

Fabiane dos Santos

**OCORRÊNCIA, DINÂMICA E DIVERSIDADE
GENÉTICA POPULACIONAL DA *Helicoverpa armigera*
(HÜBNER, 1809) (LEPIDOPTERA:NOCTUIDAE) NO ESTADO
DE SANTA CATARINA.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Inácio Orth

Coorientador: Rubens Onofre Nodari

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Fabiane dos

Ocorrência, dinâmica e diversidade genética populacional da *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1809) (Lepidoptera: Noctuidae) no Estado de Santa Catarina / Fabiane dos Santos ; orientador, Afonso Inácio Orth ; coorientador, Rubens Onofre Nodari. - Florianópolis, SC, 2015.
120 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Diversidade Genética. 3. Entomologia Agrícola. 4. Monitoramento de pragas. 5. Defesa Sanitária Vegetal. I. Orth, Afonso Inácio. II. Nodari, Rubens Onofre. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

Dedico aos persistentes, especialmente
a meu pai.

AGRADECIMENTOS

É com muita satisfação que aproveito a oportunidade de agradecer aos inúmeros colegas e amigos que tornaram possível a realização deste trabalho.

Agradeço primeiramente a minha família por todo apoio em momentos difíceis, especialmente aos meus irmãos, minha mãe, meu pai e avô.

Agradeço também a equipe da Defesa Sanitária Vegetal (DSV) da CIDASC que foi responsável por todos os dados necessários para a elaboração desta Dissertação. A cada colega pelo seu incansável trabalho. Em especial ao gerente regional da Administração Regional de Videira (Mario Milani) que proporcionou a liberação para que eu pudesse cumprir mais esta etapa de minha formação. Ao Gerente Estadual da DSV (Aarão Luiz Schimitz Júnior) pelo apoio, confiança e liberdade de criação. E ao Diretor Alvorí Cantu pela ajuda e força.

Ao meu querido orientador, professor Dr. Afonso I. Orth pelo respeito, companheirismo e confiança. Ao meu admirável coorientador professor Dr. Rubens Onofre por compreender a capacidade que eu poderia ter na realização de um bom trabalho científico, pelo respeito, entusiasmo e confiança.

Aos produtores que nos receberam em suas propriedades para o monitoramento de suas áreas de produção.

Aos meus amados amigos que encontrei na família do RGV, que me ajudaram e muito a enfrentar a turbulência dos últimos tempos.

Aos companheiros de trabalho responsáveis pela realização desta obra, Anna Cristina Xavier, Natália Aires, Lucas Arantes Frischenbruder e Luciano Saifert.

Aos meus amados amigos, companheiros de café do LABENTO, pelos ensinamentos, bons momentos e ajuda: Marcia Fanta, Mayara Cardoso, Lucilene de Abreu e Ricardo Barbosa Felipini, Luis Borsuk, Luiz Zanfelic. Aos colegas do LFDGV em especial ao Gustavo Klabunde, Márcia Rossarolla, Gregorio Lombardi, Morgana Elis Lopes, Ramon Felipe Scherer. A Bernadete, secretária do programa de pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Ao Lido Borsuk e Josiani Riboli pela ajuda nas análises moleculares. Muito obrigada aos professores deste programa pelo conhecimento adquirido e aos professores da banca examinadora pelas sugestões. Aos meus amigos de longa data que sempre torceram por mim. E um agradecimento muito especial a Angela Specialski Silveira, pela força e oportunidade de convivência.

“Numa ciência aplicada como a genética agrícola, o econômico domina o científico e, além dos ganhos financeiros, determina o que é cientificamente verdadeiro”.

Hugo de Vries (1907):

RESUMO

A *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1809) (Lepidoptera:Noctuidae), foi identificada no Brasil em meados de 2013, nas regiões do Centro-Oeste e Nordeste. Estavam descritas na região Sul até então as espécies *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) e *Helicoverpa gelotopoeon* (Dyar, 1921), tornando-se necessário a realização de um levantamento sobre a possível presença da espécie no Estado de Santa Catarina (SC) em decorrência da sua recente introdução no país. O presente estudo teve como objetivo caracterizar a ocorrência da espécie, a diversidade genética populacional, bem como os fatores que influenciam a sua dinâmica nas diferentes regiões de SC. A coleta de espécies do gênero *Helicoverpa* spp. foi realizada com o uso de armadilhas tipo Delta contendo feromônio sexual sintético nas safras 2013-2014 e 2014-2015. Na primeira safra foram identificados 725 exemplares machos, sendo que 82,2% a espécie *H.armigera*, 11,6% *H. zea* e 0,4% *Heliothis stromberi*. Na segunda safra de 676 machos identificados, 91% eram de *H. armigera*, 3,0% de *H. zea*. As identificações foram feitas por análise morfológica das estruturas de genitálias de machos. Em 5,8% e 4,8% das amostras dos respectivos períodos de avaliação foi apenas identificado o gênero por falta de condições adequadas para a diferenciação de estruturas de genitália. Complementarmente a identificação morfológica, foram separados 100 exemplares para a identificação molecular, por meio de duas regiões parciais do *mtDNA*, os genes Cytocromo oxidase subunidade I (COI) e o Cytocromo B (Cytb), analisados por PCR-RFLP com enzimas de restrição *BstZ171* e *HphI*, havendo coincidência em 100% entre as análises morfológica e molecular. A presença da praga foi confirmada em 49 municípios, com um maior número de capturas nas regiões meio-oeste e extremo-oeste onde é predominante o cultivo da soja. As armadilhas em que foram coletados insetos adultos de *H. armigera* estavam presentes em unidades de produção de trigo (*Triticum aestivum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), milho (*Zea mays*), soja (*Glycine max*) e tabaco (*Nicotiana tabacum*), constituindo-se potenciais plantas hospedeiras. Os insetos no estágio larval foram coletados em tomate (*Solanum esculentum*) e soja (*Glycine max*), caracterizando-se plantas hospedeiras. Foram observadas correlações de Pearson entre o número de capturas e temperaturas mínima, máxima e média, precipitação, velocidade do vento e umidade relativa para os municípios de Campos Novos e Chapecó, não sendo estatisticamente significativas ($p>0,050$). Considerando as necessidades térmicas, fenologia de uma cultivar de soja com um ciclo de 153 dias e

as temperaturas no ano de 2013, foi avaliada o potencial de desenvolvimento de estágios da *H. armigera*, no município de Bom Retiro, escolhido por apresentar cultivo de hospedeiras como o tomate e ter expandido a sojicultura em área plantada nos últimos anos. Havendo um potencial de ocorrer a duas gerações completas até o encerramento da colheita (início de abril), com larvas em desenvolvimento de terceira geração. A análise de diversidade genética por meio de 4 locos microssatélites HaC14, HarSSR6, HaB60, HaC87, indicam que a maior parte da diversidade genética encontra-se dentro das populações (FIS 0,611) embora exista moderada variação interpopulacional (FST 0,06). O número de migrantes (Nm 4,2) estimado sugere alto fluxo gênico. Os resultados obtidos são importantes para as estratégias de manejo.

Palavras-chave: Heliothinae. Levantamento Estadual de pragas. Exigências térmicas. Diversidade genética. DNA mitocondrial.

ABSTRACT

The *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1809) (Lepidoptera:Noctuidae), was reported in the first time in Brazil, 2013, in the region of Central-West and Northeast. In the region South were described, only the species *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) and *Helicoverpa gelotopoeon* (Dyar, 1921). Due to the recent introduction this study is unprecedented and provide a framework of the occurrence, population structure and dynamics of the species in the state of Santa Catarina (SC). The goal this study went characterize the occurrence of the species and the factors that influence their population dynamics and genetic diversity in different regions in the state of SC. Moths were captured using pheromone traps. In 2013-2014 crop, 725 male specimens were identified, and 82.2% to *H.armigera species*, 11.6% *H. zea* and *Heliothis stromberi* 0.4%. In 2014-2015 crop, 676 identified males, 91% were *H. armigera*, 3,0% of *H. zea*. There were some specimens only identified de genus. Identification was based on male genitalia and analyses of mtDNA COI and Cytb by PCR-RFLP estriction enzyme *BstZ171* and *HphI*, with 100% coincidence between morphological and molecular analyzes. The presence of *H. armigera* was confirmed in the first year of survey and was detected, in 49 locals, being present in all SC regions. The greatest number of *H. armigera* was captured next to soybean farmers and there occurred damage in tomato crops. The farmers with trap capture (potential host plant) were: wheat (*Triticum aestivum*), beans (*Phaseolus vulgaris*), corn (*Zea mays*), soybean (*Glycine max*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*). Caterpillars were recorded in the in tomato crop (*Solanum esculentum*) and soybean (*Glycine max*), constitutes a host plant. Correlations between the number of catches and abotic factors were observed. Considering the thermal needs, phenology of a soybean cultivar with a cycle of 153 days and temperatures in 2013, was assessed the potential development of *H. armigera* stages, in Bom Retiro, chosen to present culturing host such as tomatoes and have expanded soybean cultivars. There is a potential to occur two full generations. Genetic diversity analysis by four microsatellites loci HaD47, HarSSR6, HARSSR7, HarSSR10 suggest the average alleles for loci 7,44, with average expected heterozygosity (uHe) 0,654 and observed heterozygosity (Ho) de 0,212. The fixation index average was 0,595. Results are importants for management practices.

Key-words: Heliiothinae. Pest survey. Thermal requirements. Genetic diversity. Mitochondrial DNA

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Venação da asa posterior e anterior, condição trífida e trifine.
..... 21
- Figura 2:** Oitavo urosternito-*H. zea*(A); Oitavo urosternito-*H. armigera* (B); Genitália *H. zea* (C) e genitália de *H. armigera* (D). Edeago de *H. zea* (E); Edeago de *H. armigera* (F) Lobo na base da vesica de *H. zea*(G); Lobo na base da vesica de *H. armigera*(H)..... 27
- Figura 3:** Mapa político de Santa Catarina com indicações das mesorregiões do Estado e posição georreferenciada das armadilhas tipo Delta, com feromônio sexual, instaladas na safra 2013-2014..... 52
- Figura 4:** Mapa político de Santa Catarina com indicações das mesorregiões do Estado e posição das armadilhas tipo Delta, com feromônio sexual, instaladas na safra 2014 -2015. 52
- Figura 5:** Foto obtida em estereomicroscópio trinocular de estruturas da genitália de macho de *Helicoverpa armigera*. A: oitavo urosternito (forma V achatado); B: edeago com a presença de cornutis ; C, genitália macho (valva)..... 55
- Figura 6:** Foto obtida em estereomicroscópio trinocular de estruturas da genitália de macho de *Helicoverpa zea*. A: oitavo urosternito (forma U na base); B: genitália macho (valva). 55
- Figura 7:** Lobo simples (indicado pela seta) na base da vesica característico de *Helicoverpa armigera*. 56
- Figura 8:** Lobo triplo (indicado pelas setas) na base da vesica característico de *Helicoverpa zea*. 56
- Figura 9:** Percentuais referentes as 725 machos adultos de espécies do gênero *Helicoverpa* e forma anômala de *Helicoverpa zea* (*Heliothis stromberi*) capturados em armadilhas tipo Delta com feromônio sexual sintético em Santa Catarina na safra 2013-2014. 57

Figura 10: Percentuais referentes aos 676 machos adultos de espécies do gênero *Helicoverpa* capturadas em armadilhas tipo Delta com feromônios sexual sintético em Santa Catarina no safra 2014-2015..... 58

Figura 11: Mapa político do Estado de Santa Catarina e a ocorrência de *Helicoverpa armigera*. As áreas marcadas com cinza-escuro indicam os municípios com unidades de produção monitoradas por meio de armadilhas tipo Delta com feromônios sexual sintético. Os pontos em vermelho correspondem àqueles com a presença da espécie *Helicoverpa armigera* confirmada por meio de identificação morfológica da genitália de machos adultos. Safras 2013 – 2014 e 2014 – 2015..... 59

Figura 12: Frequência absoluta acumulada de machos adultos de *Helicoverpa armigera* (\pm desvio padrão) capturados em armadilhas contendo feromônios sexual sintético, nas regiões do Oeste, Meio-Oeste e Planalto de Santa Catarina em diferentes meses de monitoramento da safra 2013 – 2014. 60

Figura 13: À esquerda indicação da área plantada de soja, nos diferentes municípios do Estado de Santa Catarina (IBGE, 2014). À direita mapa de densidade de Kernel das variáveis armadilhas com capturas de *Helicoverpa armigera*. As regiões com maior área plantada de soja em hectares também são aquelas com maior densidade de armadilhas com capturas de *Helicoverpa armigera*. 63

Figura 14: Danos ocasionados por larvas da *Helicoverpa armigera* em frutos de tomateiro, coletados em unidades de produção com destino comercial localizadas em Caçador - SC. 64

Figura 15: Diagrama de Gantt representando a relação do tempo (Dias Após a Semeadura – DAS) e as fases de desenvolvimento da *Helicoverpa armigera*, e dos estádios fenológicos da cultivar de soja Valente. 82

Figura 16: Número de machos adultos (\pm devio padrão) de *Helicoverpa armigera* em armadilhas tipo Delta com feromônio sexual sintético e as temperaturas mínimas, máximas e médias em diferentes meses do ano, na safra 2013 -2014 no município de Campos Novos..... 83

Figura 17: Número de machos adultos (\pm desvio padrão) de *Helicoverpa armigera* em armadilhas tipo Delta com feromônio sexual sintético e os diferentes índices de umidade relativa, precipitação e velocidade do vento em diferentes meses do ano, na safra 2013 -2014 no município de Campos Novos. 84

Figura 18: Número de machos adultos (\pm desvio padrão) de *Helicoverpa armigera* em armadilhas tipo Delta com feromônio sexual sintético e as temperaturas mínimas, máximas e médias em diferentes meses do ano, na safra 2013 -2014 no município de Chapecó. 84

Figura 19: Número de machos adultos (\pm desvio padrão) de *Helicoverpa armigera* em armadilhas tipo Delta com feromônio sexual sintético e os diferentes índices de umidade relativa, precipitação e velocidade do vento em diferentes meses do ano, na safra 2013 -2014 no município de Chapecó. 85

Figura 20: Amplificação parcial da região COI (700pb) de *Helicoverpa armigera* e *Helicoverpa zea* por PCR seguida de digestão pela enzima de restrição (*BstZ171*). Canaletas 1 e 20 ladder (100pb); 2 e 3 produto da PCR não digerido; 4 água; 16 *Helicoverpa zea*; todas as demais *Helicoverpa armigera*. 99

Figura 21: Amplificação parcial da região COI (700pb) de *Helicoverpa armigera* e *Helicoverpa zea* por PCR seguida de digestão pela enzima de restrição (*BstZ171*) e (*Hph I*) . Canaletas 1 e 20 ladder (100pb); 2; 18; 19 produto da PCR não digerido; 3 água; 5,6,7,8,12,13,14 amostras digeridas com (*BstZ171*); 9,10,11,15,16,17 mesmas amostras digeridas com (*Hph I*). 99

