/USP). Vale destacar que os adultos utilizados também tiveram seu DNA extraído e sequenciado.

Adicionalmente, uma genitália masculina e uma feminina foram montadas em lâminas para depósito como *vouchers*. As genitálias foram retiradas da glicerina e mantidas em água para diluição. Posteriormente, foi realizada uma desidratação sucessiva com etanol, passando pelas concentrações de 50%, 70%, 90% e 100%. Após a desidratação as genitálias foram imersas em óleo de cravo por 48h, adicionando-se bálsamo do Canadá, a cada 12h. Após o óleo de cravo ter expulsado completamente o álcool, as genitálias foram montadas em lâminas de vidro, com o bálsamo, e deixadas para secar em estufa por 10 dias. Depois de montadas, as estruturas foram armazenadas para posterior depósito no Museu de Entomologia Luiz de Queiroz- MELQ do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP. Já a montagem dos adultos foi realizada manualmente com auxílio de alfinetes e microalfinetes entomológicos e isopor, na posição apropriada para o grupo. Por fim, as imagens foram manualmente editadas no software CorelDraw Graphics Suite 2022.

As estruturas taxonômicas foram descritas tomando por base dados da literatura (KLOTS, 1970; GILLIGAN; PASSOA, 2014; GILLIGAN; EPSTAIN, 2014). A identificação da espécie *C. aporema* foi realizada por meio do reconhecimento das estruturas importantes taxonomicamente para diagnose da espécie, bem como pela comparação com as espécies descritas para o gênero, presentes nos trabalhos de: MEYRICK, 1917; HEINRICH, 1931; CLARK, 1954; RAZOWSKI; LANDRY, 2008; RAZOWSKI; WOJTUSIAK, 2008; RAZOWSKI; PELZ, 2010; RAZOWSKI; WOJTUSIAK, 2010; RAZOWSKI et al., 2008;

GILLIGAN, 2012; RAZOWSKI; BECKER, 2014; RAZOWSKI; BECKER, 2017; RAZOWSKI; BECKER, 2018.

2.2.3. Extração de DNA, amplificação, sequenciamento e edição das sequências.

O DNA dos insetos foi extraído a partir da região anterior (cabeça e tórax) das lagartas para diminuir contaminantes, como tecidos gordurosos, nas etapas posteriores. Já os adultos, apenas o tórax foi utilizado na extração de DNA, em que o abdome foi retirado por completo e armazenado em álcool 70% para a identificação e descrição taxonômica das genitálias. A extração tomou por base o protocolo com CTAB 2%, CIA e proteínase K (SOARES et al., 2018). A qualidade do DNA extraído foi verificada por meio de gel de agarose a 0.8% sob luz UV, contando com 4µL de DNA, 2µL de *syber* mais 2µL da substância *loading dye*.

Para o auxílio na identificação da espécie, o DNA mitocondrial na região do citocromo c oxidase subunidade 1 (COI) foi amplificado utilizando os primers universais *forward* LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG- 3') e *reverse* HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA- 3').

As reações de PCR contaram com: 10,7µL de H₂O; 2,5µL da PCR *buffer* 10x (Invitrogen); MgCl₂ (50mM); dNTP (2,5 mM); primers *forward* + *reverse* (5µL cada), Taq Polimerase 0,3µL (Invitrogen); 3µL de DNA. Entretanto, algumas amostras exigiram adaptações na quantidade de magnésio e de DNA, de acordo com a qualidade da amostra. As condições de amplificação foram: uma fase inicial à 95°C por 3 minutos; 28 ciclos, iniciando com 30 segundos em 94°C, 45 segundos em 53°C e 2 minutos em 72°C; terminando com 1 ciclo de 72°C por 10 minutos.

Os amplicons foram purificados com a enzima *Exo-Sap* e enviados para sequenciamento no CBTEC/ESALQ, tanto no sentido *forward*, quanto *reverse*, para cada amostra.

Com base nas melhores sequências de DNA obtidas, uma sequência consenso foi estabelecida, para se manter um padrão de tamanho e auxiliar na edição dos perfis cromatográficos. Os perfis cromatográficos de ambos os sentidos da fita para cada indivíduo foram agrupados juntamente a consenso correspondente, eliminando-se as regiões com ruídos e comparados visualmente, resolvendo as regiões incertas, e retirando a porção de DNA correspondente as regiões dos iniciadores.

Todos esses procedimentos foram realizados em nuvem pelo software *Benchling [Biology Software]* (2022). Em seguida as sequências de cada indivíduo foram alinhadas pelo método

ClustalW, com as especificações default, e o melhor modelo evolutivo para os dados foi checado de acordo com o critério *AICc* no software *MEGAX* (KUMAR et al., 2018). Adicionalmente, a presença de *NUMTs*, fragmentos de íntrons nucleares no DNA mitocondrial, foram verificados para todos os indivíduos.

2.2.4. DNA barcoding

Após a edição, as sequências foram submetidas a análise por BLAST, utilizando para comparação os bancos de dados do *GenBank* e do *BOLD System* para a identificação molecular. Esse método, permite identificar a proximidade do gene do indivíduo, no caso o DNA mitocondrial, com sequências do mesmo gene nos bancos de dados que apresentam alta homologia. Assim, as semelhanças entre o material genético refletem uma relação próxima entre a espécie presente no banco de dados e o indivíduo analisado, possivelmente revelando a provável espécie.

Complementarmente, uma análise filogenética foi testada para checar a posição e integridade da espécie identificada pelas comparações morfológicas, coletadas no Brasil, com sequências provenientes dos bancos de dados. Ou seja, se todos os indivíduos coletados e caracterizados morfológicamente como *C. aporema*, se agrupariam em um mesmo ramo da árvore e qual a posição desse grupo quando comparados às demais sequências dentro da tribo de Eucosmini. O tamanho das sequências foi padronizado em 628 pares de bases (pb), maximizando o número de indivíduos utilizados do banco de dados. Posteriormente, as sequências foram alinhadas pelo método *ClustalW*.

O banco de dados para a análise filogenética foi constituído de: 30 haplótipos do Brasil, representando sequências diferentes; 16 haplótipos distintos de *C. aporema* provenientes da Costa Rica; 7 sequências da Costa Rica, identificadas como BioLep, mas dentro do gênero de *Crociosema* no banco de dados; 3 sequências de *C. lantana* (Busk 1910) da Costa Rica; 2 sequências de *C. longipalpana* (Zeller 1847) do Porto Rico; 8 sequências de *C. plebejana* (Zeller 1847) da Costa Rica, finalizando as sequências do gênero disponíveis no banco de dados. Outras sequências dentro de *Olethreutinae* foram utilizados, como o gênero, *Eucosma* (Hübner 1823), *Rhyacionia* (Hübner 1825), *Bactra* (Stephens 1834) e *Gypsonoma* (Meyrick 1895). Por fim, um outgroup mais distante representado por *Argyrotaenia sphaleropa*, dentro da família Tortricidae e sub-família *Tortricinae* foi utilizado. Muitas das sequências presentes no banco de dados não estão publicamente disponíveis e, portanto, todas as sequências,

disponíveis e identificadas dentro da tribo Eucosmini foram utilizadas no estudo, totalizando 76 indivíduos, para a análise das relações filogenéticas.

As sequências foram organizadas em um arquivo do tipo *Nexus*, contendo os 76 táxons e 628 pares de base, cada. O melhor modelo evolutivo foi gerado a partir do software MRMODELTEST v2.3 (NYLANDER, 2004), indicando o melhor modelo GTR com distribuição gama invertida, pelo critério de Akaike AICc. A análise filogenética bayesiana foi gerada pelo software MRBAYES v3.1.2 (RONQUIST AND HUELSENBECK 2003), contando com 10 milhões de gerações, sendo uma *cold chain* e três *heated chain* para cada geração. Ao final das gerações, 25% das árvores foram descartadas como *burn in samples*. A árvore consenso foi então obtida com uma probabilidade posterior > 0.01 . A árvore criada foi visualizada com o software FIGURETREE 1.3.1.

Uma análise filogenética complementar foi gerada para estimar o tempo de divergência entre as linhagens presentes no Brasil e na Costa Rica, utilizando o software BEAST v1.7.5. (DRUMMOND et al., 2012). As configurações preliminares para a análise foram criadas no BEAUTY v1.7.5 gerando um arquivo XML de entrada, que tomou por base o modelo de substituição nucleotídica (GTR + I) pelo Critério de Akaike (AKAIKE, 1974) acessado pelo software MRMODELTEST v. 2.3. (NYLANDER, 2004). O relógio molecular adotado foi o tipo estrito, com modelo de especiação de Yule e taxa de substituição nucleotídica de 3.54% por sítio por milhão de anos, assumindo que seja constante para o genoma mitocondrial COI em insetos (PAPADOPOULOU et al., 2010). O modelo foi ajustado para uma taxa de mutação com distribuição normal para a região do COI, com média e desvio padrão adequados ao intervalo de 95% de confiabilidade (média = 0.0177; SD = 0.001), baseado em (CORREÂ et al., 2017). Três corridas independentes de 150 milhões de gerações foram criadas. As árvores resultantes foram unificadas pelo software LOGCOMBINER eliminando 10% como *burning* e estimando a qualidade no software TRACER v.1.5 (DRUMMOND et al., 2012). O resultado revelou suporte de mais de 200 nos parâmetros de *effective sample size* (ESS), permitindo a estimativa da idade do ancestral comum mais recente para os grupos.

2.3. Resultados

2.3.1. Identificação e descrição morfológica das lagartas e adultos

Por conta das dificuldades logísticas de armazenamento e conservação do DNA, a aparência de algumas lagartas foi danificada pela exposição ao álcool, o que dificultou a visualização das estruturas importantes no reconhecimento das lagartas. Porém, no geral, foi possível se observar a mancha lateral na cabeça das larvas a partir do terceiro, a extremidade da cabeça se estendendo para dentro do primeiro segmento do tórax, a aparência branco leitosa, micro espinhos e a disposição característica dos crochets sobre as falsas pernas abdominais (Figura 1).

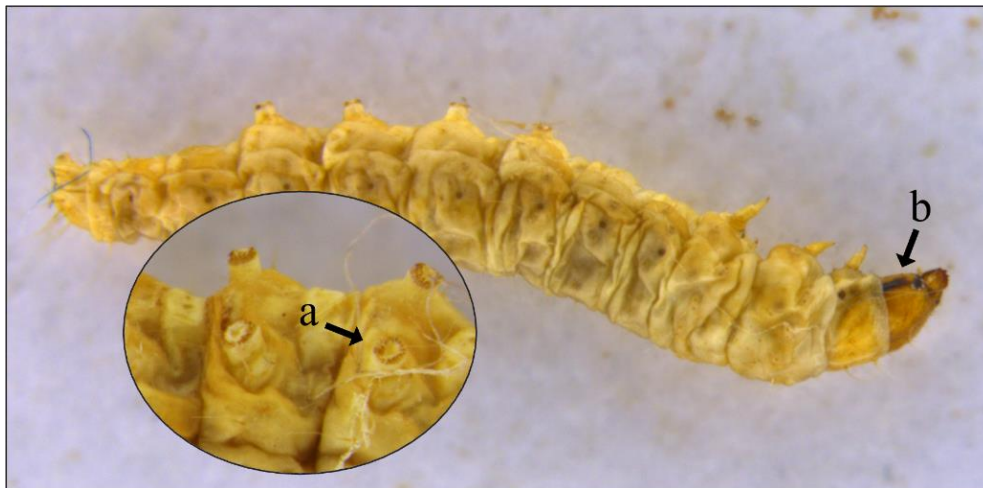


Figura 1. Vista lateral da lagarta de *Crocidosema aporema* (Walsingham 1914). a) crochets nas pernas abdominais; b) mancha lateral da cabeça.

O padrão das asas nos dois sexos esteve de acordo com o descrito para a espécie *C. aporema*. Os machos apresentaram asas de coloração castanha com a parte distal das asas anteriores um pouco mais esbranquiçadas quando comparado as fêmeas, principalmente no primeiro terço das asas e escamas enegrecidas sobre as asas posteriores, que são de coloração creme, além de tufo de escamas sobre as tíbias posteriores (Figura 2B).

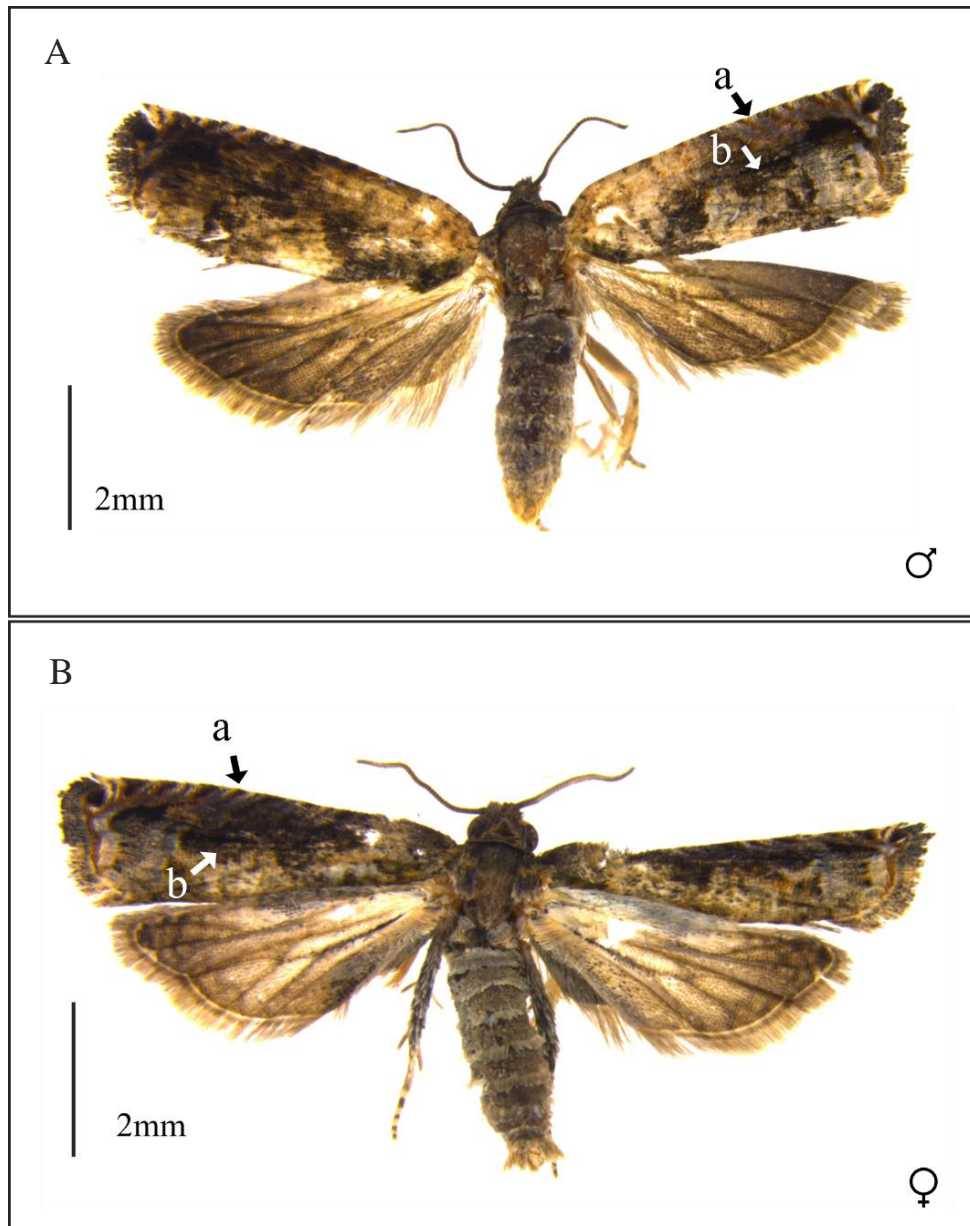


Figura 2. Adultos de *Crocidosema aporema* macho (A) e fêmea (B) evidenciando a morfologia das asas. **a)** *strigulas* costais, em formato de estrias; **b)** mancha supra ocelar, na porção medial das asas.