Figura 22: Amplificação parcial da região COI (700pb) de *Helicoverpa armigera* e *Helicoverpa zea* com digestão por enzima de restrição (*BstZ171*). 1 e 20 ladder (100pb); 10-*H. zea*; 11 inespecífico; 18 e 19 produto não amplificado; todas as demais *H. armigera*. 100

Figura 23: Amplificação de PCR parcial região CytB (500pb) de *Helicoverpa armigera* e *H. zea* com digestão por enzima de restrição (*Hph I*) e (*BstZ171*) 1 e 15 ladder (100pb); 2,3,4 produto da PCR não digerido; 5,9,11 digestão por (*Hph I*); 6,7,8,10 digestão por (*BstZ171*); COI (700 pb) 12,14 (*BstZ171*); 13 (*Hph I*). 100

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Frequência absoluta e relativa de machos adultos do gênero *Helicoverpa* capturados por município no Estado de Santa Catarina, em armadilhas contendo feromônios sexual sintético, nas safras 2013 – 2014 e 2014 – 2015. 61
- Tabela 2:** Temperaturas máximas, mínimas e médias registradas no ano de 2013, na estação meteorológica localizada no município de Bom Retiro-SC e compiladas pela unidade técnica da CIDASC - Estação de Avisos de São Joaquim. 80
- Tabela 3:** Coeficientes de correlação de Pearson, entre o total de capturas de *Helicoverpa armigera* e os diferentes fatores climáticos. ... 83
- Tabela 4:** Indicação das regiões e municípios que foram agrupados como populações de *Helicoverpa armigera* para análise de diversidade genética por meio de marcadores microssatélites. 94
- Tabela 5:** Características e sequências dos pares de iniciadores de oito locos microssatélites em *Helicoverpa armigera* 97
- Tabela 6:** Estimativas dos índices de diversidade genética de quatro subpopulações de *Helicoverpa armigera*, agrupadas por regiões geográficas: Oeste (XAP), Meio-Oeste(CN);Serrana (BR) e Extremo-Oeste (EO) de Santa Catarina..... 101
- Tabela 7:** Estimativa das estatísticas F de Wright (F_{IS} , F_{ST} , F_{IT}) e do número de migrantes para as quatro populações para cada um dos quatro locos microssatélites..... 102
- Tabela 8:** F_{ST} “par a par” a partir de quatro iniciadores microssatélites considerando quatro populações por distância geográfica de *Helicoverpa armigera* oriundas do Estado de Santa Catarina. 103

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	20
1.1.1	Objetivos Gerais.....	20
1.1.2	Objetivos Específicos.....	20
2	CAPÍTULO I - Revisão Bibliográfica	21
2.1	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA	21
2.1.1	A Superfamília Noctuoidea.....	21
2.1.2	Família Noctuidae	22
2.1.3	Subfamília Heliiothinae e o gênero <i>Helicoverpa</i>	23
2.2	BIOECOLOGIA	25
2.3	IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA	26
2.4	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	28
2.5	PLANTAS HOSPEDEIRAS	28
2.6	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	29
2.7	ANÁLISES MOLECULARES.....	31
2.8	ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA	33
3	CAPÍTULO II – Ocorrência e distribuição da <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner, 1809) (Lepidoptera:Noctuidae) no Estado de Santa Catarina	47
3.1	INTRODUÇÃO	49
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	50
3.2.1	Coleta de mariposas	50
3.2.2	Coleta de lagartas	53
3.2.3	Identificações morfológicas	53
3.2.4	Análises de dados.....	54
3.3	RESULTADOS	54
3.4	DISCUSSÃO	65

3.5	CONCLUSÕES	69
4	CAPÍTULO III– Análise do potencial desenvolvimento da <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner, 1809) Lepidoptera:Noctuidae) em cultivo de soja no município de Bom Retiro, região serrana de Santa Catarina, e a correlação entre fatores climáticos e o número de capturas em armadilhas tipo Delta contendo feromônios sexual sintético	75
4.1	INTRODUÇÃO	77
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	78
4.3	DISCUSSÃO	85
4.4	CONCLUSÕES	87
5	CAPÍTULO IV - Identificação molecular por meio de PCR-RFLP e análise da diversidade genética da <i>Helicoverpa armigera</i> Lepidoptera: Noctuidae) no Estado de Santa Catarina inferida com marcadores microssatélites	91
5.1	INTRODUÇÃO	93
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	94
5.2.1	Amostras do gênero <i>Helicoverpa</i>	94
5.2.2	Extração e quantificação de DNA	95
5.2.3	PCR amplificação para RFLP	95
5.2.4	Digestão com Enzimas de Restrição (PCR-RFLP)	96
5.2.5	Amplificação dos marcadores microssatélites (ssr) por PCR.....	96
5.3	RESULTADOS.....	98
5.3.1	Perfil molecular por PCR-RFLP	98
5.3.2	Diversidade genética	101
5.4	DISCUSSÃO	103
5.4.1	O perfil molecular obtido por PCR-RFLP por meio de <i>mtDNA</i> COI ou CytB	103
5.4.2	Diversidade genética	104
5.5	CONCLUSÕES	106
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	108

1 INTRODUÇÃO

A *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1809) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada a praga¹ de maior importância econômica na agricultura entre todas da subfamília Heliothinae (CUNNINGHAM; ZALUCKI, 2014), que agrega de 365 a 400 espécies (MITTER; POOLE; MATTHEWS, 1993; CHO et al., 2008).

Os danos diretos são ocasionados pela larva do inseto em estruturas reprodutivas das plantas hospedeiras. O elevado grau de polifagia, a alta capacidade de dispersão, fecundidade e adaptabilidade a diferentes ambientes, favorecem o estabelecimento da espécie em uma determinada região de cultivo, originando muitas vezes prejuízos econômicos, decorrentes do aumento do custo de controle, pelo uso intensivo de inseticidas e redução da produtividade (FITT, 1989; MITTER; POOLE; MATTHEWS, 1993; JALLOW; PAUL CUNNINGHAM; ZALUCKI, 2004).

A espécie tem sido registrada infestando pelo menos 60 plantas cultivadas e em 67 plantas silvestres de 35 diferentes famílias, principalmente: Asteraceae, Fabaceae, Leguminaceae, Malvaceae, Poaceae e Solanaceae, incluindo diversas culturas de expressão econômica no mundo, como o algodão, soja, feijão, milho e tomate (PAWAR; REED, 1982; FITT, 1989; CUNNINGHAM; ZALUCKI, 2014).

Na safra brasileira de 2012-2013, após vários registros de grandes perdas na produção, em decorrência do ataque de lagartas do gênero *Helicoverpa*, inicialmente no Oeste da Bahia, na cultura do algodão, e em feijão, milho, soja e tomate na região Centro-Oeste do país, foi identificada a introdução de uma nova espécie.

Concomitantemente, dois grupos de pesquisa iniciaram estudos para a identificação, sendo um da Universidade Federal de Goiás (UFG) e outro da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). O primeiro coletou larvas nas culturas de soja, algodão e tiguera de soja em Palmeiras de Goiás-GO, Rondonópolis-MT e Correntina-BA, mantendo as mesmas até a fase adulta para a identificação da espécie por meio de análise da genitália dos machos, confirmando tratar-se da *H. armigera*. Assim, foi publicado o primeiro relato da ocorrência da espécie no Brasil e nas Américas (CZEPAK; ALBERNAZ; VIVAN,

¹ É estabelecido o conceito de praga para qualquer espécie, raça ou biótipo de planta, animal ou agente patogênico, nocivos a plantas ou produtos vegetais [FAO, 1990; revisado pela FAO, 1995; CIPV, 1997].

2013) sendo confirmada posteriormente em países vizinhos como a Argentina e Paraguai (MURÚA et al., 2014).

O grupo da EMBRAPA instalou armadilhas luminosas para a coleta de adultos no município de São Desidério - BA em dezembro de 2012, bem como efetuou a coleta de materiais provenientes de Londrina-PR, Planaltina-DF e Mato Grosso. Baseado na análise morfológica de genitália de machos por análise molecular também constataram a introdução da espécie *H. armigera*, ampliando o registro de ocorrência no país (SPECHT et al., 2013).

Segundo Kriticos et al. (2015) a expansão demográfica da *H. armigera* quando presente em um determinado território é iminente e apenas uma questão de tempo. Tal afirmação é evidenciada pela distribuição da praga na África, Ásia e Europa, sendo por isso denominada até então como a lagarta do velho mundo, “old world bollworm” (MITTER; POOLE; MATTHEWS, 1993).

A *H. armigera* apresenta migração e diapausa facultativa em busca de melhores condições para a sobrevivência e desenvolvimento da prole. Os movimentos migratórios são caracterizados por movimentos inter-regionais extensos, podendo alcançar até 3000 km de distância recorrendo a voos noturnos, podendo voar até 300 km em apenas uma noite (FITT, 1989; FITT; DILLON; HAMILTON, 1995; NIBOUCHE et al., 1998; FENG et al., 2009).

A confirmação de que a espécie ocorre em uma determinada região pode ser feita por levantamentos de detecção, com o uso de armadilhas luminosas ou contendo feromônio sexual, além de coletas de insetos mediante inspeções em plantas hospedeiras. A correta identificação da espécie é efetuada por análise morfológica e é adicionalmente recomendado a molecular quando a dúvidas em relação a diferenciação de espécies muito próximas. Após a confirmação da ocorrência em um determinado território é necessário o contínuo monitoramento dos locais de cultivos agrícolas para determinar a distribuição e a abundância, que podem estar correlacionadas com as diferentes condições climáticas, principalmente com as temperaturas que influenciam o desenvolvimento do inseto e conseqüentemente o número de gerações que podem apresentar em um determinado local.

Diferentes espécies do gênero *Helicoverpa* podem ocorrer simultaneamente em um mesmo local e período. Na região Sul estavam descritas apenas as espécies *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) e *Helicoverpa gelatopoeon* (Dyar, 1921) das 18 descritas por Hardwick em 1965. O diagnóstico de uma nova espécie ocorrendo em Santa Catarina (SC) que se destaca no cenário nacional, como um dos seis

principais estados produtores de alimentos, poderá interferir no manejo adotado nas diferentes espécies de plantas hospedeiras cultivadas no Estado, tais como: *Allium cepa* (L.) (cebola), *Citrus sinensis* (L.) (laranja), *Glycine max* (L.) Merrill (soja), *Solanum esculentum* Mill. (tomate), *Nicotiana tabacum* (L.) (tabaco), *Phaseolus vulgaris* (L.) (feijão), *Solanum tuberosum* (L.) (batata), *Triticum aestivum* (L.) (trigo), *Zea mays* (L.) (milho), além de hortaliças, como, *Brassica oleracea* (L.) var. botrytis (couve-flor), *Brassica oleracea* (L.) var. capitata (repolho), *Lactuca sativa* (L.) (alface) , *Solanum melongena* (L.) (berinjela) (CUNNINGHAM; ZALUCKI, 2014).

Devido aos aspectos de migração, adaptabilidade a diferentes ambientes e a seleção de plantas hospedeiras a *H. armigera* pode haver diversidade genética entre os indivíduos e entre populações de insetos presentes em diferentes regiões geográficas. A diversidade genética por sua vez interfere nas táticas de manejo para controle do inseto. A análise da diversidade genética tem esclarecido a dispersão, expansão demográfica e o fluxo gênico, prevendo possíveis problemas de resistência à inseticidas e a toxinas *Bt* expressas em plantas transgênicas, em relação a diferentes espécies pragas de lepidóptera.

Este estudo aborda a ocorrência e a distribuição da *H. armigera* no Estado de Santa Catarina nas safras 2013-2014 e 2014-2015, efetuando o diagnóstico com base na identificação morfológica das estruturas de genitálias e, adicionalmente, molecular por meio de PCR-RFLP. Apresenta um modelo potencial de desenvolvimento da *H. armigera* no município de Bom Retiro (SC) produtor de maçã, mas que tem expandido o cultivo de soja e tomate na sua área de abrangência. Por meio dos insetos coletados em diferentes regiões de SC fez-se também um estudo da diversidade genética entre indivíduos e entre populações com o uso de marcadores microssatélites.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

Estudar a ocorrência, distribuição e a diversidade genética da espécie *Helicoverpa armigera* em Santa Catarina.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar a espécie por aspectos morfológicos e perfil molecular;
- b) Realizar levantamento para detectar a presença da *Helicoverpa armigera* e caracterizar a dispersão da espécie no Estado;
- c) Elaborar um modelo de potencial desenvolvimento do ciclo ovo-emergência do adulto, correlacionando com os estádios fenológicos da planta hospedeira e dados climáticos do local;
- d) Caracterizar a diversidade genética da população;

2 CAPÍTULO I - Revisão Bibliográfica

2.1 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

2.1.1 A Superfamília Noctuoidea

A primeira classificação da superfamília Noctuoidea foi concretizada por Linnaeus entre 1758 e 1767, quando descreveu 166 espécies nominais de Noctuoidea, das quais 86.7% possuem denominação válida atualmente. Fundamentou sua pesquisa nas espécies que ocorriam principalmente na Europa, dividindo em famílias que denominou de: Notodontidae, Lymantriidae, Thaumetopoeidae, Arctiidae, Noctuidae (MIKKOLA, 1993).

A caracterização desta superfamília por característica anamórfica se dá pela presença de diversidades no primeiro seguimento abdominal de larvas e de órgão timpânico metatorácico em adultos (MILLER, 1991; ZAHIRI et al., 2011).

A presença do órgão timpânico tem a finalidade de detectar a presença de morcegos (ecolocalização), ainda que haja pesquisas que evidenciem a recepção de outros sinais que talvez possam ser utilizados até mesmo para a reprodução (FIBIGER; LAFONTAINE, 2005; ZAHIRI et al., 2011)

A divisão da superfamília é agrupada morfológicamente pela presença de frênuło retináculo e a venação das asas anteriores como trifidas ou quadrífidas. Das seis famílias, quatro foram agrupadas como quadrífidas Euteliidae, Erebidae, Nolidae e Noctuidae. As venações das asas posteriores (Figura 1) são denominadas de trifines e quadrifines e diferencia subfamília famílias dentro de cada (ZAHIRI et al., 2011).



Figura 1: Venação da asa posterior e anterior, condição trifida e trifine.

Fonte: Fabiane dos Santos

A superfamília Noctuoidea dentro da ordem Lepidoptera é considerada a mais abundante em número de espécies, com aproximadamente 45 mil descritas, sendo que das 6 mil de lepidópteras que apresentam alguma importância econômica, 1/4 pertence a este grupo (ZAHIRI et al., 2011).

Nesta superfamília ainda encontra-se o maior clade de espécies consideradas pragas distribuídas em mais de 500 gêneros, seja no estágio larval ou adulto, em que são perfuradores de frutos (MITCHELL; MITTER; REGIER, 2006a; ZAHIRI et al., 2011).

Várias foram às tentativas de classificação dessa superfamília, sendo por muito tempo utilizada a de HAMPSON (1898), que começou a ser questionada a partir do início da década de 1990, não havendo consenso entre as diferentes tentativas de classificação que se seguiram.

Segundo Mitchell; Mitter; Regier (2006) que se basearam no estudo de sistemática molecular em duas proteínas de codificação de genes nucleares em 146 amostras, o sistema de classificação seria dividido em 13 famílias. Contudo no mesmo ano Lafontaine e Fibiger publicaram uma revisão em que agrupavam em apenas cinco famílias.

Adotando uma estratégia de incluir a maioria das linhagens de Noctuoidea quadrifine de muitas regiões biogeográficas, incluindo exemplares raros com restrita distribuição e baixa riqueza, ZAHIRI (2011), com o uso de oito marcadores para DNA genômico e análise de filogenética molecular, propôs um novo sistema de classificação, agrupando em seis famílias (Oenosandridae, Notodontidae, Euteliidae, Erebidae, Nolidae e Noctuidae), sendo esta a utilizada até o momento.

2.1.2 Família Noctuidae

A família Noctuidae possui 22 subfamílias conhecidas como “trifine”, há, entretanto dificuldade em definir se as asas tem venação trifine ou quadrifine, havendo divergências quanto a veia M2 e a espessura em relação a M3 (ZAHIRI et al., 2013).

Para solucionar tal indefinição ZAHIRI (2013) realizou estudo filogenético com base em oito regiões de genes. Seus resultados suportam que a maioria das subfamílias tem veia M2 diminuídas ou ausentes, havendo uma condição plesiomórfica em que a veia M2 surge entre as origens da M1 e M3, em paralelo com a M3 e apomórfica em que a veia M2 é reduzida ou ausente. Há algumas linhagens que apresentam M2 não ou pouco reduzida, as quais geram dúvidas para as associações morfológicas, sendo propostas mudanças taxonômicas, restabelecendo Thiacidinae e Dyopsinae como subfamílias.

Dentre as espécies que pertencem ao grupo, muitas são de importância em diferentes âmbitos, seja na saúde, polinização, controle biológico, praga agrícola e até mesmo na alimentação (TOURLE, 2010; REINERT et al., 2010; VILLAS-BOAS et al., 2012; FAO, 2013). É na agricultura que está à maioria das espécies com importância, algumas consideradas as mais prejudiciais para a produção de alimentos, representadas pelos gêneros *Spodoptera*, *Helicoverpa*, *Agrotis* (SINGH KRITI; A. DAR; H. KHAN, 2014).

2.1.3 Subfamília Heliiothinae e o gênero *Helicoverpa*

A família Noctuidae possui entre 365 a 400 espécies pertencentes à subfamília Heliiothinae, abundantes em regiões quentes e secas de ambos os hemisférios, atacando flores e frutos (MITTER; POOLE; MATTHEWS, 1993; CHO et al., 2008; CUNNINGHAM; ZALUCKI, 2014). Incluem algumas das pragas que mais causam dano à agricultura em todo o mundo, pertencentes aos gêneros *Helicoverpa* e *Heliiothis*, comumente denominados como as mais importantes linhagens de pragas dessa subfamília (CHO et al., 2008).

A subfamília é representada, na maioria, por espécies cosmopolitas (MITTER et al., 1993; CHO et al., 2008); pragas como a *Helicoverpa zea*, *Helicoverpa armigera* e *Heliiothis virescens*, possuem uma ampla distribuição geográfica, causando prejuízos nas mais diversas culturas, assim como *Helicoverpa punctigera* Wallengren, endêmica da Austrália, pertencem a este grupo (FITT, 1989; FITT; COTTER, 2005; CHO et al., 2008).

As características que conferem sucesso adaptativo a diferentes agroecossistemas, estabelecendo o status de pragas para essas espécies, pela ameaça potencial que apresenta à agricultura, são o elevado grau de polifagia, dispersão, fecundidade e adaptabilidade a diferentes ambientes (FITT, 1989; MITTER; POOLE; MATTHEWS, 1993).

Entre as Heliiothinae, 70% são monófagos ou oligófagos, alimentando-se de uma espécie de planta, ou mais de uma que se relacionam com plantas da mesma família (MITTER; POOLE; MATTHEWS, 1993; CHO et al., 2008; CUNNINGHAM; ZALUCKI, 2014). Entretanto, 30% das espécies são polífagas, alimentando-se de duas ou mais espécies de plantas, correspondendo em grande parte às pragas agrícolas, causando danos em diversos cultivos de diferentes plantas hospedeiras em todo o mundo (FITT, 1989; MITTER; POOLE; MATTHEWS, 1993; CHO et al., 2008).

A polifagia pode ser uma importante estratégia adaptativa para insetos que exploram um novo habitat, região ou um nicho ecológico vago (WARD & SPALDING, 1993). Em relação à dinâmica populacional, favorece o desenvolvimento de populações simultaneamente em diferentes hospedeiros dentro de uma mesma região, podendo desenvolver-se continuamente durante os períodos adequados, explorando uma sucessão de diferentes cultivos, além de persistir a baixa densidade em áreas aparentemente inadequadas, mas capaz de assegurar o desenvolvimento larval (FITT, 1989).

A capacidade de realizar movimentos locais e inter-regionais extensos é também um fator que confere sucesso a essas espécies. Insetos migrantes combinam uma alta taxa de crescimento com um período de desenvolvimento mais curto (ROFF; FAIRBAIRN, 2007). Como estratégia, realizam migrações facultativas dependendo das condições locais e diapausa em períodos de frio, e seca, conforme o fotoperíodo (FITT, 1989; FENG et al., 2010; CHEN et al., 2013). A migração é realizada no período noturno, ocorrendo movimentos acima da camada limite de voo, por várias horas tornando possível a favor do vento o deslocamento por centenas de quilômetros em apenas uma noite (FITT, 1989; FITT; DILLON; HAMILTON, 1995; FENG et al., 2009).

Em 1965, Hardwick publicou “The Corn Earworm Complex” listando 18 espécies do gênero *Helicoverpa*: *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1809); *Helicoverpa assulta* (Guenée, 1852); *Helicoverpa gelotopoeon* (Dyar, 1921); *Helicoverpa hawaiiensis* (Quaintance & Brues); *Helicoverpa prepodes* (Common, 1985); *Helicoverpa punctigera* (Wallengren, 1860); *Helicoverpa richinii* (Berio, 1939); *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850), sendo 10 delas identificadas pelo próprio Hardwick: *Helicoverpa atacamae*; *Helicoverpa bracteae*; *Helicoverpa confusa*; *Helicoverpa fletcheri*; *Helicoverpa helenae*; *Helicoverpa minuta*; *Helicoverpa pacifica*; *Helicoverpa tibetensis*; *Helicoverpa titicacae*; *Helicoverpa toddi*.

Nesta publicação são descritas todas as características morfológicas que caracterizam cada espécie, em todas as fases do desenvolvimento. As variações morfométricas são detalhadas para cada espécie bem como a duração de cada estágio, para isto foram analisadas centenas de espécimes com as informações de distribuição geográfica de cada espécie (HARDWICK, 1965).

As espécies atualmente encontradas no Brasil são: *H. zea* (Boddie, 1850) e *H. gelotopoeon* (Dyar, 1921) (sul do país) e *H. armigera*. Contudo a *H. gelotopoeon*, conhecida como *Isoca bollilera* é relatada como praga agrícola apenas na Argentina, mas não há

informações disponíveis de como foi realizada a identificação, gerando dúvidas sobre a real ocorrência dessa espécie como praga (MURÚA et al., 2014).

2.2 BIOECOLOGIA

A espécie *Helicoverpa armigera* é um inseto holometábolo, sobrevivendo pelas fases de ovo, lagarta, pré-pupa, pupa e adulto. Os ovos são pequenos entre 0,42-0,60 milímetros por 0,40 -0,55 milímetros de altura em média, são de coloração branco-amarelada, tornando-se marrom-escuro próximo à eclosão da larva. São achatados com a presença de nervuras radiais, com aspecto liso apenas na porção apical (HARDWICK, 1965; ALI et al., 2009).

A distribuição de ovos é influenciada pela alimentação de adultos e coincide com o florescimento, com um período de incubação médio entre 2,5 ±0,09 a 14,1±1,09 dias, variável conforme a temperatura (CUNNINGHAM; ZALUCKI; WEST, 1999; JALLOW; MATSUMURA, 2001).

A mortalidade no estágio de ovo é alta, podendo alcançar 88%, até os três dias após a oviposição. Havendo uma correlação entre a remoção de ovos da planta e velocidade do vento e precipitação, são encontrados poucos ovos por planta sugerindo que a oviposição ocorre de forma isolada ou em pequenos agrupamentos, próximos a brotações terminais, flores e frutos (KUMAR; SAINI; RAM, 2009; MENSAH, 1996). O número estimado de ovos por fêmea pode ser superior a 3000, com uma média de 1000 a 1500, havendo variações para diferentes cultivares e espécies de plantas (FITT, 1989; JALLOW et al., 2004; NASERI et al., 2011; AFZAL; ASHFAQ; BASHIR, 2012; JADHAV et al., 2013).

O período larval é completo em aproximadamente 16 dias, com média de 2,8 dias para cada um dos seis ínstares, em que a lagarta adquire um comprimento de 30 mm a 40 mm. Inicialmente encontram-se nas diversidades mais jovens de plantas formando uma espécie de teia (ALI et al., 2009).

A coloração das larvas se modifica, nos diferentes estágios, inicialmente são branco-amareladas ou marrom-avermelhadas parecendo manchadas porque as setas acima da linha espiracular possuem pináculos pretos. Em seguida a cor é extremamente variável, com variações de tons de verde, amarelo-palha, preto, rosa ou marrom-avermelhadas, conforme a planta hospedeira da qual está se alimentando

(ALI et al., 2009; ÁVILA, J. C; VIVIAN, L. M.; TOMQUELSKI, 2013).

O oitavo segmento abdominal expande-se e se torna protuberante. O primeiro segmento abdominal também pode ser ligeiramente arqueado, com pêlos dorsais transparentes logo atrás da cabeça. No entanto é no quarto ínstar que se identifica a presença de tubérculos abdominais, formando semicírculo com aspecto de uma “sela”, no primeiro segmento abdominal. É a partir desse ínstar que há o maior consumo de alimento, cerca de 80%, adquirindo aspecto enrugado, cessando a alimentação na pré-pupa (ALI et al., 2009; ÁVILA, J. C; VIVIAN, L. M.; TOMQUELSKI, 2013).

As pupas são do tipo obtecta, características de lepidópteras. São lisas, com aspecto envernizado e de coloração marrom, havendo superfície arredondada nas partes terminais. O desenvolvimento pupal corresponde a um período de $9 \pm 0,02$ a $43 \pm 2,14$ dias (JALLOW; MATSUMURA, 2001). Geralmente há o deslocamento da lagarta até o solo, que constrói uma câmara para empulpar com profundidade média de 10 cm, permanecendo até a emergência do adulto. Entretanto em alguns frutos pode ser observada a fase de pupa no interior do mesmo.

Nesta fase pode ocorrer diapausa, quando as temperaturas forem inferiores a 13°C, em condição de seca e, conforme o fotoperíodo (FITT 1989; FENG et al., 2010; CHEN et al., 2013; JALLOW; MATSUMURA, 2001). A retenção de pigmentação nos ocelos é considerada como um indicativo de diapausa (SHIMIZU & FUJISAKI, 2002; JADHAV et al., 2013).

Os adultos tem envergadura de 35 a 40 mm e comprimento de 14 a 18 mm, manchas pretas na margem das asas dianteiras de coloração cinza-esverdeadas em machos e amareladas em fêmeas. As posteriores, no entanto, são creme com faixa marrom-escura na margem (ÁVILA, J. C; VIVIAN, L. M.; TOMQUELSKI, 2013; SPECHT; GOMES; PAULA-MORAES, 2013). Os adultos se alimentam de néctar, um recurso que pode ser determinante na atração e seleção de plantas hospedeiras, justificando assim a maior infestação no período de floração (AFZAL et al., 2012; JALLOW et al., 2004).

2.3 IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA

Devido à variação fenotípica a diferenciação morfológica entre espécies é possível apenas por meio da dissecação da genitália, em que se comparam as características das diversidades, seja em fêmeas ou machos (HARDWICK, 1965; POGUE, 2004).

Frente às espécies que ocorrem no Brasil a diferenciação torna-se necessária entre *H. zea* e *H. armigera*. Segundo Pogue (2004) e Brambila (2009) as principais diversidades da genitália que diferenciam as duas espécies são (Figura 2): O oitavo urosternito, onde a margem ventral é em formato da letra U na *H. zea* e da V na *H. armigera*. A valva é mais longa na *H. zea* do que em *H. armigera*. A vesica é invertida dentro do edeago, sendo uma espiral alongada com inúmeros espinhos ou cornutis, em número de 8 a 11 na *H. armigera* e de 12 a 16 na *H. zea*. Todavia o lobo na base da vesica, perto do ápice do aedoeagus em número de três na *H. zea* e um na *H. armigera* que melhor diferenciam as espécies (POGUE, 2004; BRAMBILA, 2009).

Também é encontrada a forma anômala de *H. zea*, que inicialmente foi descrita por OKUMURA; BAUER (1969) como uma nova espécie denominada por eles de *Heliothis stombleri*.

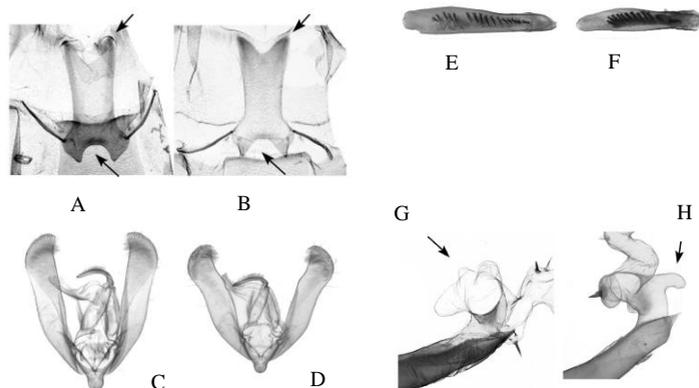


Figura 2: Oitavo urosternito-*H. zea*(A); Oitavo urosternito-*H. armigera* (B); Genitália *H. zea* (C) e genitália de *H. armigera* (D). Edeago de *H. zea* (E); Edeago de *H. armigera* (F) Lobo na base da vesica de *H. zea*(G); Lobo na base da vesica de *H. armigera*(H).

Fonte: POGUE, 2004.