As fêmeas apresentam as asas com coloração um pouco mais escura, com escamas enegrecidas sobre as asas posteriores. A mancha superior, longitudinalmente nas asas esteve presente tanto nos machos, como nas fêmeas (Figura 2B). Ambos os adultos apresentaram as *strigulas* características nas regiões costais, ou seja, escamas depositadas como estrias, assim como a mancha ocelar. Por fim, foi possível se verificar a presença das escamas escuras sobre as asas posteriores, na porção anal das asas dos machos (Figura 2).

A genitália dos machos apresentou o uncus triangular, pouco menor do que o *socii*, sem cerdas e de tamanho relativamente semelhante aos *socii*. Os *socii*, se apresentaram triangulares, com pequenas cerdas no ápice *tegumen* reduzido e pouco expressivo, região esclerotizada que liga os *socii* a base da genitália. As valvas, bem desenvolvidas, mais estreitas no ápice e largas na base formando o *saccullus*, com dois tufos de cerdas, um cobrindo a parte anterior do ápice da valva, bem preenchido, e outra na parte mais basal (Figuras 3A e 3B). Outra característica importante é a sutura na base ventral das valvas. O *aedeagus* não apresentou nenhuma ornamentação externa ou espinho, com o *caullis* reduzido e difícil de se visualizar, e a região denominada de *cornuti*, cetose interna do *aedeagus* totalmente protegida (Figuras 3A e 3B). Desse modo, embora exista uma pequena variação no formato das valvas, em comparação com os dados da literatura, a estrutura como um todo manteve os caracteres taxonômicos importantes para a identidade morfológica atribuída aos machos de *C. aporema*.

A genitália das fêmeas revelou pouca variação entre os indivíduos amostrados, mantendo uma *bursa copulatrix* grande, arredondada, e claramente separada, com os pares de *signa* (*signum*) bem aparentes, estruturas esclerotizadas dentro da *bursa*, semelhante a um espinho. O formato em bolso no esternito VII é difícil de se visualizar, mas está presente (Figuras 3C e 3D). Outra estrutura característica observada foi a presença dos pares de apófises esclerotizadas que se estendem desde o ápice, até o ducto da *Bursa copulatrix*. Na parte mais distal da genitália feminina é possível se verificar as *papillae anales* em formato bifido com cetose (Figuras 3C e 3D). Portanto, foi possível observar os caracteres taxonômicos importantes para o reconhecimento das fêmeas de *C. aporema*.

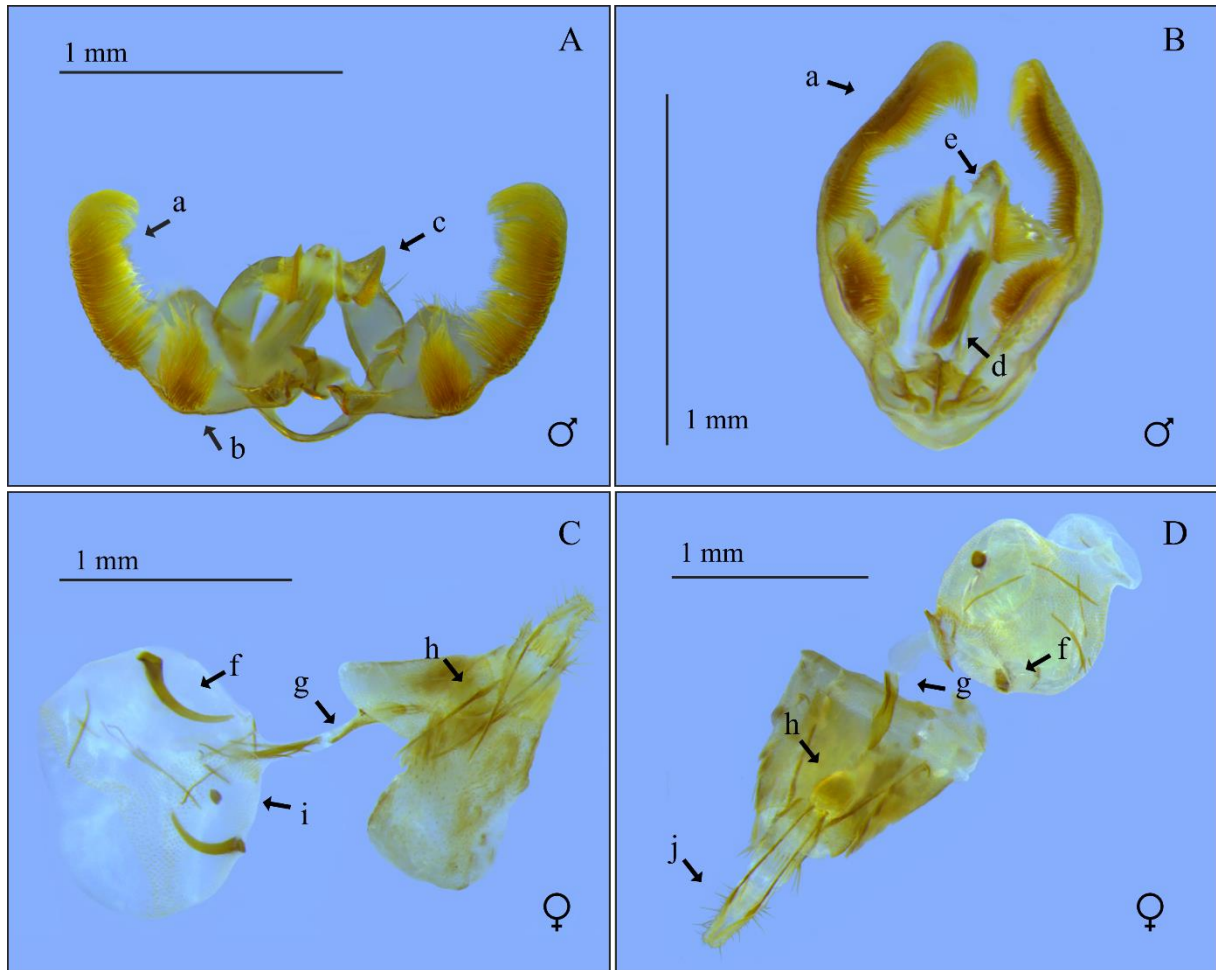


Figura 3. Genitálias masculinas (A, B) e femininas (C, D) de adultos de *C. aporema*. a) valvas da genitália masculina, com acúmulo de cerdas. b) base das valvas denominada *cuculos* com cetose característica. c) pares de *socii* com cerdas características. d) *edeago* com *cornutii*. e) *uncos* entre os pares de *socii*. f) os pares de *signa* (*signum*) dentro da *bursa copulatrix*. g) ducto da genitália. h) conjunto dos ductos femininos denominados de *óstium e antrum*. i) *bursa copulatrix*. j) extremidade da genitália, denominada de *papillae anales*.

2.3.2. Identificação molecular

Um total de 83 lagartas e 23 adultos foram coletados, caracterizados morfológicamente como broca-das-axilas e submetidos a extração de DNA. Apenas 76 lagartas puderam ter seu DNA mitocondrial extraído, amplificado e sequenciado com sucesso. As sequências do DNA mitocondrial COI variaram entre 650 e 760 pb, conforme esperado pela amplificação dos primers universais utilizados. O uso da fita nos dois sentidos, *forward/reverse* possibilitou maior cobertura e integridade da sequência, e conseqüentemente, maior acurácia na comparação através do BLAST. Surpreendentemente, não foi constatado nenhum registro de DNA *barcode* de *C. aporema* coletado na América do Sul e disponível para comparação, nos

bancos de dados. O DNA *barcode* indicou que a espécie caracterizada como *C. aporema* é a mais frequente em soja no Brasil. Porém, essas sequências genéticas, do presente trabalho, revelaram 99.8% de homologia com uma sequência desconhecida, de origem privada, e apenas 95.45% de semelhança com sequências de *C. aporema*, da Costa Rica disponíveis no banco de dados (Tabela 1). A distância genética (*Pairwise distance*) estimada entre as sequências do Brasil, dentro da população brasileira, foi de 0.35%. Mas, a distância genética entre os grupos, ou seja, *C. aporema* presente na Costa Rica e as provenientes do Brasil, foram em média de 6,13%, variando entre 5,56% e 6,93%.

A comparação das sequências COI por BLAST revelou a presença de outras espécies identificadas como broca-das-axilas, na fase de lagarta, com alta homologia com sequências dos bancos de dados. Entre essas sequências, puderam ser caracterizadas: *Platynota meridionalis* (Brown 2013) com 98% de homologia; *Argyrotaenia sphaleropa* (Meyrick 1909) (Lepidoptera: Tortricidae) com 100% de homologia, com sequências do Brasil, no banco de dados (Tabela 1). Portanto o DNA *barcode* revelou a presença de quatro espécies de Tortricidae presentes na cultura, revelando a dominância de *C. aporema* (Tabela 1)

2.3.1. Filogenia

A árvore filogenética revelou três grupos distantes e com grande suporte (100% de homologia), dentro do gênero monofilético *Crociosema*. Houve grande probabilidade de suporte para os ramos, independentemente do grupo monofilético e a relação entre eles. Dentro de *Crociosema*, o primeiro grupo formado englobou todos os haplótipos identificados como *C. plebejana*, com 100% de suporte (Figuras 4 e 5). O segundo grupo englobou as espécies *C. longipalpana* e *C. lantana*, com 100% de suporte e com pouca distância genética entre elas, representada pelo comprimento dos ramos (Figuras 8 e 9). Por fim, o terceiro grupo englobou as sequências identificadas nos bancos de dados como *C. aporema*, tanto no Brasil, quanto na Costa Rica (Figuras 4 e 5).

Tabela 1. Localidade de amostragem das brocas-das-axilas no Brasil (Cidade, Estado, Coordenadas Geográficas, Número de insetos coletados e identificados previamente como broca-das-axilas, Espécies identificadas pela região *barcoding* COI).

Local	Estado	Latitude	Longitude	Nº indivíduos	Espécies
Cristalina	GO	-16.8326	-47.5403	2	<i>C. aporema</i>
Cristalina*	GO	-16.1780	-47.4572	5	<i>C. aporema</i>
Cristalina	GO	-16.3731	-47.6228	2	<i>C. aporema</i>
Formosa	GO	-15.2982	-47.0890	1	<i>C. aporema</i>
Perdizes*	MG	-19.3732	-47.3423	2	<i>C. aporema</i>
Arapongas	PR	-23.4758	-51.4784	1	<i>C. aporema</i>
Boa Ventura do São Roque	PR	-23.4758	-51.4784	2	<i>C. aporema</i>
Condói	PR	-24.9599	-51.5814	4	<i>C. aporema</i>
Coronel Domingos Soares	PR	-25.5129	-51.9578	2	<i>C. aporema</i>
Coronel Domingos Soares	PR	-26.2956	-52.1332	2	<i>C. aporema</i>
Foz do Jordão	PR	-25.6861	-52.1146	1	<i>C. aporema</i>
Londrina	PR	-23.1806	-51.1718	1	<i>C. aporema</i>
Manoel Ribas	PR	-24.4188	-51.6651	3	<i>C. aporema</i>
Manoel Ribas	PR	-24.4099	-51.6640	2	<i>C. aporema</i>
Maringá	PR	-23.5170	-52.0266	3	<i>C. aporema</i> , <i>A. sphaleropa</i>
Piraí do Sul	PR	-24.5601	-49.9295	4	<i>C. aporema</i> , <i>A. sphaleropa</i>
Piraí do Sul	PR	-24.5425	-50.0114	4	<i>A. sphaleropa</i> , <i>Platynota meridionalis</i>
Pitanga	PR	-24.7161	-51.7700	3	<i>C. aporema</i> , <i>P. meridionalis</i>
Reserva	PR	-24.6980	-50.8999	3	<i>C. aporema</i>
Tibagi*	PR	-24.4399	-50.2693	3	<i>C. aporema</i>
Capão Bonito do Sul*	RS	-28.1015	-51.4854	3	<i>C. aporema</i>
Colorado*	RS	-28.3948	-52.9703	7	<i>C. aporema</i>
Coxilha	RS	-28.0990	-52.3392	1	<i>C. aporema</i>
Lagoa Vermelha	RS	-28.1074	-51.5270	3	<i>C. aporema</i>
Passo Fundo	RS	-28.1584	-52.5422	2	<i>C. aporema</i>
Samanduva	RS	-27.9313	-51.7982	3	<i>C. aporema</i>

Sarandi	RS	-27.7735	-52.8180	2	<i>A. sphaleropa</i>
Vacaria	RS	-28.5866	-51.0289	1	<i>C. aporema</i>
Vila Langaro	RS	-28.1352	-52.1580	6	<i>C. aporema</i>
Campos Novos	SC	-27.3675	-51.2459	3	<i>C. aporema</i>
Chapecó	SC	-27.1112	-52.7598	5	<i>C. aporema, A. sphaleropa</i>
Guatambú	SC	-27.1112	-52.7598	4	<i>C. aporema, A. sphaleropa</i>
Xanxerê	SC	-26.8473	-52.3979	4	<i>C. aporema</i>
Buri	SP	-23.7950	-48.4297	1	<i>C. aporema</i>
Casa Branca	SP	-21.9077	-47.2096	3	<i>C. aporema</i>
Itaí	SP	-23.4146	-49.0842	4	<i>C. aporema</i>
Itapetininga	SP	-23.6149	-48.0121	1	<i>C. aporema</i>
Itararé*	SP	-24.0280	-49.3590	3	<i>C. aporema</i>

* Adultos utilizados para a análise morfológica.