Há tentativas de identificação ainda no estágio larval, observando-se algumas características, tais como: presença de tubérculos abdominais escuros na região dorsal do primeiro segmento abdominal, aparentando formato de sela; textura coriácea do tegumento diferindo de *Heliothis*; inúmeros pelos brancos, possível diferenciação

pelo formato da mandíbula, além do comportamento de encurvar a cápsula cefálica em direção ao primeiro par de falsas pernas (PASSOA, 2007).

2.4 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Os primeiros registros da *Helicoverpa armigera* foram observados na Oceania, onde ocorrem algumas outras espécies do gênero de forma endêmica, como é o caso da *Helicoverpa punctigera*. Todavia está amplamente distribuída em diversos países da Ásia, África, Oceania, Europa e mais recentemente em países da América do Sul, sendo o Brasil o primeiro a ter registro da espécie no novo mundo (CZEPAK, 2013; LAMMERS & MACLEOD, 2007).

A vasta distribuição pode ser favorecida pela globalização, seja pelo comércio internacional de commodities ou incremento do turismo (LAMMERS & MACLEOD, 2007). A dispersão natural contudo é o principal meio de introdução entre diferentes regiões, considerando a elevada capacidade de dispersão, com voos migratórios que podem alcançar até 3000 km de distância (NIBOUCHE et al., 1998).

A migração é realizada no período noturno, ocorrendo movimentos acima da camada limite de voo, por várias horas tornando possível a favor do vento o deslocamento por centenas de quilômetros em apenas uma noite (FITT, 1989; FITT; DILLON; HAMILTON, 1995). Os movimentos migratórios podem ser influenciados pelas condições noturnas e climáticas, assim podem existir diferentes padrões de movimento quando a emergência ocorre em noites diferentes (FITT, 1989).

2.5 PLANTAS HOSPEDEIRAS

Nas regiões de ocorrência por ser altamente polífaga a praga, tem sido registrada em pelo menos 60 plantas cultivadas e em 67 plantas silvestres de diferentes famílias principalmente: Asteraceae, Fabaceae, Leguminaceae, Malvaceae, Poaceae e Solanaceae (PAWAR; REED, 1982; FITT, 1989; POGUE, 2004). A preferência por plantas hospedeiras pode ser influenciada por diversos fatores, como características morfológicas, estágios fenológicos e compostos voláteis, além de características genéticas da planta hospedeira (AFZAL et al., 2012; JALLOW et al., 2004).

Quando o inseto localiza um habitat pode usar características visuais e olfativas para discriminar entre hospedeiras e plantas não hospedeiras, dando preferência pelas fases de floração (JALLOW et al.,

2004). Em diferentes regiões geográficas da Austrália Firemong; Zalucki (1990) identificaram que as populações de *H. armigera* preferiam para oviposição: tabaco, milho e girassol, seguido por soja, algodão e alfafa. Entretanto, a preferência por plantas hospedeiras identificadas em laboratório pode ser diferente daquela identificado no campo, que pode estar mais associada à abundância de uma determinada espécie (CUNNINGHAM; ZALUCKI; WEST, 1999;).

É necessário definir o que constitui uma planta hospedeira. As seguintes formas de avaliações são comumente empregadas para determinar uma planta hospedeira: A capacidade de suportar o desenvolvimento larval e a reprodução, a abundância de ovos e larvas na planta e o fitness do inseto (CUNNINGHAM; ZALUCKI; WEST, 1999; CUNNINGHAM; ZALUCKI, 2014).

A atração do odor, contudo não é indicada para estabelecer uma planta hospedeira, pois poderia depositar ovos sem haver o desenvolvimento até a fase adulta. Os adultos são atraídos por flores e néctar, o pólen do eucalipto foi o mais comum na espirotromba de *H. armigera* na Austrália, todavia ela não é uma espécie de planta hospedeira (GREGG, 1993).

A escolha da planta pode estar associada à presença de predadores e parasitoides, abundância de uma determinada espécie de planta e fatores genéticos. São registradas como plantas hospedeiras do total de espécies de cada família uma porcentagem de 33%, 27%, 11%, 7%, 10% e 9% em Asteraceae, Fabaceae, Malvaceae, Brassicaceae, Solanaceae e Poaceae respectivamente (CUNNINGHAM; ZALUCKI, 2014).

Em se tratando do gênero *Helicoverpa* há evidência de que as populações são mais abundantes em diversos sistemas de cultivo. O milho, por exemplo, é o hospedeiro preferido de *H. armigera* e *H. zea* durante o espigamento, a cultura pode atuar como uma fonte de espécimes que podem se deslocar para as culturas subsequentes (FITT, 1989).

2.6 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

Os prejuízos econômicos ocasionados por essas pragas são elevados, tanto pelo aumento do custo de controle quanto pela redução de produção. Em 1982 Pawar e Reed já relatavam *Heliothis* como um problema global, descrevendo prejuízos causados desde 1930 por *H. virescens* na América do Sul, além de perdas por *H. zea* nos EUA em milhões dólares e perdas causadas por *H. armigera* na Índia de mais de US\$ 300 milhões por ano. Na safra 2002-2003 na Austrália o custo

estimado para o controle de *Helicoverpa* spp. na produção convencional de algodão foi de aproximadamente US\$282 milhões por ano, sem considerar os danos ao meio ambiente (FITT & COTTER, 2005).

No Brasil as perdas iniciais no cultivo de algodão no Oeste da Bahia foram estimadas em dois bilhões de reais, na safra 2012-2013, sendo observados enormes prejuízos em outras culturas, tais como soja, tomate e feijão (MAPA, 2013).

A *H. armigera* era considerada anteriormente uma praga quarentenária ausente², conforme a Instrução Normativa (IN) nº 41, de 01 de julho de 2008, sendo excluída da categoria pela IN nº 59, de 18 de dezembro de 2013, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), por estar amplamente distribuída por todo o território nacional.

Há relatos na mídia de perdas na ordem de bilhões de reais, nas mais diversas Unidades da Federação (UF) com a presença da praga, fato que originou tentativas muitas vezes errôneas de controle, com o uso abusivo de inseticidas, sem levar em consideração a presença e o monitoramento da espécie. Há estimativas que os custos com inseticidas no país aumentaram em 30%, chegando a R\$ 374,00 por hectare (BRASIL, 2014).

Como estratégia de controle, o MAPA homologou a IN Nº 13 de 03 de abril de 2013, autorizando a possível importação e aplicação, em caráter emergencial de agrotóxicos com o ingrediente ativo benzoato de emamectina, definindo os procedimentos para tal, por intermédio da IN nº 8, de 5 de abril de 2013.

Em 18 de abril de 2013 o MAPA publicou a Instrução Normativa nº12, que definia as medidas a serem adotadas visando à prevenção, contenção, controle e erradicação, em função da emergência fitossanitária declarada para a praga. As medidas de Defesa Sanitária Vegetal (DSV) deveriam ser estabelecidas pelos órgãos estaduais, que realizariam o levantamento de detecção e delimitação da ocorrência da praga. As medidas contemplariam o uso de cultivares que restrinjam a população, a determinação de épocas de plantio e restrição de cultivos subsequentes, vazio sanitário, uso de controle biológico, uso de armadilhas, iscas ou outros métodos de controle físico, adoção do Manejo Integrado de Pragas (MIP), rotação de culturas; escalonamento

² Praga de importância econômica potencial para uma área em perigo, porém não presente no território nacional, conforme definido pela IN nº 52, de 20 de novembro de 2007 do MAPA.

de plantio, adoção de áreas de refúgio, destruição de restos culturais e plantas voluntárias e outras.

As Instruções Normativas supracitadas foram revogadas pela portaria 1.059 de 31 de outubro de 2013, pois a partir de então se estabelecia o estado de emergência, reconhecendo o que havia sido contemplado nos atos anteriormente publicados. Primeiramente foi declarado o estado de emergência fitossanitária na região do Oeste da Bahia, com base na Lei 12.873, de 24 de outubro de 2013.

A partir da Lei 12.873, o estado de emergência fitossanitária pode ser declarado pelo MAPA, quando constatada situação epidemiológica que indique risco eminente de introdução de praga quarentenária ausente no país. O Decreto nº 8.133, de 28 de outubro de 2013 que dispõe sobre a lei, afirma que deverá ser considerado a gravidade, a capacidade de resposta disponível e os efeitos sobre a economia, indicando as diretrizes e medidas do MIP, incluindo produtos já registrados.

Por todos os atos normativos homologados pelo MAPA e pelos prejuízos registrados em diversos cultivos agrícolas é perceptível a relevância do impacto econômico, social e ambiental decorrente da introdução da *H. armigera*, no cenário agrícola nacional e catarinense, caracterizado pelo cultivo de diversas plantas hospedeiras da praga.

2.7 ANÁLISES MOLECULARES

Conhecer o perfil molecular de uma espécie de importância agrícola é estratégico para melhor compreender a dinâmica populacional, origem geográfica de populações, fluxo gênico, resistência a inseticidas e a plantas geneticamente modificadas. Também auxiliam de forma ágil e precisa na correta identificação, essencial em programas de defesa sanitária vegetal que visem à detecção de espécies exóticas introduzidas em novas áreas (MASTRANGELO, 2014).

Com o advento das técnicas moleculares e o interesse na identificação de espécies e em contrapartida redução no número de taxonomistas, boa parte do desenvolvimento dos estudos tem incidido sobre a utilização de *mtDNA*, seja sobre a sequência de código de barras (barcoding), PCR-RFLP que utiliza enzimas de restrições ou PCR real time.

O DNA mitocondrial animal (*mtDNA*) é uma molécula pequena e circular com 16 a 20 kilobases (kb), podendo variar de tamanho conforme a espécie, sendo comumente utilizado em estudos de genética de populações de insetos, filogenética, identificação molecular e filogeografia (NELSON; PRODÖHL; AVISE, 1996; LI et al., 2010).

Apresenta características de rápida substituição de nucleotídeos, amplificação e sequenciamento relativamente fácil devido a múltiplas cópias em cada célula, herança clonal, cópia única, abundância e facilidade na manipulação (SIMONS et al., 1994; NELSON; PRODÖHL; AVISE, 1996; LI et al., 2010).

A mitocôndria é associada com o citoesqueleto movendo-se coordenadamente durante a divisão celular e diferenciação (YAFFE, 1999). Com algumas exceções a herança é materna, pois o *mtDNA* paternal não é transmitido na fertilização, sendo ausente ou contribuindo muito pouco no desenvolvimento do embrião, desaparecendo nas etapas seguintes do desenvolvimento (KAMBHAMPATI; SMITH, 1995).

O genoma mitocondrial já foi sequenciado em 175 insetos de 22 ordens, na maioria pertencente às ordens, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Orhoptera. Havendo 13 subunidades de proteína de codificação, dentre estas: COI-III; CytB; NDI-6; ND4L, ATP6 E ATP8 (LI et al., 2010).

O *mtDNA* em insetos em genes muito semelhantes em várias ordens, a diferença do conteúdo GC no entanto sugere que haja múltiplos ancestrais mitocondriais (CHANDRA; VLK; KAPATRAL, 2006). As sequências mitocontriiais em animais evoluem rapidamente, porém em insetos os arranjos desses genes são na maioria estáveis, sendo conservados por longos períodos na escala evolutiva, sendo assim considerados importantes para solucionar questões divergentes na entomologia (LI et al., 2010) .

A confiabilidade de estudos moleculares baseados em *mtDNA* tem sido questionados após terem sido encontradas em vários táxons pseudogenes mitocondriais (numts) , cópias não funcionais incorporadas ao genoma nuclear. Muitos estudos não citam essa possível contaminação, nem utilizam métodos que poderiam mitigar o problema, como o uso de primers mais específicos, e complementarmente o uso de informações morfológicas e ecológicas (BUHAY, 2009; MOULTON; SONG; WHITING, 2010; LEITE, 2012).

Contudo o *mtDNA* trouxe diversos avanços em pesquisas para a conservação da diversidade bem como pra a identificação de espécies exóticas invasoras e auxiliou na identificação e estudos da diversidade genética da *Helicoverpa armigera* no Brasil e em diversos outros países (SPECHT; GOMES; PAULA-MORAES, 2013; TAY et al., 2013; MASTRANGELO et al., 2014).

2.8 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA

A técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) é baseada na clivagem da dupla fita de DNA por enzimas de restrição, gerando fragmentos de número e tamanho diferente, que são visualizados em gel de poliacrilamida ou agarose. Os amplicons são digeridos por endonucleases específicas, podendo-se visualizar fragmentos de tamanhos diferentes quando os sítios de restrição estão localizados em locais diferentes das fitas de DNA. O PCR-RFLP tem sido bastante utilizado para diferenciar espécies, raças e haplótipos, como por exemplo, em *Spodoptera frugiperda* nos Estados Unidos, México, Brasil e Argentina (SOSA-GÓMEZ; HOFFMANN-CAMPO, 2013).

O resultado da clivagem por enzima de restrição pode ser visualizada por eletroforese, sendo um método que não necessita de uma grande diversidade de equipamentos. A dificuldade está em encontrar a variação exata que afeta o mesmo local que a enzima de restrição irá reconhecer (RASMUSSEN, 2012).

Para o gênero *Helicoverpa* a técnica tem se mostrado como um método seguro para diferenciar as espécies *H. assulta*, *H. punctigera*, *H. zea* e *H. armigera* (KRANTHI et al., 2005; BEHERE et al., 2008).

Os marcadores microssatélites são repetições em séries de sequências simples repetidas (*SSR-Simple Sequence Repeats*) de DNA, com variável número de tandem de 1 a 6 pares de bases (pb), que ocorre no genoma de organismos procariontes e eucariontes (TÓTH; GÁSPÁRI; JURKA, 2000; BUSCHIAZZO; GEMMELL, 2006; OLIVEIRA et al., 2006a; WANG; BARKLEY; JENKINS, 2009).

São classificados em perfeitos, imperfeitos, interruptos ou composto, de acordo com o tipo de sequência. Quando perfeitos, as sequências repetidas não são interrompidas por nenhuma base diferente do motivo, diferentemente dos imperfeitos. Os interruptos apresentam uma sequência dentro da repetição que não combina com o restante, quando há duas sequências repetidas adjacentes são denominados compostos. (OLIVEIRA et al., 2006b).

As repetições estão espalhadas pelo genoma em tandem mono, di, tri, tetranucleotídeos e algumas vezes com penta e hexanucleotídeos, encontra-se em regiões codificantes ou não, havendo baixa densidade de microssatélites em regiões codificadas, com apenas tri e hexa nucleotídeos em excesso, em contraste com outros tipos de repetições que são mais frequentes em não-codificantes (OLIVEIRA et al., 2006b).

Dentre os atributos dos marcadores microssatélites estão à alta reprodutividade e resolução, além do caráter codominante e multialélico que os torna mais informativos (WRIGHT; BENTZEN, 1994; OLIVEIRA et al., 2006; WANG; BARKLEY; JENKINS, 2009).

O termo DNA satélite surgiu a partir da observação de uma fração detectável em um pico satélite em gradiente de densidade de centrifugação. Os microssatélites estão entre as sequências de DNA com maior variabilidade no genoma, tornando-se fácil a análise de genotipagem de polimorfismo com o advento da PCR no final de 1980, sendo que essas sequências foram descobertas no início dessa década (ELLEGREN, 2004).

São os marcadores mais escolhidos, sendo utilizado em estudos de diversidade genética, mapeamento, filogenética, parentesco, epidemiologia, por serem abundantes e com alta variabilidade e uniformidade. Na entomologia são usados para entender a evolução e diversidade dos insetos e consequentemente utilizados em programas de conservação de espécies úteis e para o manejo de pragas (ELLEGREN, 2004; BUSCHIAZZO; GEMMELL, 2006). (WANG; BARKLEY; JENKINS, 2009)

As sequências repetidas de microssatélites em artrópodes podem consistir mais frequentemente de dinucleotídeos (AC, AT, AG), trinucleotídeos (AGC, AAC, AAT) ou tetranucleotídeos (ACAT, AAAT, AAAC) (TÓTH; GÁSPÁRI; JURKA, 2000).

A gênese dos microssatélites não é esclarecida, havendo a hipótese de surgirem espontaneamente dentro de sequências únicas ou trazidos por elementos móveis para locais receptivos do genoma. Esses elementos podem conter um ou mais locais para a formação de microssatélites, favorecendo a dispersão no genoma.

Inicialmente eram considerados neutros, não sendo afetados pela pressão de seleção, porém a taxa de mutação é alta variando de 107 a 103 mutações por loco, por geração em eucarionte, que são afetados pela natureza, contexto genômico, biológico do microssatélite (OLIVEIRA et al., 2006a; BUSCHIAZZO; GEMMELL, 2006).

O grau de polimorfismo é proporcional à taxa de mutação subjacente, dado o grande polimorfismo dos microssatélites as mutações ocorrem com frequência. As taxas de mutações diferem entre os locos e alelos e talvez, consequentemente entre espécies, sendo o comprimento de microssatélites o fator que influencia essa alíquota. Por tanto é importante selecionar marcadores que se encontram bem caracterizados em termos de propriedade mutacional, taxas uniforme e padronizadas (ELLEGREN, 2004).

Pode haver transferência de marcadores microssatélites inter especificamente entre insetos, que depende da distância filogenética, podendo estar relacionada com o tempo de geração, tamanho do genoma e sistema de criação (WANG; BARKLEY; JENKINS, 2009).

Há mais trinucleotídeos em *H.armigera* com a maioria deles vindo de um loco de cópia única, o que compensa de certa forma a dificuldade de isolamento de microssatélites (JI; ZHANG, 2004).

Os marcadores microssatélites em lepidopteras geralmente são de elevada redundância e baixa frequência, pois as sequências existem em múltiplas cópias no genoma, com similares ou idênticas regiões flanqueadoras. Entretanto o polimorfismo é acessado em cópia única, sendo assim as várias regiões flanqueadoras podem ser amplificadas num mesmo par de iniciadores, confundindo os dados dessa forma. Poucas são as sequências de microssatélites em lepidopteras , não havendo mais de 5 locos na média isolados em cada caso, bastante inferior a outros insetos , como *Apis mellifera* que apresenta 75 locis (ZHANG, 2004).

Em espécies do gênero *Helicoverpa* apresentam problemas na marcação de alelos, presença de alelos nulos, com eficiência de clonagem baixa em torno de 2,5% a 3,8% e 70% dos locos clonados em uma ou ambas as regiões flanqueadas que são formadas por DNA repetitivo (SCOTT et al., 2004; ZHANG, 2004; JI; WU; ZHANG, 2005).

A presença de alelos nulos sugere uma alta taxa de mutação em regiões flanqueadores das sequências de microssatélites em lepidopteras. Elementos móveis podem estar associados à dispersão desses no genoma o que pode levar a muitas seções de DNA microssatélite com flanqueamento idêntico (ZHANG, 2004).

Os marcadores microssatélites são bastante utilizados na análise de diversidade genética de populações, que gera subsídios para programas de conservação, teste de paternidade, construção de mapas genéticos. Na agricultura seu uso está relacionado à geração de informações quanto ao manejo de resistência à inseticidas e à toxinas de plantas geneticamente modificadas (WRIGHT; BENTZEN, 1994; BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002; OLIVEIRA et al., 2006; ENDERSBY et al., 2007; SCOTT et al., 2007; PERERA; BLANCO, 2011).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFZAL, M.; ASHFAQ, M.; BASHIR, M. H. Oviposition Responses of *Helicoverpa armigera* Towards the Morphological Plant Characters of Some Genotypes of Cotton. **Pakistan J. Zool.**, v. 44, n. 4, p. 1091–1097, 2012.

ALI, A. et al. Some Biological Characteristics of *Helicoverpa armigera* on Chickpea. **Journal of Plant Protection**, v. 4, n. 1, p. 99–106, 2009.

ÁVILA, J. C; VIVIAN, L. M.; TOMQUELSKI, G. V. **Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas.** Disponível em: [http://www.cnpsa.embrapa.br/caravana/pdfs/FINAL_Circular_Tecnica_23_CP_AO\(1\).pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/caravana/pdfs/FINAL_Circular_Tecnica_23_CP_AO(1).pdf). Acesso em: 19 jun. 2015.

BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular ecology**, v. 11, p. 155–65, 2002.

BEHERE, G. T. et al. Molecular markers to discriminate among four pest species of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of entomological research**, v. 98, n. 6, p. 599–603, dez. 2008.

BUHAY, J. E. “COI-like” Sequences are Becoming Problematic in Molecular Systematic and DNA Barcoding Studies. *Journal of Crustacean Biology*, 29(1), 96-1. **Journal of Crustacean Biology**, v. 29, n. 1, p. 96–110, 2009.

BUSCHIAZZO, E.; GEMMELL, N. J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **BioEssays**, v. 28, n. 10, p. 1040–1050, 2006.

BRAMBILA, J. **Instruction for dissecting male genitalia of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae) to separate *H. zea* from *H. armigera*.** Disponível em: https://www.aphis.usda.gov/plant_health/plan_pest_info/owb/download/owb-screeningaid2.pdf. Acesso em: 10 out. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 41, de 1 de jul. de 2008. Lista de pragas quarentenárias. **Diário Oficial da União**, 02 de julho de 2008, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 59, de 18 de dez. de 2013. Excluir da Lista de Pragas Quarentenárias Ausentes (A1). **Diário Oficial da União**, 19 de dezembro de 2013, Seção 1, p. 91-92.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 13, de 03 de abr. de 2013 (revogada pela Portaria 1059/2013/MAPA). Autoriza a importação e aplicação, em caráter emergencial, de produtos agrotóxicos, registrados em outros países, que tenham como ingrediente ativo único a substância benzoato de emamectina com intuito de conter a praga *Helicoverpa armigera*. **Diário Oficial da União**, 04 de abril de 2013, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 08, de 05 de abr. de 2013 (revogada pela Portaria 1059/2013/MAPA). Autoriza e defini os procedimentos para importação, em caráter emergencial, de produtos agrotóxicos registrados em outros países, que tenham como ingrediente ativo único a substância benzoato de emamectina para fins exclusivos de controle da praga *Helicoverpa armigera*. **Diário Oficial da União**, 08 de abril de 2013, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 12, de 18 de abr. de 2013 (revogada pela Portaria 1059/2013/MAPA). Defini as medidas de Defesa Sanitária Vegetal a serem adotadas visando à prevenção, contenção, controle e erradicação, em função da emergência fitossanitária declarada para a praga *Helicoverpa armigera*. **Diário Oficial da União**, 22 de abril de 2013, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 1059, de 31 de outubro de 2013. Declara estado de emergência fitossanitária relativo ao intensivo ataque da praga *Helicoverpa armigera* na região do Oeste do Estado da Bahia para implementação do plano de supressão da praga e adoção de medidas emergenciais. **Diário Oficial da União**, 04 de novembro de 2013, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 12873 de 24 de outubro de 2013. Autoriza o Poder Executivo a declarar estado de emergência fitossanitária ou zoossanitária, quando for constatada situação epidemiológica que indique risco iminente de introdução de doença exótica ou praga quarentenária ausente no País, ou haja risco de surto ou epidemia de doença ou praga já existente. **Diário Oficial da União**, 25 de outubro de 2013, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 8133 de 28 de outubro de 2013. Dispõe sobre a declaração de estado de emergência fitossanitária ou zoossanitária que trata a Lei nº 12873, de 24 de outubro de 2013, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 29 de outubro de 2013, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Agronegócio brasileiro em números.

Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Sala de Imprensa/Publicações/graficos_portugues_corrigido2.pdf>. Acesso em: 26 fev. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Programa de supressão da. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/PROGRAMA SUPRESSAO BAHIA 2013 - MAPA _2_.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Impacto**

da política fitossanitária: Levantamento do Departamento de

Sanidade Vegetal mensura impactos. Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2014/12/impacto-da-politica-fitossanitaria>>. Acesso em: 20 jun. 2015

SANTA CATARINA. Manual operativo, programa santa catarina rural , competitividade da agricultura familiar de santa catarina.

Disponível em: <http://www.microbacias.sc.gov.br/abrirConsultaGeral.do>. Acesso: 11 nov. 2013.

CHANDRA, S. B. C.; VLK, J. L.; KAPATRAL, V. Comparative insect mitochondrial genomes: Differences despite conserved genome synteny. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 14, p. 1308–1318, 2006.

CHEN, Y.-S. et al. Photoperiod and temperature influence significantly diapause intensity of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Entomologica Sinica**, v. 56, n. 2, p. 145–152, 2013.

CHO, S. et al. Molecular phylogenetics of heliothine moths (Lepidoptera: Noctuidae: Heliiothinae), with comments on the evolution of host range and pest status. **Systematic Entomology**, v. 33, n. 4, p. 581–594, 24 out. 2008.

CUNNINGHAM, J. P.; ZALUCKI, M. P. Understanding Heliothine (Lepidoptera: Heliiothinae) Pests: What is a Host Plant? **Entomological Society of America**, v. 107, n. 3, p. 881–896, 2014.

CUNNINGHAM, J. P.; ZALUCKI, M. P.; WEST, S. A. Learning in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): a new look at the behaviour and control of a polyphagous pest. **Bulletin of Entomological Research**, v. 89, n. 03, p. 201–207, 9 mar. 1999.

CZEPAK, C. K. C.; ALBERNAZ, L. M.; VIVAN, H. O. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical (Agricultural Research in the Tropics)**, v. 2013, p. 110–113, 2013.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature reviews. Genetics**, v. 5, n. 6, p. 435–445, 2004.

FAO. **Edible insects. Future prospects for food and feed security**. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/018/i3253e/i3253e.pdf>. Acesso em: 19 jun. 2015.

FENG, H. et al. Seasonal Migration of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) Over the Bohai. **Journal of Economic Entomology**, v. 102, n. 1, p. 95–104, 2009.

FENG, H. et al. Modeling the population dynamics of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) over a wide area in northern China. **Ecological Modelling**, v. 221, n. 15, p. 1819–1830, jul. 2010.

FITT, G.; COTTER, S. . The *Helicoverpa* problem in Australia. **CSIRO Entomology**, p. 1–38, 2005.

FITT, G. P. The Ecology of *Heliothis*. **Ann. Rev. Entomol.** **1989**, v. 34, n. 66, p. 17–52, 1989.

FITT, G. P.; DILLON, M. L.; HAMILTON, J. G. Spatial dynamics of *Helicoverpa* populations in Australia□: simulation modelling and empirical studies of adult movement. **Computers and electronics in agriculture**, v. 13, p. 177–192, 1995.

HARDWICK, D.F. The corn earworm complex. **Memoirs of the Entomological Society of Canada**, v.97, p.5247, 1965. Supplement S40. DOI: 10.4039/entm9740fv.

JADHAV, D. R.; ARMES, N. J.; BHATNAGAR, V. S. Incidence of Winter and Summer Diapause in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera□: Noctuidae) in Andhra Pradesh , India. **Asian Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 3, p. 40–51, 2013.

JALLOW, M. F. .; PAUL CUNNINGHAM, J.; ZALUCKI, M. P. Intra-specific variation for host plant use in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): implications for management. **Crop Protection**, v. 23, n. 10, p. 955–964, out. 2004.

JALLOW, M. F. A; MATSUMURA, M. Influence of temperature on the rate of development of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera□: Noctuidae). **Plant Pathology**, v. 36, n. 4, p. 427–430, 2001.

JI, Y.-J.; ZHANG, D.-X. Characteristic of microsatellite DNA in lepidopteran genomes and implications for their isolation. **Acta Zoologica Sinica**, v. 50, n. 4, p. 608–614, 2004.

KAMBHAMPATI, S.; SMITH, P. T. PCR primers for the amplification of four insect mitochondrial gene fragments. **Insect molecular biology**, v. 4, n. 1 1995, p. 233–236, 1995.

KRANTHI, S. et al. A PCR – RFLP tool for differentiating *Helicoverpa armigera* and *H. assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). **Current Science** n. 89, p. 1322-1323.

KUMAR, S.; SAINI, R. K.; RAM, P. Natural mortality of *Helicoverpa armigera* (Hübner) eggs in the cotton ecosystem. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 11, n. 1, p. 17–25, 2009.

LAFONTAINE, J. D.; FIBIGER, M. Revised higher classification of the Noctuoidea (Lepidoptera). **The Canadian Entomologist**, v. 138, n. 1956, p. 610–635, 2006.

LAMMERS, J. W.; MACLEOD, A. Report of a Pest Risk Analysis. **Plant Protection Service (NL) and Central Science Laboratory (UK)**, n. August, p. 1–18, 2007.

LEITE, L. A. R. Mitochondrial pseudogenes in insect DNA barcoding: differing points of view on the same issue. **Biota Neotropica**, v. 12, n. 3, p. 301–308, 2012.

LI, H. et al. Progress in the Researches on Insect Mitochondrial Genome and Analysis of Gene Order. **Science Foundation in China**, v. 17, n. 2, p. 39–45, 2010.

MASTRANGELO, T. et al. Detection and Genetic Diversity of a Heliothine Invader (Lepidoptera□: Noctuidae) From North and Northeast of Brazil. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 3, p. 970–980, 2014.

MENSAH, R. K. Suppression of *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) oviposition by use of the natural enemy food supplement Envirofeast R. **Australian Journal of Entomology**, v. 35, p. 323–329
ST – Suppression of *Helicoverpa* spp. (Lep, 1996.

MIKKOLA, K. The Noctuoidea (Lepidoptera) described by Linnaeus. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 108, n. 2, p. 103–169, jun. 1993.