A espécie de broca-das-axilas presente em soja no Brasil formou um grupo monofilético consistente, todas pertencendo ao mesmo grupo genético, independente da localidade. Do mesmo modo, as sequências caracterizadas como *C. aporema* da Costa Rica (CR), formaram um grupo monofilético, separados do Brasil (Figuras 4 e 5). Assim, a despeito dos resultados encontrados pela comparação e análise morfológica, a árvore filogenética forneceu subsídios para uma linhagem brasileira, totalmente distinta, tendo como grupo irmão o clado formado pela linhagem da Costa Rica de *C. aporema*. A análise também confirmou a presença das sequências sem identificações taxonômicas referidas no banco de dados como BioLep172 e BioLep173, encontradas na Costa Rica, dentro do gênero *Crociosema*. Portanto, todas as sequências do gênero *Crociosema* formaram um grupo monofilético consistente, com 100% de identidade, apesar do relacionamento entre os grupos ser incerto.

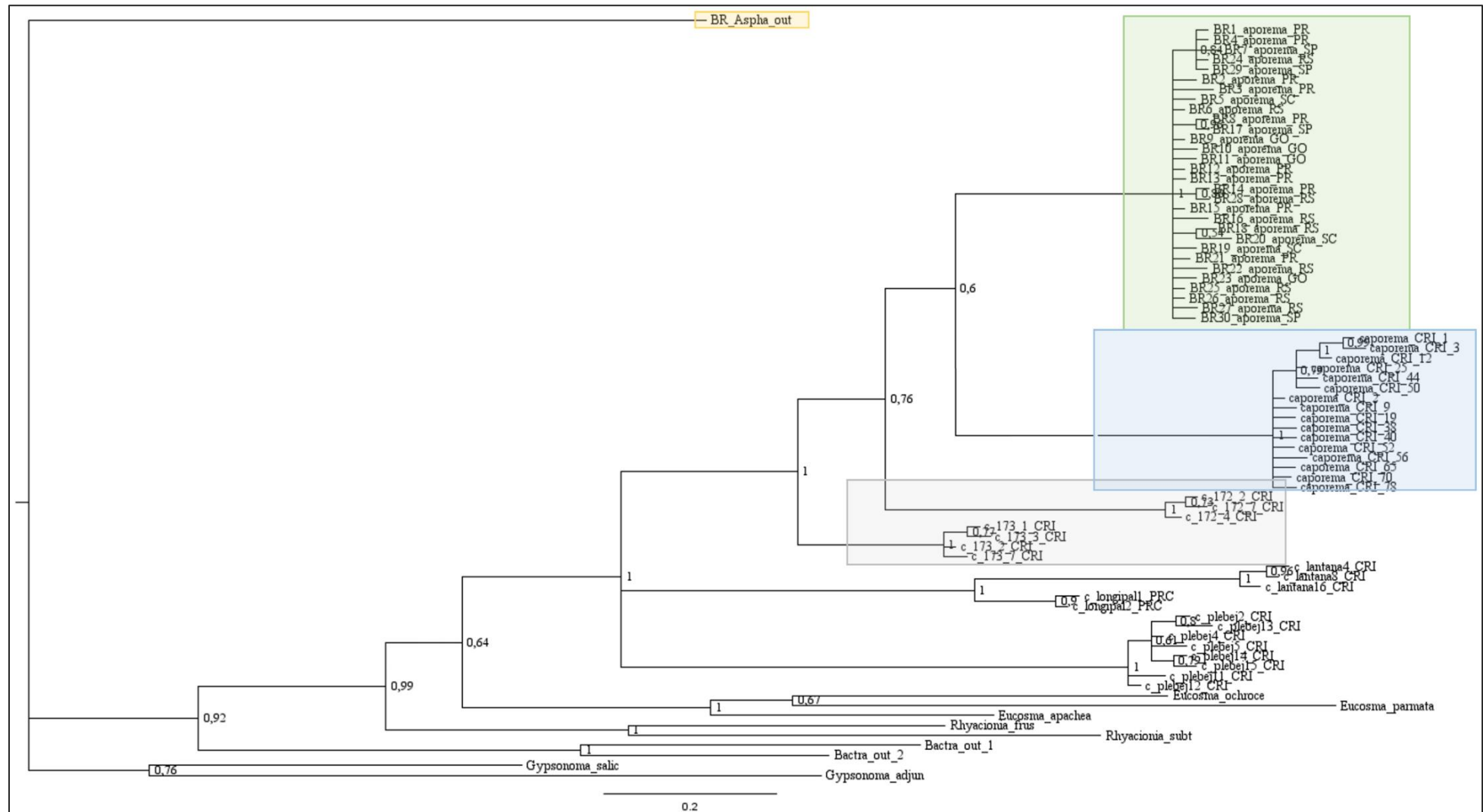


Figura 4. Árvore filogenética gerado pela análise bayesiana a partir do gene mitocondrial COI, com 10000000 de gerações, para as relações evolutivas dentro de Eucosmini. Os números nos nós representam a probabilidade associada aos agrupamentos, e as linhas representam as distâncias genéticas entre os táxons.

a identificações errôneas em campo. As diferentes espécies encontradas nas amostras pelo método *barcode* evidencia essa dificuldade. Além do mais, os métodos de preservação do material influenciam na identificação, pois podem danificar pináculos e/ou setas e remover a coloração das lagartas (GILLIGAN, 2012). Existem poucos estudos que comparam a morfologia dos imaturos de Tortricidae, uma das maiores famílias de Lepidoptera, em que existe muita variação fenotípica (GILLIGAN, 2012; GILLIGAN; PASSOA, 2014; GILLIGAN; EPSTAIN, 2014). Portanto, é importante que a amostragem da broca-das-axilas leve em conta os demais diagnósticos em conjunto, como por exemplo os danos associados à cultura, a época e região em que a praga está ocorrendo, se possível com a criação das lagartas em laboratório até a fase dos adultos para melhor identificação, ou ainda uma análise molecular, dependendo das necessidades do estudo ou monitoramento.

A ocorrência persistente de *A. sphaleropa* na soja ao longo de 3 anos consecutivos, até mesmo em áreas com tecnologia *Bt* pode indicar um processo de adaptação da espécie à soja, podendo ser confundida com a broca-das-axilas. Embora sabidamente essa espécie seja uma praga de frutíferas, frequentemente coletadas em citros (dados da coleção do Museu de Entomologia Luiz de Queiroz - MELQ) é uma praga polífaga se alimentando de plantas da família Fabaceae, incluindo o feijão (*Phaseolus vulgaris*) (BIEZANKO 1961). Os resultados dão embasamento para os relatos recentes dessa espécie se alimentando de soja (*Glycine max* L.) na região do Centro-Oeste, no Estado do Mato Grosso (NEVES; SILVA, 2021) muito distante das amostras coletadas no presente estudo, do Paraná e Santa Catarina. Por outro lado, a espécie *Platynota meridionalis* (Brown 2013), recentemente descoberta, foi inicialmente coletada em algodão (*Gossypium* sp., Malvaceae), mas referida como polífaga, atacando a cultura do mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L. Ericaceae). Ambas as espécies de Tortricidae mencionadas apresentam o comportamento de enrolar folhas novas com seda, assim como a broca-das-axilas. Esses resultados sugerem a necessidade de se monitorar a presença dessas espécies no campo, e avaliar se estão causando danos às plantas de soja, possivelmente exigindo uma avaliação nos níveis de danos econômicos e o desenvolvimento de métodos de controle.

As genitálias dos adultos coletados no Brasil são similares ao descrito para *C. aporema* proveniente da Costa Rica, de onde foi designado o holótipo (HEINRICH, 1931). As estruturas das asas também foram condizentes com a diagnose da espécie. Porém, análise bayesiana discriminou os indivíduos de *C. aporema* de origem geográfica distintas, em grupos separados. Assim, a broca-das-axilas *C. aporema* presente em soja no Brasil forma uma linhagem brasileira monofilética e separada da Costa Rica há pelo menos 1,8 milhões de anos.

Esses resultados são condizentes com a distância de mais de 6% de divergência que divide os dois grupos, abrindo a possibilidade da existência de um complexo de espécies crípticas evoluindo de forma alopátrica no Brasil e na Costa Rica, em que a linhagem do Brasil se divergiu num tempo mais recente.

Para alguns clados dentro de Tortricidae, distâncias de 3% a 5% podem refletir o isolamento entre espécies (REGIER et al., 2012; ORTIZ et al., 2017). Como exemplo, o complexo de espécies do gênero *Archips* (Hübner, 1822) que possuem diferenças adaptativas muito discrepantes, mas com pouca variação morfológica, inclusive em sua genitália, apresenta uma distância genética de 1,5% e 3,5% pelo COI, caracterizando espécies distintas (KRUSE; SPERLING, 2001). Por outro lado, o mesmo estudo posicionou duas linhagens distintas, separadas em média por 1,5%, em um mesmo grupo apesar das especificidades fenotípicas desiguais entre as linhagens (KRUSE; SPERLING, 2001). Entre as duas espécies Neotropicais do gênero *Eccopsis* (Lepidoptera: Tortricidae: Olethreutinae: Olethreutini) a distância genética variou entre 4.9% e 5.2%, ambas posicionadas em ramos diferentes da árvore filogenética, utilizando o mtDNA na porção do DNA barcode COI (ORTIZI et al., 2017). Por fim, o complexo de espécies crípticas (*Choristoneura fumiferana* Clemens 1865) (Lepidoptera: Tortricidae), revelou a distinção entre *C. fumiferana* do complexo (*C. biennis*, *C. pinus*, *C. occidentalis*, *C. lambertiana*), mas não entre os demais, quando utilizado somente a informação do mtDNA. Porém, quando os dados morfológicos, tanto dos adultos quanto imaturos, foram somados ao mtDNA para compor a árvore filogenética, as inconsistências foram resolvidas, separando o complexo em quatro espécies (LUMLEY; SPERLING, 2010).

A distância genética ou modelos de evolução com a utilização de apenas um gene são insuficientes para a separação de espécies (FROHLICH et al., 1999; DE BARRO; AHMED, 2011; DE BARRO et al., 2011; KRUSE; SPERLING, 2001). Portanto, para a resolução das linhagens ou espécies de *Crociosema* seria importante um estudo envolvendo a integração dos dados morfológicos, ecológicos e moleculares, de preferência envolvendo mais de um gene. Vale destacar que na descrição da espécie *Epinotia opposita*, coletada no Peru, sinonimizada em (CLARKE, 1954) o autor comparou *E. opposita* com indivíduos de *C. aporema* (= *E. aporema*) da Costa Rica, e sugeriu existir uma variação fenotípica nas genitálias de populações de acordo com a origem o que poderia ser o reflexo de uma especiação (HEINRICH, 1931). Os indivíduos identificados molecularmente como Lep172 e Lep173, presentes no banco de dados, ambos da Costa Rica, foram posicionados em ramos distintos da árvore, com 100% de suporte para dentro dos grupos, potencialmente

representando duas espécies ainda não descritas, dentro do gênero. Desse modo, os resultados no presente trabalho sugerem uma necessidade de revisão taxonômica no grupo Neotropical.

Por fim, a identificação das espécies de broca-das-axilas em culturas de exportação, como a soja, também ganha uma importância fitossanitária como pragas quarentenárias. Nos Estados Unidos, por exemplo, *C. aporema* é considerada uma praga quarentenária de importância A1, de origem da América do Sul, segundo a *USDA's Cooperative Agriculture Pest Survey Program* (CAPS 2010). Portanto, a correta caracterização e identificação das espécies que estão ocorrendo em soja, bem como a presença das sequências de DNA *barcode* podem ser importantes nesse cenário. Assim, conhecer a diversidade genética e as delimitações de espécie para broca-das-axilas, dos diferentes países onde ocorre, como Argentina e Peru, permite maior rastreabilidade da origem dos organismos e o direcionamento de ações fitossanitárias de forma mais eficaz.

2.5. Considerações Finais

A broca-das-axilas presente na cultura da soja no Brasil condiz com a espécie *C. aporema* e está presente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país. Por outro lado, há outros lepidópteros de Tortricidae que estão ocorrendo em menor frequência na cultura e que podem ser confundidos com broca-das-axilas. Dentre essas espécies *A. sphaleropa* tem sido mais frequente e pode ser um sinal de alerta para mais estudos e monitoramento de sua ocorrência e distribuição na soja. Assim, o marcador molecular COI é uma ferramenta importante para a identificação das espécies que estão ocorrendo na cultura da soja, auxiliando no monitoramento de pragas. A espécie *C. aporema* presente no Brasil forma uma linhagem consistente e bem distinta geneticamente das linhagens da Costa Rica, separadas a pelo menos 2.28 milhões de anos atrás. Apesar da distância de 6% observada entre as linhagens, a morfologia das asas dos adultos e a genitália dos machos e fêmeas são condizentes com os exemplares da Costa Rica de *C. aporema*. Consequentemente, broca-das-axilas da soja pode ser um complexo de espécies crípticas, morfologicamente muito similares.

Referências

AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. 19, p. 716–723, 1974.