- MILLER, J. S. Cladistics and Classification of the Notodontidae (Lepidoptera, Noctuoidea) Based on Larval and Adult Morphology. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, n. 204, p. 1–221, 1991.
- MITCHELL, A.; MITTER, C.; REGIER, J. C. Systematics and evolution of the cutworm moths (Lepidoptera: Noctuidae): Evidence from two protein-coding nuclear genes. **Systematic Entomology**, v. 31, n. 1, p. 21–46, 2006a.
- MITCHELL, A.; MITTER, C.; REGIER, J. C. Systematics and evolution of the cutworm moths (Lepidoptera: Noctuidae): Evidence from two protein-coding nuclear genes. **Systematic Entomology**, v. 31, p. 21–46, 2006b.
- MITTER, C.; POOLE, R. W.; MATTHEWS, M. BIOSYSTEMATICS OF THE HELIOTHINAE (LEPIDOPTERA □: NOCTUIDAE) I. **Annu. Rev. Entomol.**, n. 38, p. 207–225, 1993.
- MOULTON, M. J.; SONG, H.; WHITING, M. F. Assessing the effects of primer specificity on eliminating numt coamplification in DNA barcoding: A case study from Orthoptera (Arthropoda: Insecta). **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 4, p. 615–627, 2010.
- MURÚA, M. G. et al. First Record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera □: Noctuidae) in Argentina. **Florida Entomological Society**, v. 97, n. 2, p. 854–856, 2014.
- NASERI, B. et al. Comparative Reproductive Performance of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera □: Noctuidae) Reared on Thirteen Soybean Varieties. **J. Agr. Sci. Tech**, v. 13, p. 17–26, 2011.
- NELSON, W. S.; PRODÖHL, P. A; AVISE, J. C. Development and application of long-PCR for the assay of full-length animal mitochondrial DNA. **Molecular ecology**, v. 5, p. 807–810, 1996.
- NIBOUCHE, S. et al. Allozyme polymorphism in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): comparison of African and European populations. **Heredity**, v. 80, n. 4, p. 438–445, 1998.

OLIVEIRA, E. J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294–307, 2006.

PASSOA, S. **Identification Guide to larval Heliothinae (Lepidoptera: Noctuidae) of quarantine significance**. Disponível em: https://caps.ceris.purdue.edu/webfm_send/109. Acesso em: 01 jul. 2015.

PAWAR, C. S.; REED, W. **Heliothis□: a Global Problem**. Disponível Acesso em: 21 jul. 2013.em: http://oar.icrisat.org/4046/1/CP_054.pdf.

PERERA, O. P.; BLANCO, C. A. (Boddie) Populations in the Southern United States. **Southwestern Entomologist**, v. 36, n. 3, p. 271–286, 2011.

POGUE, M. G. A New Synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and Differentiation of Adult Males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera□: Noctuidae□: Heliothinae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, n. 6, p. 1222–1226, 2004.

RASMUSSEN, H. B. **Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis-Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting**. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/restriction-fragment-length-polymorphism-analysis-of-pcr-amplified-fragments-pcr-rflp-and-related-te>>. Acesso em: 19 jun. 2015.

REINERT, J. A et al. Resistance among Lantana Cultivars to the Lantana Stick Caterpillar, *Neogalea sunia* (Lepidoptera: Noctuidae). **Southwestern Entomologist**, v. 35, n. 1, p. 51–58, 2010.

ROFF, D. A.; FAIRBAIRN, D. J. The evolution and genetics of Migration in Insects. **BioScience**, v. 57, n. 2, p. 155–164, 2007.

SCOTT, K. D. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 204–205, 2004.

SCOTT, K. D. et al. Gene-flow between populations of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) is highly variable between years. **Bulletin of Entomological Research**, v. 95, n. 04, p. 381–392, 9 mar. 2007.

SHIMIZU, K.; FUJISAKI, K. Sexual differences in diapause induction of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hb.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 37, n. 4, p. 527–533, 2002.

SIMONS, C. et al. **Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers** *Annals of the Entomological Society of America*, 1994. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/esa/aesa/1994/00000087/00000006/article00001npapers2://publication/uuid/4C3980B2-6015-4EF3-8D11-CA35958CA7DC>>. Acesso em: 17 abr. 2015.

SINGH KRITI, J.; A. DAR, M.; H. KHAN, Z. Biological and Taxonomic Study of Agriculturally Important Noctuid Pests of Kashmir. **World Journal of Agricultural Research**, v. 2, n. 2, p. 82–87, 30 mar. 2014.

SOSA-GÓMEZ. et al.. A Biotecnologia, o Melhoramento e o Manejo de pragas da soja - **Soja - Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-Praga**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2013. p. 725-788.

SPECHT, A.; GOMEZ, D. R. S.; PAULA-MORAES, S. V. Identificação morfológica e molecular de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) e ampliação de seu registro de ocorrência no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 6, p. 689-692, 2013.

TAY, W. T. et al. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.

TÓTH, G.; GÁSPÁRI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. **Genome research**, v. 10, n. 7, p. 967–981, 2000.

TOURLE, R. Effects of ant predation on the efficacy of biological control agents: *hypena laceratalis* walker (Lepidoptera: Noctuidae); *Falconia intermedia* distant (Hemiptera: Miridae) and *Teleonemia scrupulosa* Stål (Hemiptera: Tingidae) on *Lantana camara* (Verbenaceae) in South Africa. 2010. 123 P. **Master of Science**- Rhodes University, South Africa, 2011.

VILLAS-BOAS, I. M. et al. Premolis semirufa (Walker, 1856) envenomation, disease affecting rubber tappers of the Amazon: Searching for Caterpillar-Bristles toxic components. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2012.

WANG, M. L.; BARKLEY, N. A.; JENKINS, T. M. Microsatellite markers in plants and insects. Part I: applications of biotechnology. **Genes, genomes and, genomics**, v. 3, p. 54–67, 2009.

WARD, L. K.; SPALDING, D. F. Phytophagous British insects and mites and their food-plant families: total numbers and polyphagy. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 49, n. 3, p. 257–276, 1993.

WRIGHT, J. M.; BENTZEN, P. Microsatellites: genetic markers for the future. v. 4, p. 384–388, 1994.

YAFFE, M. P. The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. **Science (New York, N.Y.)**, v. 283, n. 5407, p. 1493–1497, 1999.

ZAHIRI, R. et al. A new molecular phylogeny offers hope for a stable family level classification of the Noctuoidea (Lepidoptera). **Zoologica Scripta**, v. 40, n. 2, p. 158–173, 2011.

ZAHIRI, R. et al. Relationships among the basal lineages of Noctuidae (Lepidoptera, Noctuoidea) based on eight gene regions. **Zoologica Scripta**, v. 42, n. 5, p. 488–507, 2013.

ZHANG, D. X. Lepidopteran microsatellite DNA: Redundant but promising. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 19, n. 10, p. 507–509, 2004.

3 **CAPÍTULO II – Ocorrência e distribuição da *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1809) (Lepidoptera:Noctuidae) no Estado de Santa Catarina.**

RESUMO

Para verificar a ocorrência e a distribuição da *Helicoverpa armigera* praga no Estado de Santa Catarina (SC) foi realizado um levantamento no período de novembro de 2013 a março de 2014, por meio de 214 armadilhas tipo delta com feromônio sexual específico para o gênero, georreferenciadas e distribuídas em 121 unidades de produção de distintos cultivos agrícolas. Tal monitoramento foi estendido para a safra 2014-2015 com 93 armadilhas distribuídas em 64 unidades de produção. As mariposas capturadas foram submetidas à identificação morfológica através da dissecação da genitália e análise das estruturas para a diferenciação de espécies, tais como: oitavo uroesternito, edeago e lobo na base da vesica. A presença da praga entre as safras 2013 – 2014 e 2014 – 2015 foi confirmada em 49 municípios, sendo submetidos a identificação 1401 espécimes e já no primeiro período observou-se que 82,2% pertenciam à espécie *H. armigera*. As armadilhas com feromônios sexual sintético em que foram coletados insetos adultos de *H. armigera* estavam em unidades de produção de trigo (*Triticum aestivum*), feijão (*Phaseolus vulgaris*), milho (*Zea mays*), e tabaco (*Nicotiana tabacum*). A coleta de lagartas e posterior identificação das mesmas permitiu determinar como plantas hospedeiras as seguintes espécies: tomate (*Solanum esculentum*), soja (*Glycine max*). Houve um maior número de indivíduos capturados em regiões com produção de soja. Foram também observados danos na cultura do tomate em Caçador – SC.

Palavras-chave: Planta hospedeira. Espécie exótica. Armadilha de feromônio.

ABSTRACT

The occurrence and distribution of *Helicoverpa armigera* in the State of Santa Catarina were examined by pheromone trap captures from 2013 - 2014, through 214 traps, geo-referenced and distributed in 121 farmers and from 2014 - 2015, through 93 traps in 64 farmers, in different crop. The moths were submitted to morphological identification, the diagnostic characters such as the vesica of the male genitalia, by the number of diverticula at the base, the length and number of coils; the number of cornutis visible on the uninflated vesica inside the aedoeagus, and valve length. The presence of *H. armigera* was confirmed in the first year of survey and was detected, in 49 locals, being present in all SC regions. A total of 1401 individuals were sampled, in first year 82.2% were the species *H. armigera*. There were collected several species of *Helicoverpa* in the same trap. The farmers with trap capture (potential host plant) were: wheat (*Triticum aestivum*), beans (*Phaseolus vulgaris*), corn (*Zea mays*), soybean (*Glycine max*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*). Caterpillars were recorded in the in tomato crop (*Solanum esculentum*) and soybean (*Glycine max*), constitutes a host plant. The greatest number of *H. armigera* was captured next to soybean farmers and there occurred a significant damage in tomato crops.

Key-words: Host plant. Invasive species. Survey. Trap pheromone.

3.1 INTRODUÇÃO

A *Helicoverpa armigera*, denominada até então como lagarta do velho mundo “old world bollworm”, por ocorrer em parte da Europa, África, Ásia e Oceania (MITTER et al., 1993; LAMMERS; MACLEOD, 2007), foi identificada no Brasil em meados de 2013, sendo responsável por perdas significativas na produção das principais culturas anuais do Brasil, no que tange a extensão de áreas plantadas.

A presença da espécie foi registrada inicialmente no Oeste da Bahia, na cultura do algodão, e em feijão, milho, soja e tomate na região Centro-Oeste do país (CZEPAK et al., 2013; SPECHT et al., 2013). Posteriormente houve sucessivas confirmações da ocorrência, nos mais diversos estados brasileiros com expressiva produção agrícola.

Até o momento não estava confirmada a presença da *H. armigera* em território catarinense. No entanto devido à elevada capacidade de dispersão, através de voos migratórios de até 3000 quilômetros (FITT, 1989; LAMMERS;MACLEOD, 2007), havia uma grande probabilidade de sua ocorrência no Estado.

Mesmo com a exclusão da lista de pragas quarentenárias por meio da IN n° 59, de 18 de dezembro de 2013, várias outros atos normativos foram relacionados à praga, e o Estado, por intermédio do órgão de Defesa Sanitária Vegetal, representado pela Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC), precisava de informações sobre a dinâmica populacional da *H. armigera* para que fossem tomadas decisões que auxiliassem no seu controle e supressão.

Em decorrência dos prejuízos expressivos e a dificuldade enfrentada pelos produtores para o controle, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicou diversos atos normativos que dentre as resoluções contemplavam a autorização da importação de agrotóxicos, como os que eram formulados por meio da adição do princípio ativo benzoato de emamectina, cujo uso não era lícito frente à Lei Federal de agrotóxico n° 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto Federal n° 4.074, de 04 de janeiro de 2002, que preceitua o registro de produtos agrotóxicos aos que tiverem menor ação tóxica à seres humanos, animais e ao meio ambiente do que aqueles já registrados ao mesmo fim.

Um método bastante utilizado para detectar e monitorar lepidopteras em um determinado território é por meio de armadilhas tipo Delta contendo feromônio sexual sintético, para captura de machos,

sendo uma solução eficiente e de fácil uso, além de gerar informações sobre a intensidade da praga em um determinado local.

Depois de detectado no continente americano, países como os Estados Unidos, têm efetuado monitoramentos com armadilhas para verificar a possível presença da espécie, sendo esta notificada, mais recentemente na Costa Rica, além da Argentina e Paraguai, países limítrofes ao Brasil (APHIS, 2014; MURÚA et al., 2014).

No Brasil há a comercialização de feromônios para a captura do gênero *Helicoverpa*, sendo necessária após a captura a realização de identificação, seja esta morfológica ou molecular. A identificação morfológica é feita através da dissecação e análise de diversidades de forma comparativa de genitálias de adultos (POGUE, 2004; BRAMBILA, 2009). Segundo Specht (2004) as espécies do gênero descritas no Sul do país até então eram *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) e *Helicoverpa gelatopoeon* (Dyar, 1921).

Portanto os objetivos do presente estudo foram realizar um levantamento para detectar a presença da *H. armigera* e caracterizar a dispersão da espécie no Estado com o uso de armadilhas Delta contendo feromônio sexuais sintéticos. E a partir disso, identificar e diferenciar a espécie por aspectos inicialmente morfológicos.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta de mariposas

A captura de mariposas do gênero *Helicoverpa* ocorreu por meio de 214 armadilhas distribuídas em 121 unidades de produção de potenciais plantas hospedeiras entre diferentes regiões do Estado, na safra 2013/2014 entre os meses de novembro de 2013 a março de 2014, com eventual coleta no mês de abril (Figura 3). Na safra 2014/2015 deu-se continuidade ao monitoramento que ocorreu entre os meses de setembro de 2014 a março de 2015 em 93 armadilhas distribuídas em 64 unidades de produção (Figura 4). Os Municípios nas mesorregiões em que foram instaladas armadilhas e se observou captura foram:

- Oeste: Chapecó, Descanso, Jupiá, Nova Itaberaba, Iporã do Oeste, Pinhalzinho, Campo Erê, D. Cerqueira, Belmonte, Galvão, Guaraciaba, Palma Sola, Galvão, Tigrinhos.
- Meio-Oeste: Campos Novos, Curitibanos, Lebon Régis, Zortea.
- Serrana: Lages, São Joaquim, Urubici, Bom Retiro.
- Sul: Jaguaruna, Içara, Nova Veneza e Braço do Norte, Turvo.
- Planalto-Norte: Papanduva e Itaiópolis

A leitura das armadilhas foi efetuada num intervalo de 07 a 15 dias, quando observada captura de espécies do gênero *Helicoverpa* era realizada a coleta do material para envio ao laboratório. O septo contendo feromônio sexual foi substituído a cada 08 semanas conforme recomendação do fabricante e o piso adesivo trocado no momento da leitura da armadilha, quando identificada captura ou falta de aderência.

A armadilha utilizada foi do tipo Delta de plástico corrugado de cor branca, triangular (15x10x28cm), com cabide de arame, telhado e piso adesivo com marcação quadriculada contendo cola entomológica.

No centro do piso adesivo foi inserido um liberador de feromônio, constituído de um septo de borracha impregnado com o composto sintético (ingrediente ativo (i.a) Z-11-Hexadecenal na concentração de 1,49 g/Kg), de marca comercial Bio Helicoverpa ou i.a acetato de (Z)-11-hexadecenila; acetato de (Z)-9-hexadecenila na concentração de 1,425 g/Kg, de marca comercial Iscalure Armigera. As armadilhas foram instaladas em locais de plantio, acima dos ápices caulinares das plantas, com até duas armadilhas por local amostrado, sendo numeradas e georreferenciadas por meio do sistema de coordenadas (DATUM) WGS84 no formato hdd,dddd°.

Os pisos adesivos contendo mariposas capturadas foram envoltos em plástico pvc e marcados com etiquetas, em que constavam informações do número da armadilha, local e data de coleta. Essas informações também eram registradas em formulário onde constava também a data de troca de feromônios e o responsável pela leitura. A coleta foi realizada por engenheiros agrônomos e técnicos agrícolas vinculados a Gerência de Defesa Sanitária Vegetal (GEDEV) da CIDASC. O material era encaminhado por malote a esta gerência que enviava as amostras ao Laboratório de Entomologia Agrícola (CCA/UFSC) onde foi realizada a triagem e identificação morfológica por meio da dissecação e análise comparativa das genitálias de machos para a diferenciação das espécies.

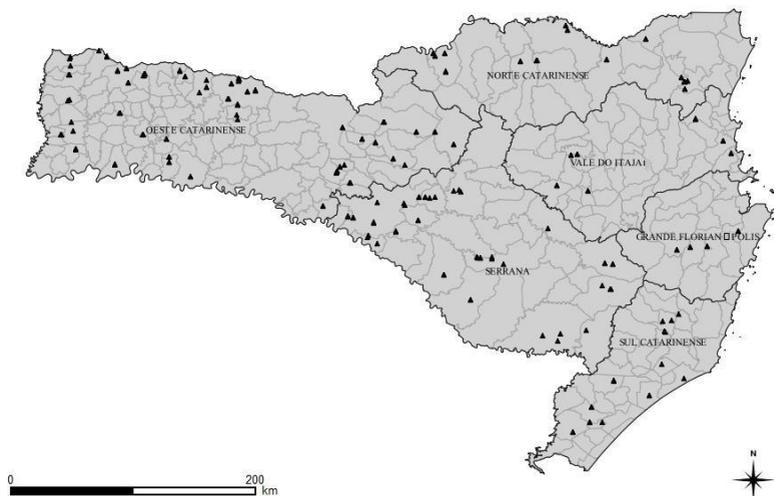


Figura 3: Mapa político de Santa Catarina com indicações das mesorregiões do Estado e posição georreferenciada das armadilhas tipo Delta, com feromônio sexual, instaladas na safra 2013-2014.

Elaboração: Fabiane dos Santos

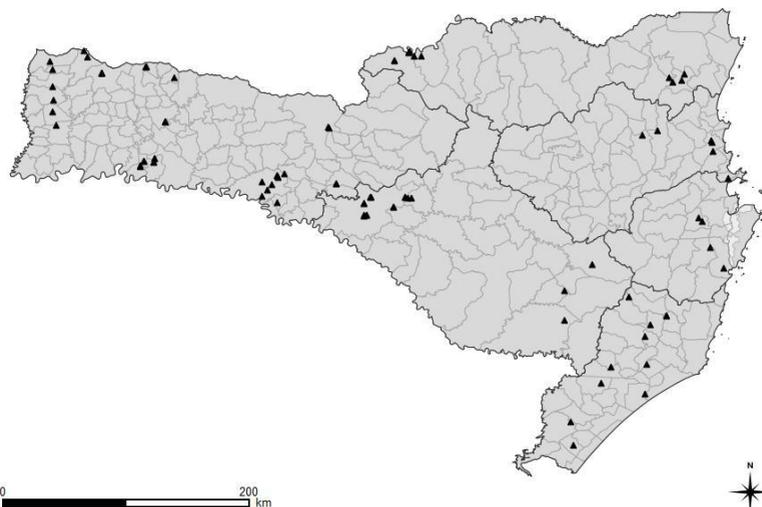


Figura 4: Mapa político de Santa Catarina com indicações das mesorregiões do Estado e posição das armadilhas tipo Delta, com feromônio sexual, instaladas na safra 2014-2015.

Elaboração: Fabiane dos Santos

3.2.2 Coleta de lagartas

Foram monitoradas dois talhões de duas propriedades de tomate em Caçador no Meio-Oeste catarinense, localizado a latitude 26,78° S e longitude 51,01°O. Foram feitas amostragens em 40 pontos, distantes 15 metros cada um, avaliando-se a planta posicionada no centro mais duas plantas adjacentes numa área equivalente a 0,5 hectare. O monitoramento foi realizado em três ocasiões, 28 de janeiro, 10 e 18 de fevereiro. Nos locais de avaliação de tomate também havia o cultivo de outras potenciais plantas hospedeiras, tais como soja e milho. Em soja foram realizadas inspeções em quatro ocasiões, 17 e 27 de janeiro; 11 e 19 de fevereiro em uma lavoura comercial do município de Campos Novos, localizada a 27,30° S de latitude e a 51,17°O de longitude. Foram amostrados 25 pontos, distantes 15 metros cada um. Para a avaliação foi usado um quadrado de madeira de dimensões 1mx1m, verificando-se as plantas inseridas dentro da marcação e coletando as lagartas por catação manual.

As lagartas coletadas foram levadas ao laboratório em potes plásticos 20 ml e criadas até a fase adulta em potes de 100 ml revestidos com papel filtro, contendo o fruto, vagem ou a folha em que foi coletada, como dieta natural. Logo após a emergência do adulto era realizada a identificação morfológica para a correta diferenciação entre as espécies.

3.2.3 Identificações morfológicas

Previamente foi realizada a seleção de mariposas capturadas que apresentavam características morfológicas inerentes ao gênero *Helicoverpa*, tais como: envergadura de 40mm, asas anteriores de coloração parda-amarelada com pequenas pontuações e faixa na borda das asas posteriores. Quando apresentavam tais características as mariposas eram circuladas com marcador permanente, atribuindo-se uma letra para cada exemplar presente no piso adesivo.

Após a triagem do material, o abdômen de cada mariposa era disposto isoladamente em tubos de ensaio contendo solução de KOH 10% suficiente para que a estrutura permanecesse imersa, de um dia para outro (± 14 horas).

Posteriormente ao período de incubação o abdômen foi dissecado com o auxílio de pinças tipo relojoeiro para a retirada da genitália do macho e análise morfológica comparativa das seguintes estruturas: oitavo urosternito, edeago e número de lobos na base da vesica, em microscópio estereoscópio binocular. Para a observação do lobo na base

da vesica, o mesmo foi insuflado com auxílio de uma seringa de insulina (8mm X 0,3mm), contendo álcool 70%.

As estruturas foram montadas em lâminas de microscopia em bálsamo sintético do Canadá e etiquetadas com o registro do nome da espécie, data e o nome do responsável pela identificação, além do código atribuído à amostrada, que consiste do número da armadilha, letra e data de coleta, formando um conjunto alfanumérico de até 10 dígitos.

3.2.4 Análises de dados

Os dados de localização de armadilhas foram enviados por engenheiros agrônomos e técnicos agrícolas da CIDASC, por meio de um formulário eletrônico, elaborado em um aplicativo do Google Drive.

As respectivas latitudes, longitudes e capturas foram registradas em planilha eletrônica (Software Excel) e armazenados no formato CSV (Comma Separated Values). Para a elaboração de mapas foi utilizado o software QGIS 2.6, inserindo-se camadas vetoriais do mapa político do Estado de Santa Catarina. Com o uso dessa ferramenta foram elaborados também mapas de densidade de Kernel, pela adição de camada raster (mapa de calor).

A média diária de capturas foi obtida pela soma do número de capturas, dividindo-se pelo número de dias desde a coleta anterior.

3.3 RESULTADOS

Foram verificadas todas as estruturas das genitálias que são descritas na literatura para a diferenciação de espécies do gênero *Helicoverpa* (POGUE, 2004; BRAMBILA, 2009; SPECHT, 2013). Inicialmente observou-se o tamanho da valva e ângulo de abertura (Figuras 5 C e 6 B). O oitavo urosternito (Figuras 5 A e 6 A) em algumas amostras apresentava o formato característico de diferenciação, sendo o ápice distal arredondado e a margem ventral em formato da letra U na *H. zea* e mais pontiagudo e em formato de V respectivamente na *H. armigera*. Entretanto ambas as estruturas geram dúvidas sobre o formato não sendo adequadas como únicas estruturas a serem avaliadas para a diferenciação.

O número de cornutis no aedoeagus (Figura 5 B) apresentou média de $11,72 \pm 1,25$ na *H. armigera* e $14,4 \pm 1,81$ na *H. zea*, sendo uma característica que pode ser utilizada para a diferenciação interespecífica, corroborando com o número de lobo na base da vesica observado

quando insuflado, sendo um na *H. armigera* e três na *H. zea* (Figuras 7 e 8).



Figura 5: Foto obtida em estereomicroscópio trinocular de estruturas da genitália de macho de *Helicoverpa armigera*. A: oitavo urosternito (forma V achatado); B: edeago com a presença de cornutis ; C, genitália macho (valva). Foto: Fabiane dos Santos (2014).



Figura 6: Foto obtida em estereomicroscópio trinocular de estruturas da genitália de macho de *Helicoverpa zea*. A: oitavo urosternito (forma U na base); B: genitália macho (valva). Foto: Fabiane dos Santos (2013).



Figura 7: Lobo simples (indicado pela seta) na base da vesica característico de *Helicoverpa armigera*.

Foto: Fabiane dos Santos (2014).

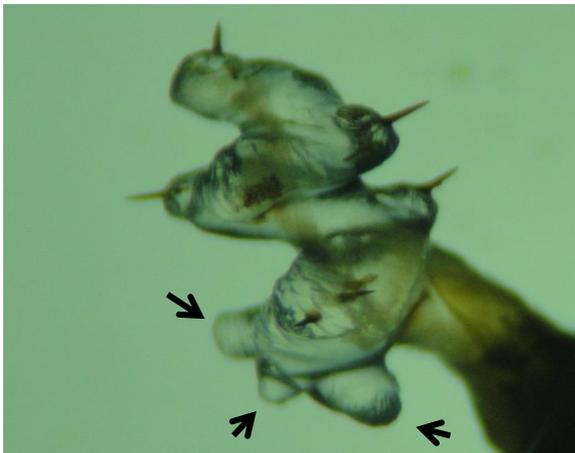


Figura 8: Lobo triplo (indicado pelas setas) na base da vesica característico de *Helicoverpa zea*.

Foto: Fabiane dos Santos (2014).

Na safra 2013-2014 foram submetidos à identificação morfológica 725 exemplares, machos adultos capturados em todo o Estado, sendo que 82,2% pertenciam à espécie *H. armigera*, 11,6% *H. zea*, 0,4% *Heliiothis stromberi* (forma anômala de *H.zea*), não ocorrendo à espécie *H. gelotopoeon*. Em 5,8% foi apenas identificado o gênero por falta de condições adequadas para distinguir a estrutura (Figura 9). No ciclo 2014-2015 foram submetidos 676 machos à identificação morfológica, havendo 91% *H. armigera*, 3% *H. zea* e 6% *H. spp*, quando foi possível apenas identificar o gênero, devido à qualidade do material analisado, entretanto não foram examinadas formas anômalas e nem mesmo a *H. gelotopoeon* (Figura 10). Houve a captura de diferentes espécies na mesma armadilha, independente dos cultivos presentes no local em que estavam instaladas.

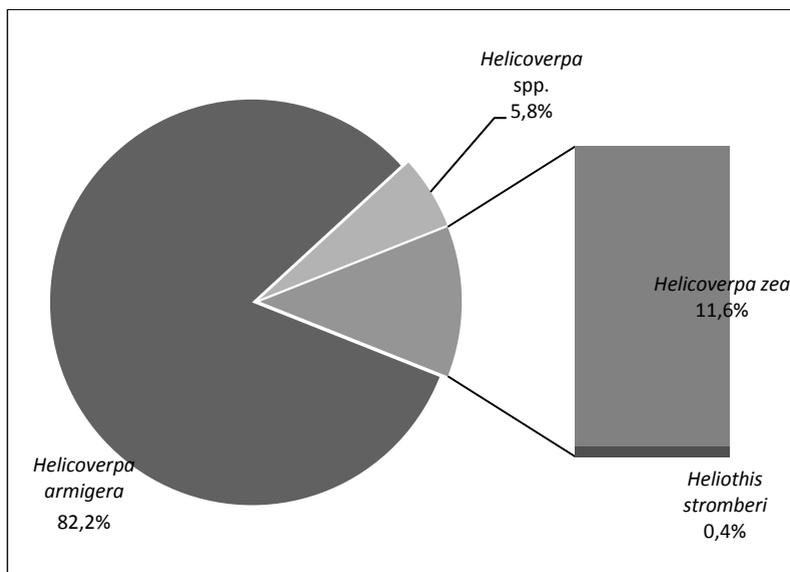


Figura 9: Percentuais referentes as 725 machos adultos de espécies do gênero *Helicoverpa* e forma anômala de *Helicoverpa zea* (*Heliiothis stromberi*) capturados em armadilhas tipo Delta com feromônio sexual sintético em Santa Catarina na safra 2013-2014.

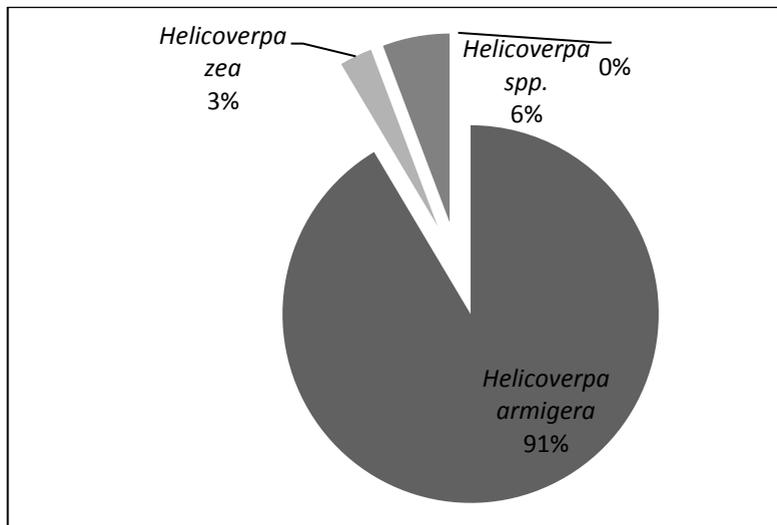


Figura 10: Percentuais referentes aos 676 machos adultos de espécies do gênero *Helicoverpa* capturadas em armadilhas tipo Delta com feromônios sexual sintético em Santa Catarina na safra 2014-2015.