- ALTESOR, P.; HORAS, V.R.; ARCIA, M.P.; ROSSINI, C.; ZARBIN, P. H. G.; GONZÁLEZ, A. Reproductive Behaviour of *Crociosema (=Epinotia) aporema* (Walsingham) (Lepidoptera: Tortricidae): Temporal Pattern of Female Calling and Mating. **Neotropical Entomology**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 324–329, 2010.
- BARRIONUEVO, M. J.; SANBLAS, G. Redescription of immature stages of the soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae). **Canadian Entomologist**, [S. l.], v. 148, n. 3, p. 247–259, 2016. DOI: 10.4039/tce.2015.62.
- BEHERE, G. T., TAY, W. T., RUSSELL, D. A.; BATTERHAM, P. Molecular markers to discriminate among four pest species of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of entomological research**, v. 98, n.6, p. 599-6032008.
- BIEZANKO, C.M. (1961). Olethreutidae, Tortricidae, Phalonidae, Aegeriidae, Glyphipterygidae, Yponomeutidae, Gelechiidae, Oecophoridae, Xylorictidae, Lithocolletidae, Cecidoseidae, Ridiashinidae, Acrolophidae, Tineidae e Psychidae da zona sueste do Rio Grande do Sul. **Arquivos de Entomologia da Escola de Agronomia Eliseu Maciel**, Série A, p.1-16.
- BOYKIN, L.M.; SHATTERS, R. G.; ROSELL, R. C.; MCKENZIE, C. L.; BAGNALL, R.; DE BARRO, P.; FROHLICH, D. R. Global relationships of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) revealed using Bayesian analysis of mitochondrial COI DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [S. l.], v. 44, n. 3, p. 1306–1319, 2007. DOI: 10.1016/j.ympev.2007.04.020.
- BUENO, A. F. Nota Técnica - Ocorrência de *Crociosema aporema* em soja-Bt na safra 22-23 e principais orientações de manejo. **Embrapa soja**, 2023.
- CHORLANGO, M. P. L. Contribución al estudio de la familia Tortricidae Latreille, 1803 (Lepidoptera), con especial referencia a la fauna Neotropical. Tesis Doctoral. [s.l: s.n.]. 2015.
- CLARKE, J. F. G. The correct name for a pest of legumes. [s.l: s.n.]. **Entomological Society Washiton**, v.56, n.6, p. 309-310, 1954.
- CORREÂ, A. S.; VINSON, C. C.; BRAGA, L. S.; GUEDES, R. N. C.; DE OLIVEIRA, L. O. Ancient origin, and recent range expansion of the maize weevil *Sitophilus zeamais*, and its genealogical relationship to the rice weevil *S. oryzae*. **Bulletin of Entomological Research**, [S. l.], v. 107, n. 1, p. 9–20, 2017. DOI: 10.1017/S0007485316000687.

- CORREA, B. S.; SMITH, J. G. Ocorrência e danos de *Epinotia aporema* (WALSINGHAM, 1914) (Lepidoptera: Tortricidae) em soja. **ANAIS da S.E.B.**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 74–78, 1976.
- DE BARRO, P.; AHMED, M. Genetic networking of the *Bemisia tabaci* cryptic species complex reveals pattern of biological invasions. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 10, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0025579.
- DE BARRO, P. J.; LIU, S. S.; BOYKIN, L. M.; DINSDALE, A. B. *Bemisia tabaci*: A statement of species status. **Annual Review of Entomology**, [S. l.], v. 56, p. 1–19, 2011. DOI: 10.1146/annurev-ento-112408-085504.
- DRUMMOND, A.J.; SUCHARD, M.A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, p. 1969–1973, 2012.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, pg. 564–567, 2000.
- FOERSTER, L. A.; IEDE, E. T.; SANTOS, B. B. Efeitos do ataque de *Epinotia aporema* (WALSINGHAM, 1914) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) em diferentes períodos de desenvolvimento da soja. **An. Soc. Entomol. Brasil**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 53–59, 1983. a.
- FROHLICH, D. R.; TORRES, I.J.; BEDFORD, I.D.; MARKHAM, P.G.; BROWN, J.K. A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. **Molecular Ecology**, v. 8, n. 10, p. 1683-1691, 1999.
- GILLIGAN, T. M. Advances in tortricid systematics and identification (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE). Dissertation, p. 194-196, 2012.
- GILLIGAN, T. M. Key to larval Tortricidae intercepted, or potentially encountered, at u. S. Ports of entry. [s.l: s.n.]. Disponível em: www.lepintercept.org, 2014.
- GILLIGAN, T. M.; PASSOA, S. C. *LepIntercept*, An identification resource for intercepted Lepidoptera larvae. Identification Technology Program (ITP). [s.l: s.n.]. 2014. Disponível em: <http://www.bio.ufpr.br/portal/insectbiocontrol/>.
- GILLIGAN, T. M. AND EPSTEIN, M. E. Tortricids of Agricultural Importance: *Crociosema aporema*. United States Department of Agriculture, Colorado State University. 2014 http://idtools.org/id/leps/tortai/Crociosema_aporema.html.

- GILLIGAN, T. M.; TEMBROCK, L. R.; FARRIS, R. E.; BARR, N. B.; VAN DER STRATEN, M. J.; VAN DE VOSSENBERG, B. T. L. H.; METZ-VERSCHURE, E. 2015. A multi-plex real-time PCR assay to diagnose and separate *Helicoverpa armigera* and *H. zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in the New World. PLoS One, v. 10, p. e0142912, 2015.
- HAYASHIDA, R.; HOBACK, W. W.; PATRICK, M. D.; BUENO, A.D. Re-evaluation of the Economic Threshold for *Crociosema aporema* (Walsingham, 2 1914) (Lepidoptera: Tortricidae) Injury to Indeterminate Soybeans. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://ssrn.com/abstract=4162525>.
- HEINRICH, Carl. Notes on and descriptions of some American moths. [s.l: s.n.]. v. 79, 1931
- HORIKOSHI, R.; BERNARDI, O.; GODOY, D.N. Resistance status of lepidopteran soybean pests following large-scale use of MON 87701 × MON 89788 soybean in Brazil. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 11, n. 1, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-00770-0.
- KLOTS, B. Alexander. Taxonomist's Glossary of Genitalia in Insects. [s.l: s.n.]. v. 1
- KRUSE, J.; SPERLING, F. Molecular Phylogeny Within and Between Species of the *Archips argyrospila* Complex (Lepidoptera: Tortricidae), **Ann. Entomol. Soc. Am**, v. 94, n. 2, p. 166-173, 2001.
- LUMLEY, L. M.; SPERLING, F. A. H. Integrating morphology and mitochondrial DNA for species delimitation within the spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) cryptic species complex (Lepidoptera: Tortricidae). **Systematic Entomology**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 416–428, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-3113.2009.00514.x.
- MEYRICK, B.A. Description of South-American Microlepidoptera. Entomological Society of London, v.6, 1917.
- NEVES, F.W.; SILVA, R.A. Primeiro registro de *Argyrotaenia sphaleropa* (lepidoptera: Tortricidae) na cultura da soja no Estado do Mato Grosso. **Brazil. Journ. Animal and Environ. Resear**, v.4, n.1, p.60-66, 2021.
- NYLANDER, J.A.A. MrModeltest v2. Program Distributed by the Author. **Evolutionary Biology Centre**, 2004.
- OLIVER, A. D.; CHAPIN, J. B. Biology and illustrated key for the identification of twenty species of economically important noctuid pests. [s.l: s.n.]. <http://digitalcommons.lsu.edu/agexp/260>.

- ORTIZ, M.V.; BOBADILLA, D.; VARGAS, H.; MAMANI, W. H.; GILLIGAN, T.M.; BROWN, J.W.M. Exploring DNA barcodes of neotropical and Afrotropical species of *Eccopsis zeller* (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of the Lepidopterists' Society**, v. 71, n. 4, p. 211–217, 2017.
- PAPADOPOULOU, A., ANASTASIOU, I.; VOGLER, A.P. Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the mid-Aegean trench calibration. **Molecular Biology and Evolution**, v.27, p. 1659– 1672, 2010.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J.P. MrBayes: Bayesian Phylogenetic Inference under Mixed Models. **Bioinformatics**, v. 19, p. 1572-1574, 2003. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>.
- RAZOWSKI, J.; WOJTUSIAK, J. Tortricidae from the Mountains of Ecuador. Part III: Eastern Cordillera (Insecta: Lepidoptera). v. 19, n.3, p. 497-575, 2008.
- RAZOWSKI, J.; WOJTUSIAK, J. Tortricidae (Lepidoptera) from Peru. **Acta zoologica cracoviensia**, v.53, n.3, p. 73-159, 2010. doi:10.3409/azc.53b_1-2.73-159
- RAZOWSKI, J.; BECKER, V. O. Systematics and Faunistics of Neotropical Eucosmini, 2: *Epinotia* Hübner, *Catastega* Clemens, and *Crocidosema* Zeller (Lepidoptera: Tortricidae). **Polish Journal of Entomology**, [S. l.], v. 83, n. 1, p. 23–59, 2014. DOI: 10.2478/pjen-2014-0003.
- RAZOWSKI, J.; BECKER, V. O. Systematics and faunistics of Neotropical Eucosmini, 3: *Epinotia*-group of genera (Lepidoptera: Tortricidae). **Polish Journal of Entomology**, [S. l.], v. 86, n. 4, p. 303–345, 2017. DOI: 10.1515/pjen-2017-0018.
- REGIER, J. C.; BROWN, J. W.; MITTER, C.; BAIXERAS, J.; CHO, S.; CUMMINGS, M. P.; ZWICK, A. A molecular phylogeny for the Leaf-Roller moths (Lepidoptera: Tortricidae) and its implications for classification and Life History evolution. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 4, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0035574.
- SOARES, P. L.; CORDEIRO, E. M. G.; SANTOS, F. N. S.; OMOTO, C.; CORREA, Alberto S. The reunion of two lineages of the Neotropical brown stink bug on soybean lands in the heart of Brazil. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-20187-6.
- SOSA-GÓMEZ, D. R. et al. Manual de Identificação de Insetos e Outros Invertebrados da Cultura da Soja (Embrapa Soja-Documents (INFOTECA-E), 2014.

3. EXPANSÃO DEMOGRÁFICA DE *Crocidosema aporema* ESTÁ ASSOCIADA AOS CULTIVOS DE SOJA NO BRASIL

Resumo

A broca-das-axilas, *Crocidosema aporema* (Lepidoptera: Tortricidae), historicamente é uma praga de soja encontrada na região Sul do Brasil, mas agora também reportada nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do país. No entanto, ainda pouco se sabe sobre a diversidade genética e os parâmetros demográficos históricos dessa espécie. Por este motivo, nós buscamos investigar a diversidade genética mitocondrial da broca-das-axilas presente nas regiões de soja no Brasil e inferir como essa diversidade está distribuída no tempo e no espaço, procurando por sinais de estruturação genética entre as populações. Paralelamente, nós investigamos o histórico demográfico da espécie procurando entender se a população passou por eventos de expansão recentes. Para isso, lagartas de broca-das-axilas foram coletadas ao longo de três anos nos cultivos agrícolas de soja do Brasil, para extração, amplificação e sequenciamento de DNA nas porções de dois genes mitocondriais, COI e COII, de 80 indivíduos. As amostras foram organizadas em regiões edafoclimáticas (Centro-Oeste, Sudeste 1, Sudeste 2, Sul 1, Sul 2, Sul 3), em dois grupos maiores (Centro-Oeste e Sul) e pela população total, sem agrupamento. A relação genética entre os haplótipos é recente ficando evidenciado pelo formato star-like da rede de haplótipos. Não houve estruturação em nenhum dos níveis ou grupos estabelecidos, revelando que a população forma uma unidade populacional com a diversidade distribuída de forma homogênea no espaço. Os índices de diversidade foram semelhantes entre todos os agrupamentos e para o total da população. Já as análises demográficas evidenciaram que as populações de *C. aporema* estão em expansão espacial e demográfica recentes em todas as regiões brasileiras. O tempo de expansão também foi semelhante independente do agrupamento. A análise bayesiana *skyline plot* revelou que a expansão populacional acompanhou a dinâmica de implementação e avanço da soja no Brasil, indicando que o histórico de expansão das populações da broca-das-axilas está intimamente relacionado ao cultivo e expansão da soja no Brasil. Por outro lado, os resultados não deram embasamento à ideia de que a população estaria colonizando as regiões mais ao norte, a partir das regiões ao sul e acompanhando o sentido da expansão da soja. Essa íntima relação da dinâmica populacional de *C. aporema* com os cultivos de soja reforça a necessidade um constante monitoramento de *C. aporema* em áreas de soja no Brasil.

Palavras-chave: Marcadores moleculares, Diversidade genética, Brocas-das-axilas, Paisagem agrícola

Abstract

The soybean bud borer, *C. aporema*, is secondary pest historically found in Brazilian South region, but now in soybean crops form Southeast and Middle east. Nonetheless, little is known about genetic diversity and demographic history of this is species. For this reason, we investigated the genetic mitochondrial diversity of soybean bud borer from Brazil and to infer how this diversity is distributed in time and space, looking for signs of genetic structure between populations. Besides, we also investigated the species demographic history looking for to understand if the population have experienced recent demographic and spatial expansions. For that, soybean bud borer caterpillar was collected in three consecutive years

in soybean fields from Brazil, for DNA extraction, amplification, and sequencing for two mitochondrial genes, COI and COII, from 80 individuals. The samples were grouped for six edaphoclimatic regions (Middle east 1, Southeast 1, Southeast 2, South 1, South 2, South 3), for two main groups (Middle east and South) and in total, without grouping. The genetic relation between the haplotypes is recent evidenced by star-like format of haplotype network. There were not structure signs for levels in any organized group, revealing that the population is made by a unique population unity with diversity homogeneously distributed in space. The diversity indexes were similar between all groups and with total population. Yet, the demographic analysis suggested that *C. aporema* population is in a recent spatial and demographic expansion for all regions. Besides, the time of expansion also were similar between groups. The Bayesian skyline plot analysis revealed that the population expansion followed the dynamic of adoption and breakthrough of soybean fields in Brazil indicating that the population expansion history of the bud borer is closely related to soybean crops. On the other side, the results could not support the idea of middle east colonization from south regions, following the soybean expansion direction from south. This intimate relation between population dynamics of *C. aporema* and soybean crops reinforces the necessity of *C. aporema* monitoring in soybean fields from Brazil.

Keywords: Molecular markers, Genetic diversity, Soybean bud borer, Agricultural landscapes

3.1. Introdução

A broca-das-axilas é um pequeno lepidóptero praga da espécie *Crociosema aporema* (Walsingham 1914), família Tortricidae, que ataca algumas espécies de plantas cultivadas, o que inclui soja (*Glycine max* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris*), alfafa (*Medicago sativa*) entre outras culturas. Historicamente, a broca-das-axilas tem sido reportada na região ao Sul do Brasil, principalmente no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Porém, recentemente relatos de broca-das-axilas em regiões mais ao norte, como São Paulo, Minas Gerais e Goiás ocorrendo em soja, chama a atenção a respeito da dinâmica populacional da espécie (HORIKOSHI et al., 2021). Parte da preocupação se explica por relatos de falha no controle da broca em áreas contendo a tecnologia inseticida *Bt* e um aumento na densidade populacional, incluindo as regiões onde é infrequente (HORIKOSHI et al., 2021; BUENO, 2023). Assim, a variação na densidade populacional e a ocorrência desigual das populações pode ser um indicativo de que as populações estejam estruturadas no espaço, podendo exigir táticas de controle mais específicas (SOARES et al., 2018).

A filogeografia tem como foco principal entender como a diversidade genética de uma certa espécie se distribui ao longo do espaço geográfico, bem como inferir sobre questões demográficas da população (FREELAND; KIRK, 2011; LOWE, 2017). Para *C. aporema* não existem relatos de estudos filogeográficos ou populacionais em nenhum local onde ocorrem, o que inclui o Brasil. Em um trabalho de monitoramento de cópula, os autores afirmaram que as

populações do Brasil e do Uruguai estariam evoluindo de forma alopátrica, mas sem embasamento filogeográfico (ALTESOR et al., 2010). Isso demonstra que o entendimento da variação genética para as populações, a existência e distribuição de diferentes linhagens ao longo do país, bem como a conectividade entre as populações que ocorrem no Brasil é desconhecido.

Considerando a posição do Brasil como um grande exportador de alimentos, cuidados fitossanitários são de extrema importância, pois muitas espécies nativas, como *C. aporema* são consideradas pragas quarentenárias em algumas regiões do mundo, como nos Estados Unidos (GILLIGAN, 2012). Apesar de não serem classificadas como pragas de importância primária, a família Tortricidae apresenta muitas espécies de elevada importância econômica, o que justifica cuidados preventivos em relação à broca-das-axilas *C. aporema* (REGIER et al., 2012). Nesse sentido, descobrir se existem diferentes linhagens dentro da espécie, bem como a distribuição das possíveis linhagens, pode auxiliar no desenvolvimento de táticas de manejo fitossanitários, possibilitando a identificação dos locais de origem e em última análise no manejo dessas populações (ARIAS et al., 2019).

Existem duas possibilidades em relação às populações que recentemente foram relatadas. A primeira possibilidade é das populações que estão aparecendo mais ao centro do país serem populações locais. Alternativamente, as populações da região Sul podem estar subindo em direção ao norte, acompanhando a expansão da soja e se adaptando às condições climáticas mais quentes. A segunda hipótese parece ser mais plausível considerando o histórico de problema com a praga restrita à região Sul (IEDE, 1980; FOERSTER et al., 1983). Adicionalmente, a população pode apresentar algum nível de estruturação, com certos haplótipos sendo específicos de determinadas regiões.

A estruturação das populações pode ser fruto do isolamento entre subpopulações, de adaptações locais em resposta a variáveis do ambiente, ou ainda pela presença de barreiras geográficas ou eventos de vicariância, impedindo a conexão entre as populações (FREELAND; KIRK, 2011). Como exemplo, a espécie *Euchistus heros* (Fabricius) é formada por duas linhagens distintas presentes no Brasil divididas pela Floresta Amazônica e o Cerrado Brasileiro, que evoluíram de forma alopátrica, fruto de vicariância, mas que estão sendo colocadas em contato pela expansão da soja (SOARES et al., 2018). Assim, a presença de estruturação na população pode ser um indicativo de baixo fluxo gênico, mantendo linhagens haplotípicas desiguais, e conseqüentemente, genótipos distintos, para cada população, que ao longo do tempo pode resultar em especiação (SCHMITT; THAUBRICH,

2008; KERGOAT et al., 2012). Em síntese, as diferentes estruturas podem conter características dispare, em que as populações contendo linhagens genéticas específicas podem apresentar adaptações característica para as diferentes pressões de seleção (SLATKIN, 1987; CHOUPINA; MARTINS, 2015; HICKMANN et al., 2021).

Desse modo, nosso objetivo com o presente capítulo foi estimar a diversidade genética de *C. aporema* no Brasil e entender como ela está distribuída no espaço e no tempo. Complementarmente, a demografia e histórico populacionais foram estimados para a população em soja, avaliando se houve expansão recente. Com esse intuito, indivíduos de broca-das-axilas, coletados em diferentes regiões brasileiras produtoras de soja, foram sequenciados nas regiões dos genes mitocondriais COI e COII para se estimar a diversidade populacional e demografia histórica das populações.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Amostragem

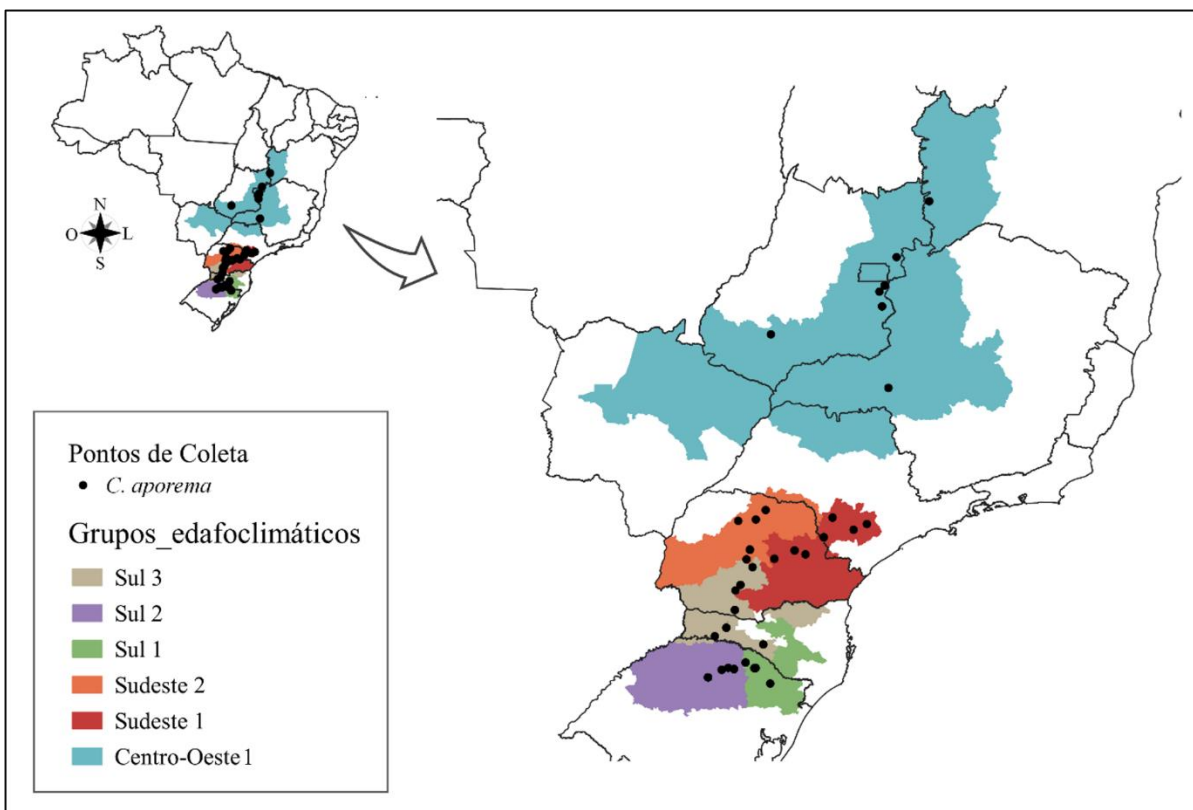


Figura1. Mapa do Brasil contendo os pontos de coleta para *Crocidosema aporema* ao longo dos anos 2020 a 2022, agrupados por características edafoclimáticas, mesorregiões da soja e distância geográfica.

As amostras utilizadas na análise filogeográfica foram coletadas em 8 estados diferentes em 34 pontos, distribuídos em importantes áreas produtoras de soja, ao longo de 3 anos, sendo identificado apenas os pontos com presença. Dentre as lagartas coletadas, algumas foram mantidas em laboratório até a fase adulta, para análise morfológica prévia e posteriormente utilizadas para a análise filogeográfica. Ao todo, 80 indivíduos de *C. aporema* foram utilizados, (Figura1). As amostras foram divididas e classificadas em 6 grupos considerando os parâmetros edafoclimáticos (dados do IBGE), mesorregiões da soja (EMBRAPA - Soja), e distância geográfica entre os pontos de coleta (Km), sendo eles: Centro-Oeste1 (azul), Sudeste1 (vermelho), Sudeste2 (laranja), Sul1 (verde), Sul2 (roxo), Sul3 (cinza) (Figura 1). Complementarmente, as amostras foram divididas em dois grupos, Centro-Oeste (amostras de MG e GO) e Sul (demais regiões) para uma visão mais ampla com os agrupamentos.

3.2.2. Extração de DNA, amplificação e sequenciamento

Para a extração de DNA apenas a região do tórax e cabeça das lagartas e adultos foi utilizada. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e a extração realizada com CTAB e proteínase K, com base no trabalho de Soares et al., (2018). Após a extração do DNA, a qualidade do DNA extraído foi avaliada por meio de gel em agarose a 0,8% através de luz *uv*. Todas as etapas de extração foram realizadas no laboratório de Ecologia Molecular de Artrópodes, ESALQ.

O DNA mitocondrial na porção do *citocromo c oxidase subunidade I* (COI) foi amplificado utilizando os primers universais *forward* LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG- 3') e *reverse* HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA- 3').

O gene da região *citocromo c oxidase subunidade II* (COII) foi incluído nas análises para aumentar a possibilidade de se captar variações genéticas na população (JI et al., 2003). Os primers utilizados para amplificar a região COII foram: Patrick *forward* (5' CTAATATGGCAGATTATATGTAATG 3') e COII Eva *reverse* (5' GAGACCATTACTTGCTTTCAGTCAT).

As reações de PCR tiveram a mesma base, para ambos os genes, contando com: 13,7µL de H₂O; 2,5µL da PCR *buffer* 10x (Invitrogen); 2 µL MgCl₂ (50mM); 1,5 µL dNTP (2,5 mM); 1 µL de cada primers *forward* + *reverse*; Taq Polimerase 0,3µL (Invitrogen); 3µL

de DNA, totalizando 25 µL por reação. Entretanto, algumas amostras exigiram adaptações na quantidade de magnésio e de DNA, de acordo com a qualidade de cada uma, mantendo-se o volume final. Para o gene COI, as condições de amplificação foram as mencionadas no capítulo anterior. Já para o gene COII as condições foram: um primeiro ciclo de desnaturação a 94°C por 5 min; segundo ciclo de anelamento, polimerização e extensão, repetido 37 vezes, inicialmente por 35 segundos a 94°C, 40 segundos a 62°C, finalizando com 90 segundos por 72°C; e um último ciclo por 10 minutos a 72°C. Ao final do processo, os amplicons foram mantidos no termociclador em 4°C, para posteriormente serem armazenados em freezer a -20°C.

Os amplicons resultantes foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, sob luz *uv*, para verificar se a reação de amplificação funcionou, de acordo com o tamanho e intensidade do brilho dos fragmentos. Essa etapa também auxiliou no cálculo da concentração de amplicons, necessário para o sequenciamento dos genes, que toma por base uma quantidade de DNA referência, com concentrações conhecidas, permitindo estimar a quantidade em nano-gramas de amplicons, por microlitro de amostra. As amostras foram enviadas para sequenciamento *Sanger* no CBTEC/ESALQ-USP, sendo cada gene e cada sentido da fita, sequenciados de forma independente para cada amostra.

Os perfis cromatográficos resultantes foram inicialmente analisados quanto a qualidade, eliminando-se as porções iniciais e finais das sequências, que contém as regiões de anelamento dos primers e ruídos. A integridade e confiabilidade das bases foi mantida pela sobreposição das regiões *forward* e *reverse* dos genes para cada indivíduo, mantendo os picos claros e consistentes. Uma sequência consenso foi criada para auxiliar no processo de edição da qualidade dos cromatogramas, mantendo-se um tamanho uniforme para cada indivíduo, e confirmando se nenhum polimorfismo foi criado no processo de edição das sequências. Essas etapas foram conduzidas por meio do software *Benchling [Biology Software] (2022)*. A presença de *NUMTs* (fragmentos de DNA nuclear na mitocôndria) foi checado, pelos critérios: i) presença de *indels* que introduzem *frameshifts* no DNA; ii) códigos de parada no DNA que interrompem a síntese proteica; iii) ausência do viés de mutações na terceira posição dos códons. Não foi constatada a presença de *NUMTs* nas amostras.

Após a edição, as sequências foram concatenadas para cada indivíduo, isto é, as regiões do COI com COII foram unidas, aumentando o tamanho da sequência, e conseqüentemente a quantidade polimorfismos observados, conferindo mais suporte às análises. As sequências foram então alinhadas pelo método *ClustalW*, com as especificações *default*, e o melhor modelo evolutivo para os dados foi checado pelo critério *AICc* através do

software *MEGAX* (KUMAR et al., 2018). Em seguida, as sequências foram separadas para os 6 grupos definidos, de acordo com as características dos locais geográficos onde os indivíduos foram coletados, como mencionado anteriormente.

3.2.3. Análise de diversidade e relação genética entre haplótipos

O número de haplótipos (h), a diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π), o número de sítios variáveis (S), o número médio de diferenças nucleotídicas por sequência (k), foram calculados para os seis grupos estabelecidos com o software DNAsp V.5 e para as duas regiões (ROZAS et al., 2017). Os cálculos foram realizados considerando o total das amostras, sem hierarquias (subgrupos), e para os 6 agrupamentos (grupos). Complementarmente, o cálculo de correlação de Pearson foi feito para se verificar uma possível associação e efeito da amostragem sobre os índices de diversidade, no software R.Studio V.4.4.

As relações genealógicas entre os indivíduos foram calculadas pela análise de Network no software PopArt (Population Analysis with Reticulate Trees), com o método Median-Joining MJ (LEIGH AND BRYANT, 2015). Os agrupamentos para a análise de network foram os mesmos utilizados no cálculo de estruturação. A coloração foi realizada de acordo com os grupos na Figura 1, para cada haplótipo.

Para os dois grupos Centro-oeste e Sul, os índices de diversidade também foram gerados, assim como uma nova rede de haplótipos, pelos mesmos métodos, a fim de melhor visualizar os resultados.

3.2.4. Estrutura genética

As análises de variância molecular (AMOVA) e a diferenciação genética *pairwise Fst* (WRIGHT, 1951) foram estimadas para verificar a existência de uma possível estruturação das amostras na população como um todo e por entre os diferentes agrupamentos, decompondo-se as fontes de variância dos dados. O cálculo da amova com a separação das fontes de variação levou em conta a presença de estruturação entre os indivíduos dentro de cada local (pontos), entre os locais geográficos (entre os pontos) e entre os grupos (Centro-Oeste 1, Sudeste 1, Sudeste 2, Sul 1, Sul 2, Sul 3). As análises foram realizadas no software Arlequin v.3.5 com os parâmetros de Bootstrap contando com 1000 réplicas, e significância a

5% (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). A estruturação genética também foi calculada considerando somente os grupos Norte e Sul.

3.2.5. Inferências genealógicas e demografia populacional

Os testes de neutralidade de Tajima (D) (TAJIMA, 1989) e o F_s de Fu (FU, 1997) foram calculados para o total dos indivíduos e para os agrupamentos, revelando as populações que estão em expansão, retração ou equilíbrio, por meio do ARLEQUIN v.3.5. (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Essas análises de neutralidade e expansão foram realizadas por 1000 permutações, com simulação de coalescência, significância estatística considerada em um intervalo de 95% de confiabilidade e p -valor menor do que 0,05 para Tajima e 0,02 para o F_s de Fu. Adicionalmente, os parâmetros de Tau (τ) foram estimados utilizando o modelo de quadrados mínimos generalizados, a 95% de confiança e 1000 simulações coalescentes (EXCOFFIER, L.; LISCHER, 2010). Existe uma correlação positiva entre o índice de Tau e o tempo da expansão populacional, que auxilia a estimar se a expansão se deu de forma recente ou não, inferida pela equação $t = \tau/2u$; $u = \mu L$, onde (t) representa o tempo para expansão populacional, o parâmetro μ representa a taxa de mutação estimada, L o tamanho das sequências e (g) o tempo médio das gerações. Esses índices foram calculados para o total das amostras, para os seis agrupamentos e para as regiões Centro-oeste e Sul.

Além disso, a análise de distribuição das somas dos desvios quadrados (SSD) e o índice *raggedness* (r), foram conduzidas e comparadas a um p -valor indicando o *godness-of-fit* (qualidade do modelo calculado para os resultados observados) para a expansão populacional. O teste SSD apresenta a hipótese nula da expansão espacial populacional, enquanto o (r) revela se a população apresenta uma expansão unimodal, marcada por uma expansão recente e intensa ou multimodal, por diferentes momentos de expansão. Em ambos os testes a expansão populacional se dá pela não significância dos índices.

Por fim, a reconstrução da demografia histórica da população foi realizada com o cálculo Bayesian Relaxed Skyline Plot (Bayesian Skyline Plot) (ROGERS; HARPENDING, 1992). Para essa etapa, todos os haplótipos foram utilizados como entrada, pois não houve estruturação nas etapas anteriores. Assim, a idade relativa estimada de divergência entre os haplótipos foi realizada com a concatenação dos genes mtDNA no software BEAST v.1.8.4 67. O modelo de substituição foi previamente determinado pelo software PARTITIONFINDER v. 1.1.1, como HKY. Para a estimativa da taxa de substituição, foi utilizado o tipo de relógio-molecular estrito e modelo evolutivo do tipo árvore de coalescência

com tamanho médio populacional normal, e os demais parâmetros nos valores padrão do software e distribuição gama (SOARES et al., 2018). O relógio molecular foi tomado como base o de inseto para o genoma mitocondrial, equivalente a 3.54% de divergências nucleotídicas por milhões de anos, equivalente a 0.0177, considerando a haploidia do genoma mitocondrial (PAPADOPOULOU et al., 2010.). Os parâmetros foram estabelecidos por meio do software BEAUTY, determinando 150 milhões de gerações. A qualidade do modelo evolutivo de simulação de coalescência foi verificada por meio do TRACER v.1.6. O modelo resultante foi aceito por apresentar as medidas de tamanho efetivo amostral (ESS) superiores a 200, com média calculada e 95% de intervalo de densidade posteriori (HPD) para o tempo de divergência. Um gráfico foi gerado para se visualizar o tempo estimado de expansão espacial, com 95% HPD.

3.3. Resultados

3.3.1. Diversidade e relação genética entre haplótipos

O tamanho dos fragmentos de DNA sequenciados variou entre 610 e 780 pb para o gene COI e entre 650 e 900 pb para o gene COII. Assim, o tamanho do fragmento concatenado dos dois genes foi de 1289 pb, sendo 657pb provenientes do COI e 632 do COII, após padronização do tamanho e edição dos cromatogramas.

Dentre os 80 indivíduos, o número total de haplótipos (h) foi de 31, em que 21 haplótipos foram de ocorrência única e dois amplamente distribuídos, haplótipo 6 encontrado em 25 locais, e haplótipo 1 encontrado em 14 locais (Tabela 1 e Figura 2). O número de haplótipos por grupo variou entre 6 e 12. A diversidade haplotípica Hd total foi de 0,870 e a diversidade nucleotídica de $\pi = 0,00172$, indicando um alto número de haplótipos com poucas diferenciações nucleotídicas entre eles, ou seja, separados por poucos passos mutacionais. Ao todo, o número de sítios polimórficos entre os haplótipos (S) foi de 40 regiões, com um número médio de substituições nucleotídicas (K) de apenas 2,22 mutações. Dentro dos seis grupos, os índices de diversidade como o número de haplótipos (h), o número de sítios polimórficos (S), o número médio de diferenças nucleotídicas (k), a diversidade haplotípica (Hd), a diversidade nucleotídica (π), para cada um foram respectivamente (Tabela 2): (Centro-Oeste 1) $h = 6$, $S = 8$, $k = 1,78$, $Hd = 0,836$, $\pi = 0,00138$; (Sudeste 1) $h = 9$, $S = 12$, $k = 1,81$, $Hd = 0,767$, $\pi = 0,00141$; (Sudeste 2) $h = 7$, $S = 11$, $k = 3,15$, $Hd = 0,911$, $\pi = 0,00245$; (Sul 1) $h = 6$, $S = 10$, $k = 2,38$, $Hd = 0,833$, $\pi = 0,00185$; (Sul 2) $h = 12$, $S = 16$, $k = 2,25$, $Hd = 0,922$,

$\pi = 0,00175$; (Sul 3) $h = 8$, $S = 13$, $k = 2,22$, $Hd = 0,858$, $\pi = 0,00173$. Assim, a diversidade haplotípica entre os grupos foi alta, sendo um pouco maior nos grupos Sudeste 2 e Sul 2, e menor no Sudeste 1. Já a diversidade nucleotídica foi baixa, sendo um pouco maior para o Sudeste 2 e menor para o Centro-Oeste 1 (Tabela 2). As maiores diferenças nucleotídicas foram observadas para o Sudeste 2.

O tamanho amostral influenciou positivamente ($R = 0.89$) o número de haplótipos encontrados por agrupamento ($t = 4.08$, $df = 4$, $p\text{-value} = 0.01507$), mas não a diversidade haplotípica ou nucleotídica. Também não houve correlação significativa entre as diversidades haplotípica e nucleotídica.

Tabela1. Locais de coleta, com coordenadas geográficas, número e tipos de haplótipos para *Crociosema aporema* e os 6 agrupamentos. H = Número total de haplótipos encontrados em cada local

Local	Latitude	Longitude	Grupo	H	Haplótipos
Cristalina	-16.8326	-47.5403	Centro-Oeste	2	H1, H9
Cristalina	-16.1780	-47.4572	Centro-Oeste	5	H1, H6, H11, H12, H24
Cristalina	-16.3731	-47.6228	Centro-Oeste	1	H1
Formosa	-15.2982	-47.0890	Centro-Oeste	1	H6
Perdizes	-19.3732	-47.3423	Centro-Oeste	2	H1, H6
Boa Ventura do São Roque	-23.4758	-51.4784	Sul 3	1	H13
Condói	-24.9599	-51.5814	Sul 3	2	H8, H14
Coronel Domingos Soares	-25.5129	-51.9578	Sul 3	4	H1, H2, H3
Coronel Domingos Soares	-26.2956	-52.1332	Sul 3	2	H6
Foz do Jordão	-25.6861	-52.1146	Sul 3	1	H6
Londrina	-23.1806	-51.1718	Sudeste 2	1	H21
Manoel Ribas	-24.4188	-51.6651	Sudeste 2	3	H1, H4
Manoel Ribas	-24.4099	-51.6640	Sudeste 2	2	H1, H8
Piraí do Sul	-24.5601	-49.9295	Sudeste 1	1	H16
Pitanga	-24.7161	-51.7700	Sudeste 2	1	H22
Reserva	-24.6980	-50.8999	Sudeste 1	3	H1, H5, H15
Tibagi	-24.4399	-50.2693	Sudeste 1	3	H6
Capão Bonito do Sul	-28.1015	-51.4854	Sul 1	3	H6, H7, H25
Colorado	-28.3948	-52.9703	Sul 2	7	H5, H6, H8, H17, H23
Coxilha	-28.0990	-52.3392	Sul 2	1	H6
Lagoa Vermelha	-28.1074	-51.5270	Sul 1	2	H15, H17
Não me Toque	-28.1074	-51.5270	Sul 2	1	H28
Passo Fundo	-28.1584	-52.5422	Sul 2	3	H6, H26, H27, H29
Samanduva	-27.9313	-51.7982	Sul 1	3	H2, H19
Vacaria	-28.5866	-51.0289	Sul 1	1	H6
Vila Langaro	-28.1352	-52.1580	Sul 2	5	H1, H6, H8, H10, H19
Campos Novos	-27.3675	-51.2459	Sul 3	2	H5, H6
Chapecó	-27.1112	-52.7598	Sul 3	2	H1, H6
Guatambú	-27.1112	-52.7598	Sul 3	1	H8
Xanxerê	-26.8473	-52.3979	Sul 3	4	H1, H20, H21
Buri	-23.7950	-48.4297	Sudeste 1	1	H6
Itaí	-23.4146	-49.0842	Sudeste 1	4	H6, H30, H31
Itapetininga	-23.6149	-48.0121	Sudeste 1	1	H18
Itararé	-24.0280	-49.3590	Sudeste 1	3	H6, H7

Tabela 2. Número de insetos, número de haplótipos (H), número de sítios polimórficos (S), diversidade haplotípica (hd), diversidade nucleotídica (π) e número médio de diferenças polimórficas (k) por agrupamento.

Grupo	n° insetos	H	S	hd	π	k
Centro Oeste 1	11	6	8	0.836	0.0013	1.78
Sudeste 1	16	9	12	0.767	0.0014	1.81
Sudeste 2	8	6	10	0.893	0.0024	3.00
Sul 1	9	6	10	0.833	0.0018	2.38
Sul 2	18	12	16	0.922	0.0017	2.25
Sul 3	18	9	15	0.882	0.0018	2.41
Brasil	80	31	40	0.870	0.0017	2.22
Centro-Oeste	11	6	8	0,836	0,00138	1,78
Sul	69	27	34	0,874	0,00177	2,28

A análise de network indicou o padrão tipo estrela para a população de *C. aporema* no Brasil, reforçando a hipótese de expansão populacional. Adicionalmente é possível se verificar o excesso de alelos na rede como um todo, conectados por poucas mutações e com a maioria dos haplótipos derivados de h6 e h1, evidenciando uma ampliação demográfica recente. Também é possível se verificar a ausência de estruturação por entre os agrupamentos em que os haplótipos se distribuem de forma aleatória dentro das regiões (coloração) (Figura 2). Resultados semelhantes foram obtidos quando as amostras foram divididas pelas regiões Norte e Sul, indicando que ambas as regiões estão em expansão e apresentam os mesmos alelos dominantes, bem como maior número de alelos de baixa frequência.

Para as duas regiões, os índices de diversidade foram próximos entre si, apesar da diferença no tamanho amostral, Centro-oeste = 11, Sul = 69 indivíduos. O grupo Centro-Oeste apresentou os seguintes índices: $h = 6$; $S = 8$; $k = 1,78$; $Hd = 0,836$; $\pi = 0,00138$. Já para o grupo Sul os índices foram: $h = 27$; $S = 34$; $k = 2,28$; $Hd = 0,874$; $\pi = 0,00177$. A análise de network manteve o formato estrela, mas evidenciou a expansão na região Sul do país (Figura 3).

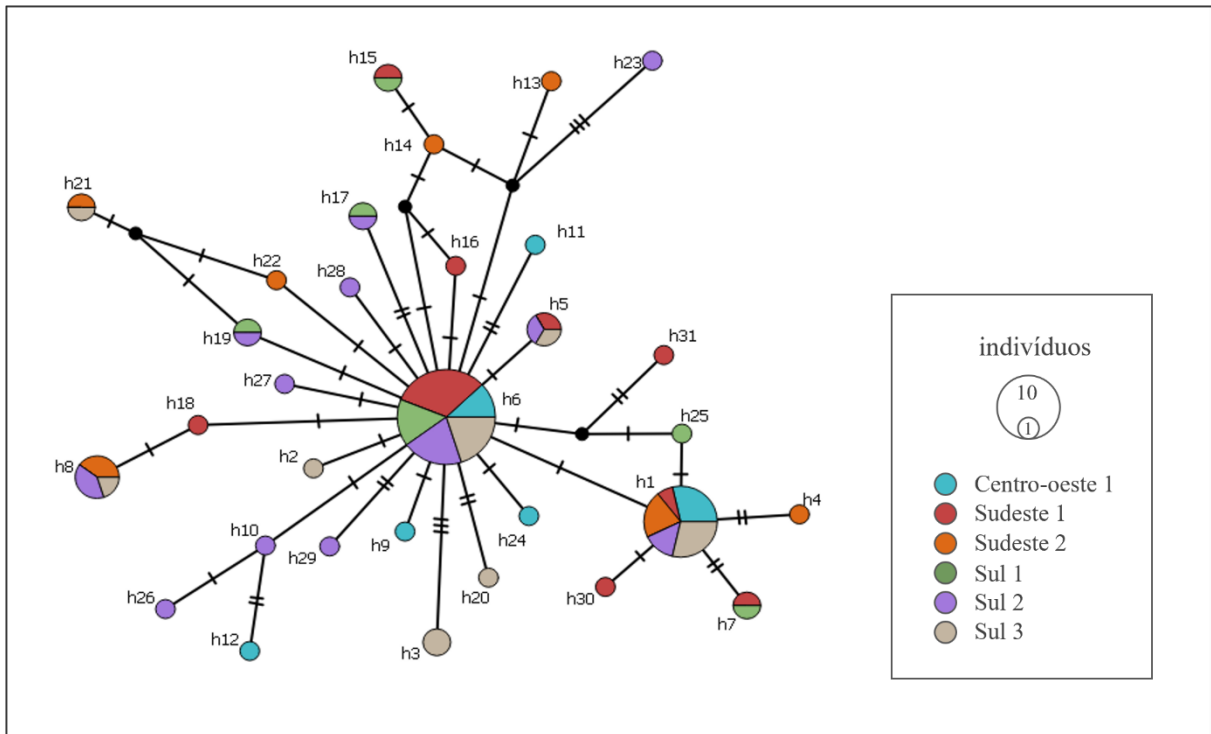


Figura 2. Análise de agrupamento network, com os haplótipos de *Crocidosema aporema* identificados por grupo (Centro-Oeste 1- azul, Sudeste 1- vermelho, Sudeste 2- laranja, Sul 1- verde, Sul 2- roxo, Sul 3- cinza).

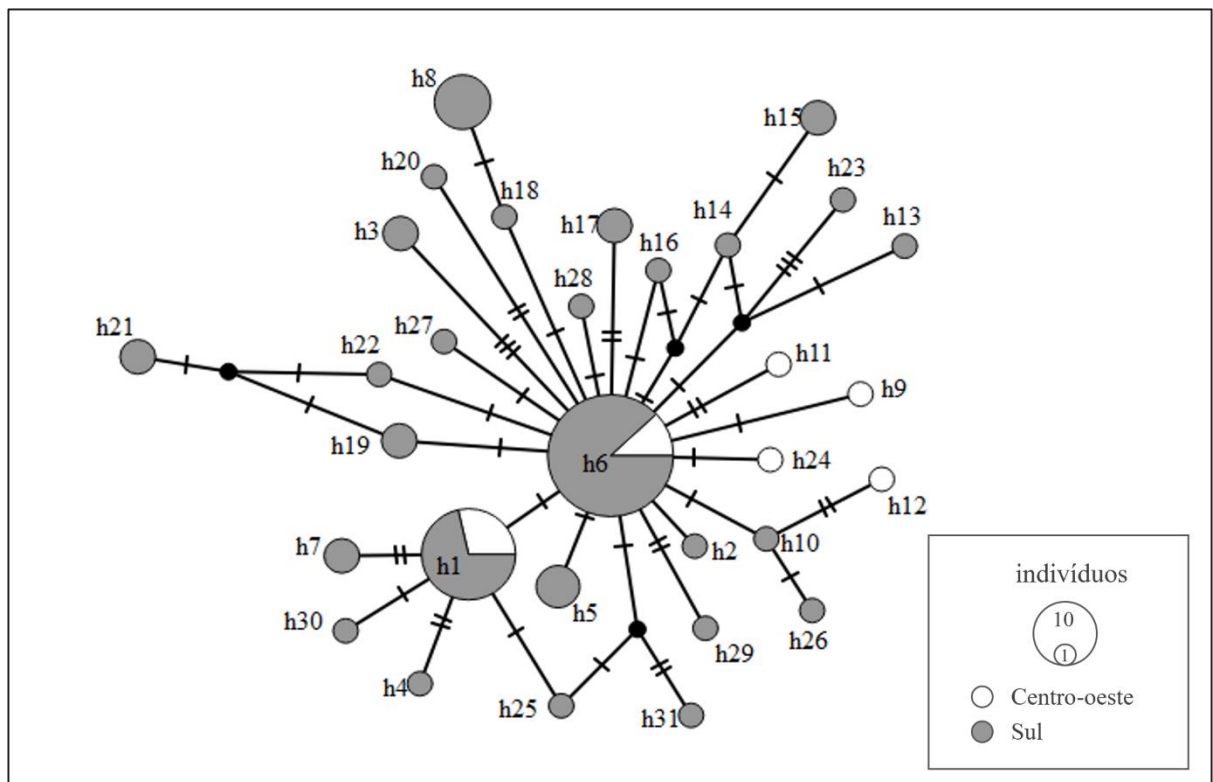


Figura 3. Análise de agrupamento network com os haplótipos de *Crocidosema aporema* identificados por região Centro-Oeste- branco, Sul – cinza.

3.3.2. Estrutura genética

A análise de variância molecular (AMOVA) não revelou significância para estruturação da população, com a maior variância sendo observada dentro dos locais de coleta (98%). Assim, independentemente do agrupamento feito, a população se constitui de uma unidade populacional (Tabela 3). Para a hierarquia em grupos, a maior fonte de variação da diversidade também foi dentro de cada local de coleta explicando 97,61% da variação observada. Não houve p significativo para nenhum nível hierárquico reforçando que a diversidade está distribuída ao longo dos locais de coleta. Resultado semelhantes foram encontrados para as amostras organizadas nas duas regiões norte e sul.

Tabela 3. Análise da variância molecular (AMOVA) para a estruturação genética das populações de *Crociosema aporema*, total e por grupamentos.

Divisão	Fonte de variação	<i>g.l.</i>	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da variância	Índices de fixação (<i>p</i> -valor)
Locais de coleta	Entre as populações	33	36.00	0.0208	1.96	Fst = 0.019 (0.3)
	Dentro das populações	46	47.95	1.0425	98.04	
	Total	79	83.96	1.0634		
Grupos	Entre grupos	5	2.73	0.0088	2.03	Fct = 0.003 (0.14)
	Entre populações dentro dos grupos	28	12.02	0.0015	0.35	Fsc = 0.023 (0.42)
	Dentro das populações	46	19.6	0.4262	97.61	Fst = 0.020 (0.14)
	Total	79	34.37	0.4366		

3.3.3. 4.4. Demografia e história populacional

Os testes de Neutralidade de Tajima (*D*) e de Fu (*F_s*) para o total da população revelaram valores negativos e significativos, com alfa = 5%, $p < 0,05$ (*D*) e $p < 0,02$ (*F_s*), indicando expansão populacional demográfica recente ou seleção purificadora, com excesso de polimorfismos de baixa frequência (Tabela 4). Por outro lado, quando se olha para os agrupamentos em específico, apenas as regiões do Sudeste 1 e Sul 2 revelaram expansão populacional para os dois índices, com valores significativos e negativos. O grupo Sul 1 foi significativo apenas para o teste *D* de Tajima. As regiões do Centro-Oeste 1, Sul 3 e Sudeste 2, apesar de revelar índices com valores negativos, não foram significativos ao nível de *p* estabelecido (Tabela 4). Os índices demográficos foram semelhantes quando as duas regiões foram utilizadas, sendo significativos para ambas. Porém, vale destacar que a região Norte não apresentou valores significativos de *F_s* de Fu para expansão populacional (Tabela 4). Assim, mesmo com algumas diferenças a ausência de estruturação permite a inferência da expansão populacional como um todo.

Os índices de *mismatch* SSD para a hipótese nula de expansão espacial não foram significativos ($p > 0,05$), aceitando a hipótese nula de expansão para a população total, para os

seis agrupamentos, bem como para as duas regiões (Tabela 4). Do mesmo modo, os índices *raggedness* deram suporte ao modelo de expansão espacial, de forma unimodal, também para a população total, para os seis grupos e para as duas regiões (Tabela 4). Por fim, aparentemente todos os agrupamentos revelaram semelhança nos valores calculados de Tau (τ), em que o intervalo de confiança de 95% não indicou diferenças entre os agrupamentos e a população total para a idade da expansão populacional (Tabela 4). O mesmo resultado foi observado para as regiões Norte e Sul. Isso indica que a expansão populacional ocorreu dentro de um tempo semelhante, na população como um todo independentemente da região, pois como visto anteriormente não apresenta estrutura.

A análise de BSP (*Bayesian Skyline Plot*) confirmou que a expansão populacional observada se deu em um período muito recente, iniciando dentro dos últimos 150 anos até o presente, 2023. O início do crescimento populacional da broca-das-axilas coincide com o início do cultivo da soja na região Sudeste e Sul do país no século XX, entre 1900 e 1914 (SOUZA & BUSH, 1998). A partir de então, a população continua se expandindo em tamanho efetivo, o que coincide com os períodos de produção em larga escala de soja e consequentemente, surtos populacionais da praga, dado o aumento no tamanho populacional, por volta de 1960 a 1980. A expansão populacional ocorre até próximo de 2010, estabilizando em um crescimento próximo a zero, até que passa a apresentar uma inflexão na curva, com um crescimento negativo no tamanho populacional (Figura 4). Por fim, próximo a data de 2023, nos últimos 5 anos, há evidências de que a população estria apresentando um crescimento positivo, novamente (Figura 4).

Tabela 4. Número de indivíduos, índices demográficos de Tajima (D) e (F_s) de Fu, parâmetro Tau (τ) estimador do tempo de expansão populacional e índices de expansão espacial (SSD) e ragdness (r) para cada agrupamento de *Crocidosema aporema*.

Agrupamento	Nº	Tajima's (D)	F_s de Fu	SSD (p-valor)	r (p-valor)	τ ($\alpha = 95\%$)
Centro-Oeste 1	11	-1.38	-1.81	0.008 (0.6)	0.069 (0.6)	1.4 (0.0 - 3.3)
Sudeste 1	16	-2.12 *	-5.19**	0.007 (0.5)	0.054 (0.5)	0.8 (0.9 - 3.8)
Sudeste 2	8	-1.16	-1.42	0.032 (0.5)	0.139 (0.4)	3.6 (2.0 - 5.3)
Sul 1	9	-1.82	-2.17	0.001 (0.9)	0.027 (0.9)	2.3 (0.7 - 4.5)
Sul 2	18	-1.89	-8.52**	0.007 (0.1)	0.075 (0.07)	2.3 (1.4 - 3.1)
Sul 3	18	-1.54	-2.94	0.008 (0.3)	0.037 (0.5)	2.0 (1.6 - 4.1)
Brasil	80	-2.36*	-27.19**	0.0005 (0.75)	0.036 (0.34)	2.08 (0.6 - 4.9)
Centro Oeste	11	-1.38 *	-1.81	0.0005 (0.7)	0.029 (0.4)	1.9 (0,9 - 3,2)
Sul	69	-2.30 *	-23.72**	0.0088 (0.4)	0.069 (0.4)	1.1 (0,0 - 4,1)

* $p < 0.05$; ** $p < 0.02$

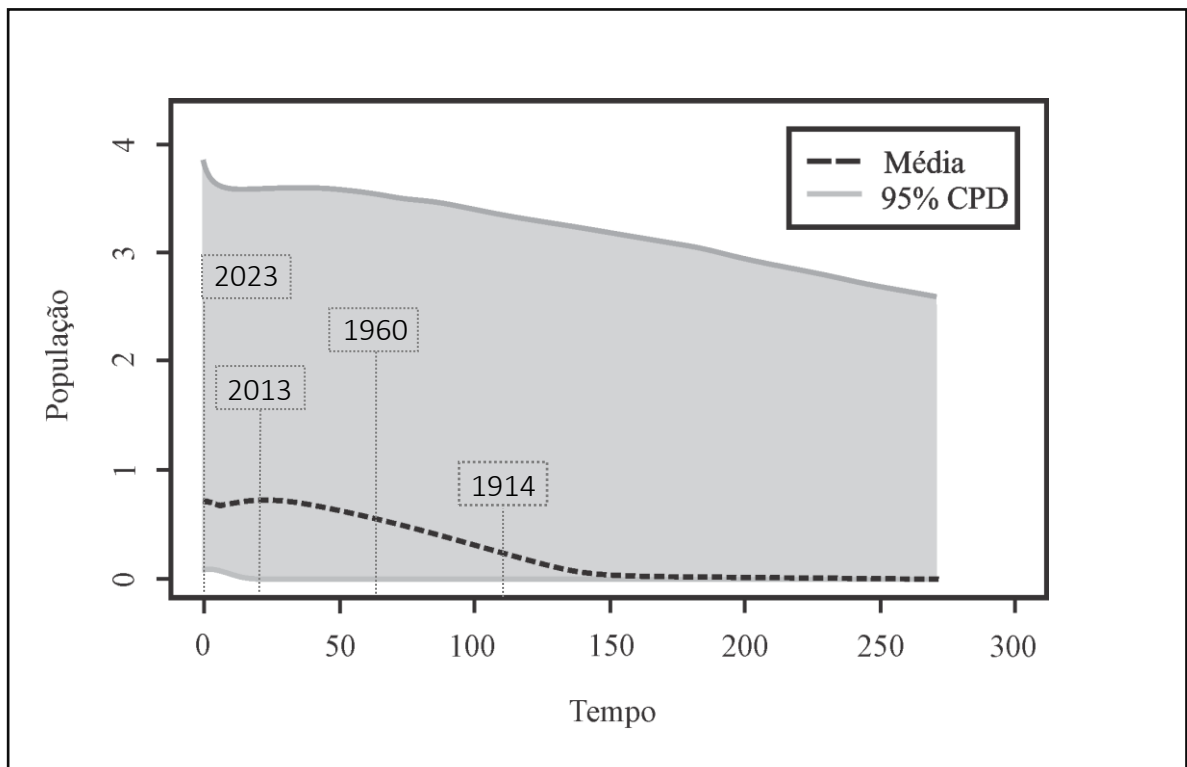


Figura 4. Dinâmica populacional nos últimos 250 anos para a população de *Crocidosema aporema* pelo Bayesian Skyline Plot dado pelo Tempo de expansão populacional (anos) e tamanho efetivo estimado da População (N_e). As barras indicam os períodos importantes para o cultivo e manejo da soja no Brasil: início do cultivo-1914; expansão do cultivo e aumento de produção – por volta de 1960; adoção da tecnologia transgênica *Bt* -2005; tempo recente- 2023.

3.4. Discussão

Os resultados revelaram que a espécie *C. aporema* forma uma unidade populacional homogênea em soja ao longo do Brasil, com a diversidade mitocondrial distribuída de forma similar no espaço. Os índices de diversidade foram semelhantes independentemente da região, agrupamento, ou total, da população. Somado a isso, não houve estruturação significativa entre pontos de coleta, regiões geográficas, mesorregiões da soja ou características edafoclimáticas, pela análise AMOVA. Os índices de diversidade e a análise de network apontam para um excesso de alelos de baixa frequência distribuídos de forma aleatória ao longo do espaço geográfico, com poucos haplótipos dominantes. Esse padrão parece ser característico de pragas de Lepidoptera que ocorrem na soja no Brasil, como em *Anticarsia gemmatalis* (SOSA-GOMES, 2004a), *Chrisodeixys includens* (SILVA et al., 2020), *Spodoptera frugiperda* (ARIAS et al., 2019), que sofreram expansão populacional recente, com excesso de haplótipos de baixa frequência e poucos haplótipos de alta frequência, bem como a ausência de estruturação genética. Desse modo, a ausência de estruturação e expansão populacional recente foi marcada pela expansão da população como um todo, independente da região geográfica amostrada.

Os sistemas agrícolas de monocultivo trazem uma instabilidade à paisagem, alternando entre abundância de alimentos para uma escassez de recursos nas épocas de entressafra (DOURADO et al., 2021; HORIKOSHI et al., 2022). Nesse sentido, as subpopulações presentes na paisagem agrícola passariam por um processo de colonização e crescimento intensos, seguido de uma redução drástica na densidade populacional quando não há mais cultura no campo. Esse processo de recolonização poderia resultar em uma intensa ação da deriva genética que pode levar na diminuição da diversidade nucleotídica, aumento no número de haplótipos de baixa frequência, de forma aleatória na população e favorecer a dominância de poucos haplótipos, que rapidamente se espalham (NEIMAN; TEYLOR, 2009; ROGERS; HARPENDING, 2017; SILVA et al., 2020). Nos períodos de escassez de alimento e conseqüentemente redução populacional, as culturas de entressafra, cultivos fora de época, ou mesmo plantas daninhas podem manter a população presente na região e conseqüentemente, na cultura (HORIKOSHI et al., 2021), que passa novamente a crescer na época de cultivo (IEDE, 1980) mantendo o padrão de estrela observado na análise network.

Os índices demográficos D de Tajima e F_s de Fu indicaram expansão espacial para a população como um todo, bem como para a divisão em dois grupos Centro-Oeste e Sul suportando a rede de haplótipos. Por outro lado, somente o Sul 3 e Sudeste 1 revelaram

valores negativos e significativos para D de Tajima e F_s de Fu. Essas diferenças podem ser fruto do tamanho amostral para os grupos Centro-Oeste 1 ($n=11$), Sul 1 ($n=8$) e Sudeste 2 ($n=9$). No entanto, o agrupamento Sudeste 1 englobou as regiões onde recentemente foram relatadas falhas no controle pela tecnologia *Bt* por *C. aporema*, no Paraná e São Paulo (HORIKOSHI et al., 2021). Além disso, a região do Centro-Oeste 1, quando analisada entre os seis grupos, não demonstrou significância, mas quando a divisão em dois agrupamentos foi analisada, houve suporte para expansão. O Centro-Oeste também englobou os locais onde supostamente foram identificadas falhas de controle pela tecnologia *Bt* em Goiás e Minas Gerais (HORIKOSHI et al., 2021). Complementarmente, o índice SSD da análise de *mismatch distribution* indicou uma expansão demográfica e o índice $r_{aggdness}$ não rejeitou a hipótese nula de expansão espacial para *C. aporema* no Brasil.

Ao que tudo indica, a expansão ocorreu em um tempo semelhante para toda a população, revelado pelos índices de Tau, e considerando a não estruturação da população. Esse resultado parece óbvio em decorrência da homogeneidade da população e pelas análises demográfica e network de haplótipos. Porém, não justifica por si só a hipótese de uma expansão a partir da região Sul do Brasil em que as populações estariam se adaptando às regiões mais ao Centro do país, apesar do crescimento populacional ter acompanhado o avanço da soja. Conseqüentemente, a população da broca-das-axilas poderia estar presente na região de São Paulo, Minas e Goiás antes mesmo da soja ser introduzida no início do século XX, já que é uma espécie nativa e eventualmente ter vivenciado um aumento demográfico a partir do Sul e refletido na população como um todo. Assim, uma alta conectividade entre as populações e a não estruturação poderiam favorecer a distribuição da diversidade em um período de expansão populacional impactando os índices demográficos para as regiões. Portanto, não foi possível descartar nenhuma das hipóteses de expansão e traçar uma rota de dispersão da população, sendo necessário a utilização de marcadores de evolução mais rápidos do que o COI para detectar se a população foi subindo de acordo com a soja, ou se foram ocorrendo adaptações e crescimento locais, com o avanço da soja.

Os resultados da análise BSP corroboram com ideia da relação demográfica entre a broca-das-axilas e seu hospedeiro, com sobreposição nos períodos de introdução e expansão da soja no país e início do aumento no tamanho efetivo populacional de *C. aporema*. Ainda, a análise demonstra que esse aumento no tamanho efetivo da população foi crescente dentro dos últimos 60 anos, marcados pelo aumento em área na produção da soja (SOUZA & BUSH, 1998). Foi somente a partir de 1960 é que os relatos de surtos de broca-das-axilas atacando a

soja se iniciaram, período condizente com o maior tamanho efetivo da população em comparação com o início do século XX (BIEZANKO, 1961). Vale ressaltar que a broca-das-axilas é uma praga olífaga que se alimenta de plantas leguminosas, e que já ocorria em feijão, alfafa e plantas nativas (BIEZANKO, 1961). Portanto, o processo de expansão populacional, que toma por base a escala de mutações por milhões de anos, revelou um aumento no tamanho efetivo somente no tempo recente. Por outro lado, o aumento populacional passou a se estagnar nos últimos vinte anos, sofrendo uma leve inflexão no tamanho efetivo e atingindo valores de crescimento negativos. Essa estagnação também coincide com mudanças significativas na cultura da soja, como a adoção da tecnologia inseticida *Bt* a partir de 2013 (SOUSA & BUSH, 1998). Por fim, os registros atuais de ocorrência e surto da praga nas regiões do Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil (HORIKOSHI et al., 2021) podem ser o reflexo de um aumento populacional ainda contínuo da praga, como representado no modelo de expansão, possivelmente marcado por um processo adaptativo da praga em relação a soja.

3.5. Considerações Finais

A espécie *C. aporema* forma uma unidade populacional homogênea e com a diversidade distribuída no espaço nas áreas de soja do Brasil, apresentando uma relação genética próxima entre os haplótipos. Os índices de diversidade e demografia dão suporte à expansão populacional e espacial recentes para a espécie no país, com excesso de haplótipos separados por poucas mutações, e polimorfismos de baixa frequência na população. A expansão demográfica, que resulta no crescimento efetivo da população, tem acompanhado a expansão da soja no Brasil. Por outro lado, os resultados não deram embasamento à ideia de que a população estaria colonizando as regiões mais ao norte, a partir das regiões ao sul e acompanhando o sentido da expansão da soja. Essa íntima relação da dinâmica populacional de *C. aporema* com os cultivos de soja reforça a necessidade de um constante monitoramento e planejamento futuro para potenciais surtos de *C. aporema* em áreas de soja no Brasil, destacado principalmente pela forte relação do crescimento demográfico da espécie com a introdução e expansão da soja no Brasil.

Referências

- ALBERNAZ, K. C.; SILVA-BRANDÃO, K. L.; FRESIA, P.; CÔNSOLI, F. L.; OMOTO, C. Genetic variability and demographic history of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Brazil inferred by mtDNA sequences. **Bulletin of Entomological Research**, v. 102, n. 3, p. 333–343, 2012.
- ALTESOR, P.; HORAS, V.R.; ARCIA, M.P.; ROSSINI, P.; ZARBIN, P.H.G.; GONZALES, A. Reproductive Behaviour of *Crociosema (=Epinotia) aporema* (Walsingham) (Lepidoptera: Tortricidae): temporal pattern of female calling and mating. **Neotropical Entomology**, 39(3), 2010.
- ARIAS, O.; CORDEIRO, E.; CORRÊA, A. S.; DOMINGUES, F. A.; GUIDOLIN, A. S.; OMOTO, C. Population genetic structure and demographic history of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): implications for insect resistance management programs. **Pest Management Science**, [s. l.], v. 75, n. 11, p. 2948–2957, 2019.
- BRANDÃO, S.K. L.; LYRA, M. L.; SANTOS, T. V.; SERAPHIM, N.; ALBERNAZ, K. C.; PAVINATO, V. A. C.; MARTINELLI, S.; CÔNSOLI, F. L.; OMOTO, C. Exploitation of mitochondrial nad6 as a complementary marker for studying population variability in Lepidoptera. **Genetics and Molecular Biology**, v. 725, p. 719–725, 2011.
- BUENO, A. D. F.; PANIZZI, A. R.; HUNT, T. E.; DOURADO, P. M.; PITTA, R. M.; GONÇALVES, J. Challenges for adoption of integrated pest management (IPM): the soybean example. **Neotropical Entomology**, v. 50, n. 1, p. 5-20, 2021
- CHOUPINA, A.; MARTINS, I. Molecular markers for genetic diversity, gene flow and genetic population structure of freshwater mussel species. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 3 suppl 1, p. s167–s170, 2015.
- CORRÊA, B.S.; SMITH, J.G. Ocorrência e danos de *Epinotia aporema* (WALSINGHAM 1914)(LEPIDOPTERA: Tortricidae) em soja. **Anais da S.E.B.**, vol (5), n. 1, pg 74-78.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564–567, 2010.
- FARIAS, J. R. et al. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Prot.** 64, 150–158, 2014.
- FOERSTER, L.A.; IEDE, E.T.; SANTOS, B.B. Efeito do ataque de *Epinotia aporema* (WALSINGHAM, 1914) (LEPIDOPTERA: Tortricidae) em diferentes períodos reprodutivos da soja. **An. Soc. Entomol.**, vol. 12, n.1, 1983.

- FREELAND, J.; KIRK, H. **Molecular ecology**. 2nd ed., 1 ed. Oxford Hoboken, NJ: Oxford Wiley-Blackwell Hoboken, NJ, 2011.
- FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, n. 2, p. 915–925, 1997.
- GILLIGAN, T. M. Advances in tortricid systematics and identification (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE). Dissertation, p. 194-196, 2012.
- GREGORY, B. M.; JOHNSON, S. J.; LIEVENS, A. W.; HAMMOND, A. M. JR.; SALINAS, A. D. A Midlatitude Survival Model of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Entomological Society of America**, v. 19, n. 4, 1017-1023, 1990.
- HAYASHIDA, R.; HOBACK, W. W.; PATRICK, M. D.; BUENO, A.D. Re-evaluation of the Economic Threshold for *Crociosema aporema* (Walsingham, 2 1914) (Lepidoptera: Tortricidae) Injury to Indeterminate Soybeans. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://ssrn.com/abstract=4162525>.
- HICKMANN, F.; SAVARIS, M.; CORREA, A. S.; SCHWERTNER, C. F. *Euschistus crenator* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae): a New Invasive Species on Soybean Fields in Northern Brazil. **Neotrop Entomol**, v. 50, p. 497–503, 2021.
- HORIKOSHI, R.J.; BERNARDI, O.; GODOY, D.N.; SEMEÃO, A.A.; WILLSE, A.; CORAZZA, G.O.; RUTHES, E.; FERNANDES, D.S.; SOSA-GÓMEZ, D.R.; BUENO, A.F.; OMOTO, C.; BERGER, G.U.; CORRÊA, A.S.; MARTINELLI, S.; DOURADO, P.M.; GRAHAM H. Resistance status of lepidopteran soybean pests following large-scale use of MON 87701 × MON 89788 soybean in Brazil. **Scientific Reports**, 11, 21323, 2021.
- HORIKOSHI, R. J.; DOURADO, P. M.; BERNARDI, O.; WILLSE, A.; GODOY, W. A.; OMOTO, C.; CORRÊA, A. S. Regional pest suppression associated with adoption of Cry1Ac soybean benefits pest management in tropical agriculture. **Pest Management Science**, v. 78, n. 10, pg. 4166-4172, 2022.
- IEDE, E. T. Biologia de *Epinotia aporema* (WALSINGHAM, 1914) (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) e efeito de seu ataque em diferentes períodos de desenvolvimento da soja. 1980. [S. l.], 1980.
- JI, Y.-J.; ZHANG, D. X.; HE, L.-J. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. **Molecular Ecology Notes**, v. 3, p. 581–585, 2003.

- KERGOAT, G. J.; PROWELL, D. P.; LE RU, B. P.; MITCHELL, A.; DUMAS, P.; CLAMENS, A. L.; SILVAIN, J. F. Disentangling dispersal, vicariance and adaptive radiation patterns: a case study using armyworms in the pest genus *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 65, n.3, p. 855-870, 2012.
- KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.
- LEIGH, J. W.,; BRYANT, D. POPART: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9), p. 1110-1116, 2015.
- LOWE, W. H.; KOVACH, R. P.; ALLENDORF, F. W. Population genetics and demography unite ecology and evolution. **Trends in Ecology; Evolution**, v. 32, n. 2, p. 141–152, fev. 2017. {<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016953471630235X>>.
- OLIVEIRA, M.R.C.; CORRÊA, A.S.; SOUZA, G.A.D.; GUEDES, R.N.C.; OLIVEIRA, L.O. Mesoamerican Origin and Pre- and Post-Columbian Expansions of the Ranges of *Acanthoscelides obtectus* Say, a Cosmopolitan Insect Pest of the Common Bean. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e70039, 2013.
- PAPADOPOULOU, A.; ANASTASIOU, I.; VOGLER, A.P. Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the mid-Aegean trench calibration. **Molecular Biology and Evolution**, v.27, p. 1659– 1672, 2010.
- ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology; Evolution** 9, 552–569, 1992.
- ROZAS, J. et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 12, p. 3299–3302, 1 dez. 2017. {<http://academic.oup.com/mbe/article/34/12/3299/4161815>>.
- SCHMITT, T.,; HAUBRICH, K. The genetic structure of the mountain forest butterfly *Erebia euryale* unravels the late Pleistocene and postglacial history of the mountain coniferous forest biome in Europe. **Molecular ecology**, v. 17, n. 9, p.2194-2207, 2008.
- SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v. 236, n. 4803, p. 787–792, 2008.
- SLATKIN, M. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. **Evolution**, v. 47, n. 1, p. 264, fev. 1993. <<https://www.jstor.org/stable/2410134?origin=crossref>>.

- SILVA, C. S.; CORDEIRO, E.M. G.; PAIVA, J.B.; DOURADO, P.M.; CARVALHO, R.A.; HEAD, G.; MARTINELLI, S.; CORREA, A.S. Population expansion and genomic adaptation to agricultural environments of the soybean looper, *Chrysodeixis includens*. **Evolutionary Applications**, v. 13, n. 8, p. 2071–2085, 2020. DOI: 10.1111/eva.12966.
- SOARES, P. L. et al. The reunion of two lineages of the Neotropical brown stink bug on soybean lands in the heart of Brazil. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2496, 6 dez. 2018. <<http://www.nature.com/articles/s41598-018-20187-6>>.
- SOSA-GÓMEZ, D. R. Intraspecific variation and population structure of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Genetics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 378–384, 2004a.
- SOUSA, I. S. F. & BUSH, L. Networks and agricultural development: The case of soybean production and consumption in Brazil. **Rural Sociology**, v. 63, n. 3, pg. 349-371, 1998.
- WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, n. 1, p. 323–354, jan. 1951. <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x>>.