A presença da espécie foi confirmada em 44 municípios de 74 amostrados na safra (2013 – 2014), comprovando a ocorrência em todas as mesorregiões do Estado. Na safra (2014 – 2015) foram amostrados 42 municípios e adicionalmente as confirmações do primeiro (2013 – 2014) ocorreram, também capturas nos municípios de Abdon Batista, Brunópolis, Concórdia, Guaramirim, Monte Carlo. No total foram 91 municípios monitorados, sendo confirmada a presença da espécie *H. armigera* em 55 (60%). Considerando as regiões do Estado, dentre os 28 municípios monitorados na região Oeste, em 22 (79%) foi confirmada a presença da praga, no Meio-Oeste de 18 foram 14 (74%); Serrana de 9 foram 7 (78%); Planalto Norte de 7 foram 4 (57%); Sul de 11 foram 4 (36%); Vale do Itajaí de 10 foram 2 (20%) Grande Florianópolis de 6 apenas 1 (17%); Norte foi monitorado apenas um município (Guaramirim), não havendo capturas no primeiro período de avaliação, sendo capturados duas espécimes na safra 2014 - 2015 (Figura 11).

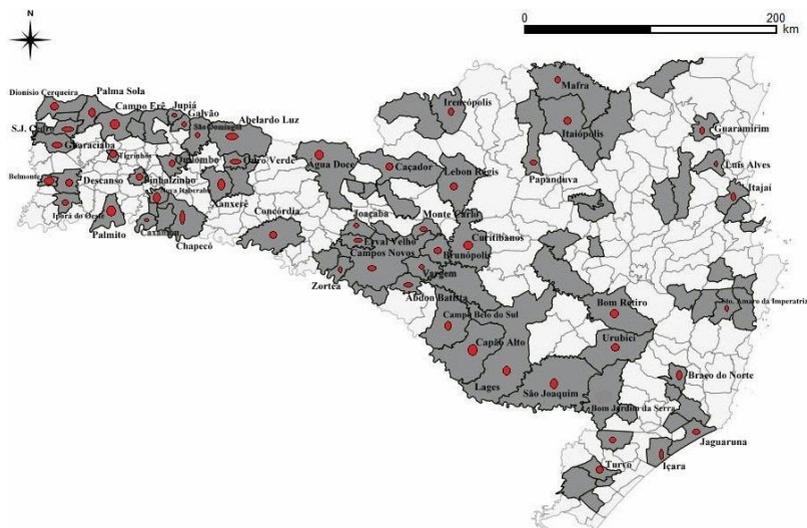


Figura 11: Mapa político do Estado de Santa Catarina e a ocorrência de *Helicoverpa armigera*. As áreas marcadas com cinza-escuro indicam os municípios com unidades de produção monitoradas por meio de armadilhas tipo Delta com feromônios sexual sintético. Os pontos em vermelho correspondem àqueles com a presença da espécie *Helicoverpa armigera* confirmada por meio de identificação morfológica da genitália de machos adultos. Safras 2013 – 2014 e 2014 – 2015.

Elaboração: Fabiane dos Santos

Considerando os dados do primeiro período de monitoramento (safra 2013 – 2014), a média diária de capturas de machos adultos de *Helicoverpa armigera* por armadilha, acumulada por região foi de: 4,5 no Oeste; 3,5 no Meio-Oeste e 0,56 no Planalto Norte. No Estado a média foi de $0,2 \pm 0,3$ capturas diárias por armadilha. Ocorreu um maior número de machos adultos de *Helicoverpa armigera*, capturados por dia entre todas as regiões avaliadas, no mês de fevereiro, onde a soma de capturas diárias foi de $8,5 \pm 1,2$ na região Meio-Oeste, $2,8 \pm 0,2$ no Oeste e $1,8 \pm 0,29$ no Planalto Norte (Figura 12). Na região Serrana foram observada capturas apenas entre os meses de março e abril não sendo possível estimar uma média diária de capturas.

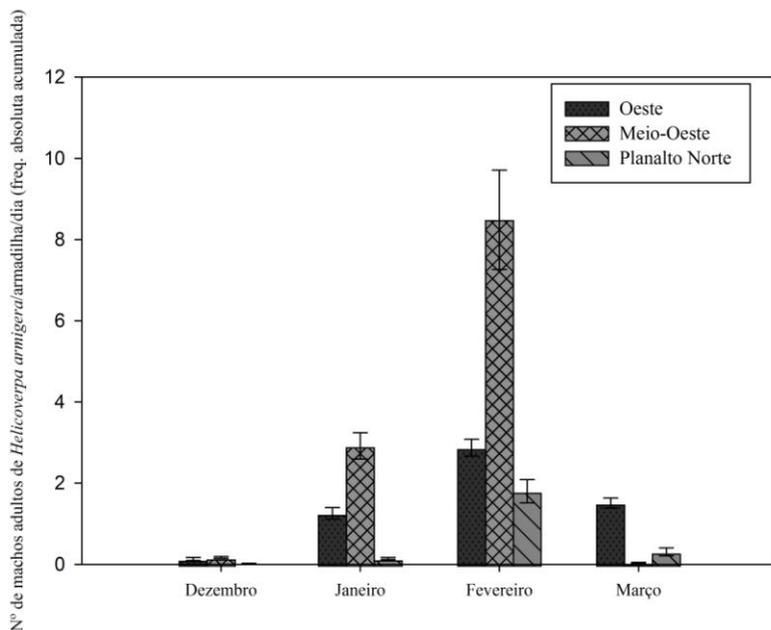


Figura 12: Frequência absoluta acumulada de machos adultos de *Helicoverpa armigera* (\pm desvio padrão) capturados em armadilhas contendo feromônios sexual sintético, nas regiões do Oeste, Meio-Oeste e Planalto de Santa Catarina em diferentes meses de monitoramento da safra 2013 – 2014.

O número de capturas por município foi entre 01 captura (0,07%) a 334 (23,8%). Os municípios com maiores índices de captura foram Campos Novos e Campo Erê, com médias de 42 e 99 mariposas por armadilha respectivamente. Os municípios das regiões Norte, Alto Vale do Itajaí, Sul e da Grande Florianópolis apresentaram capturas esporádicas, máximo de duas por armadilha, durante os períodos avaliados pertencentes, conforme valores apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Frequência absoluta e relativa de machos adultos do gênero *Helicoverpa* capturados por município no Estado de Santa Catarina, em armadilhas contendo feromônios sexual sintético, nas safras 2013 – 2014 e 2014 – 2015.

Município	<i>N amostral</i> (n°armadilhas)		<i>H. armigera</i>		<i>H. zea</i>	
	Total	Com Capturas	<i>f</i> absoluta	<i>f</i> relativa (%)	<i>f</i> absoluta	<i>f</i> relativa (%)
Abdon Batista	2	2	30	2.14	-	-
Abelardo Luz	8	2	21	1.50	-	-
Água Doce	2	2	26	1.86	4	4,55
Belmonte	2	1	14	1.00	-	-
Bom Retiro	4	2	29	2.07	-	-
Braço do Norte	5	1	3	0.21	-	-
Brunópolis	2	2	6	0.43	-	-
Caçador	4	1	2	0.14	1	1,14
Campo B. Sul	2	2	18	1.28	11	12,50
Campo Erê	6	2	199	14.20	-	-
Campos Novos	12	8	334	23.84	34	38,64
Capinzal	2	2	17	1.21	-	-
Capão Alto	2	1	8	0.57	4	4,55
Caxambu	1	1	2	0.14	-	-
Chapecó	4	4	68	4.85	9	10,23
Concórdia	8	3	9	0.64	-	-
Curitibanos	4	1	4	0.29	-	-
Descanso	2	2	27	1.93	-	-
Dionísio Cerqueira	2	1	49	3.50	-	-
Galvão	2	2	11	0.79	-	-
Guaraciaba	2	2	18	1.28	-	-
Guaramirim	8	1	1	0.07	-	-
Guarujá do Sul	2	1	3	0.21	-	-
Herval do Oeste	1	1	1	0.07	-	-
Ibiam	1	1	1	0.07	-	-
Içara	2	1	4	0.29	-	-
Iporã do Oeste	3	2	26	1.86	1	1,14
Itaiópolis	2	1	1	0.07	-	-
Itajaí	2	1	1	0.07	-	-
Jaguaruna	1	1	1	0.07	-	-
Joaçaba	1	1	22	1.57	-	-
Jupiá	2	2	13	0.93	-	-
Lages	4	1	7	0.50	2	2,27
Lebon Régis	4	2	2	0.14	3	3,41
Luis Alves	2	1	1	0.07	-	-
Mafra	10	6	20	1.43	-	-
Monte Carlo	2	1	16	1.14	-	-
Nova Itaberaba	2	2	19	1.36	1	1,14
Nova Veneza	2	1	2	0.14	2	2,27

Ouro Verde	2	2	29	2.07	-	-
Palma Sola	2	2	61	4.35	-	-
Papanduva	2	2	31	2.21	7	7,95
Pinhalzinho	2	2	4	0.29	1	1,14
Quilombo	2	2	21	1.50	1	1,14
Santo A. Imperatriz	-*	-	1	0.07		0,00
São Domingos	4	2	31	2.21		0,00
São Joaquim	3	2	40	2.86	3	3,41
São José do Cedro	2	1	43	3.07		0,00
São Lourenço do Oeste	2	1	17	1.21		0,00
São Miguel do Oeste	2	2	28	2.00		0,00
Tigrinhos	2	2	24	1.71	2	2,27
Turvo	2	1	1	0.07	1	1,14
Urubici	4	1	2	0.14		0,00
Vargem	2	1	3	0.21		0,00
Xanxerê	4	2	21	1.50		0,00
Zortea	2	2	8	0.57	1	1,14
Total Geral	168	98	1401	100	88	100

*Corresponde a coleta em estágio larval

Observa-se a ocorrência da espécie *H. armigera* em todas as mesorregiões de Santa Catarina, sempre representando uma elevada quantidade em relação a *H. zea*. Quando analisadas as regiões com maior área plantada de grãos principalmente soja, verificamos que há maior número de espécimes de *H. armigera* capturadas por armadilhas. Na figura 13 observamos a área de plantio de soja por município, sendo Campos Novos no Meio-Oeste isoladamente o que possui maior área plantada em hectares (49 mil). A região Oeste, entretanto é aquela que apresenta um agrupamento de diversos municípios produtores de soja que somam mais de 70 mil hectares compreendendo a maior região produtora, corroborando com aquela em que houve maior número de armadilhas com capturas (Figura 13). As proporções encontradas no primeiro ano de monitoramento foram semelhantes com as do segundo ano.

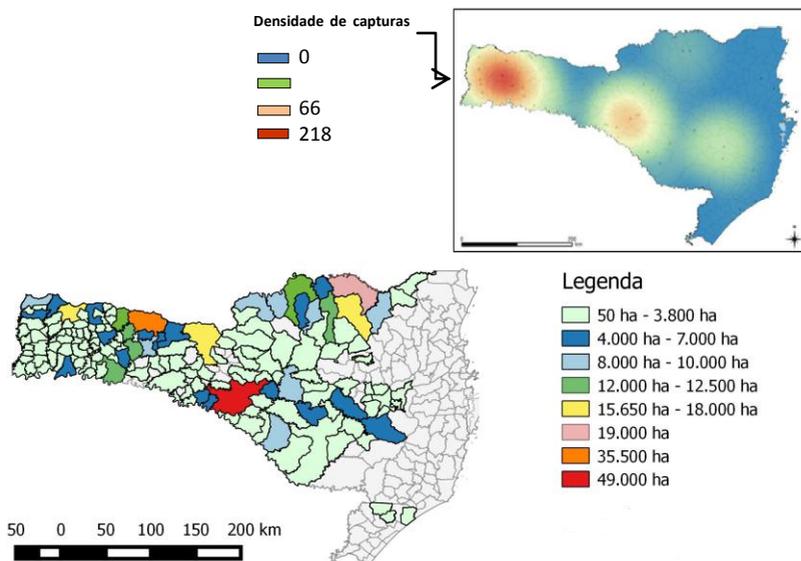


Figura 13: À esquerda indicação da área plantada de soja, nos diferentes municípios do Estado de Santa Catarina (IBGE, 2014). À direita mapa de densidade de Kernel das variáveis armadilhas com capturas de *Helicoverpa armigera*. As regiões com maior área plantada de soja em hectares também são aquelas com maior densidade de armadilhas com capturas de *Helicoverpa armigera*.

Elaboração: Fabiane dos Santos

As armadilhas em que foi constatada a captura de *H. armigera* estavam instaladas em unidades de produção de soja (*Glycine max*); feijão (*Phaseolus vulgaris*); tabaco (*Nicotiana tabacum*); milho (*Zea mays*) e tomate (*Solanum esculentum*); no segundo ano, com o monitoramento iniciando no mês de setembro, ocorreu também em trigo (*Triticum aestivum*).

Além de coletas de machos adultos de *H. armigera* por meio de armadilhas fez-se também a coleta de espécimes na fase larval em unidades de produção de soja e tomate em lavouras localizadas em Caçador e Campos Novos, entre os meses de janeiro e fevereiro. Nas áreas de avaliações de tomate foram coletadas 24 lagartas do gênero *Helicoverpa*, com densidade populacional de até três lagartas ocorrendo

no mesmo ponto amostral. Os horários de avaliação foram entre 10h00 e 14h00.

Em tomate os danos foram caracterizados pela formação de galerias, por lagartas com mais de 2 cm e de diferentes colorações (Figura 14). Foi identificada na totalidade a espécie *H. armigera* dentre os exemplares coletados que evoluíram até a fase adulta, caracterizando a espécie vegetal como planta hospedeira.

Em soja foram coletadas 50 lagartas do gênero *Helicoverpa* na soma das três avaliações realizadas, média de 0,5 por ponto amostral, com densidade de até quatro lagartas em apenas um ponto de avaliação (Figura 12). Nessas áreas havia espécies de lagartas de outros gêneros, principalmente *Chrysodeixis*, porém não foram computadas no presente trabalho.

Além das três avaliações supracitadas foi efetuado acompanhamento de armadilhas instaladas nas respectivas áreas, porém as mesmas não apresentaram capturas nos locais de avaliação de tomate. Apesar da especificidade do feromônios sexual sintético, muitos pisos adesivos apresentavam outras espécies de inseto além da ordem Lepidoptera, como as ordens, Coleoptera, Diptera, Hemiptera e Hymenoptera, esta última a mais abundante nas áreas de produção de tomate, sendo observada com frequência a ocorrência de abelhas nativas nas armadilhas.



Figura 14: Danos ocasionados por larvas da *Helicoverpa armigera* em frutos de tomateiro, coletados em unidades de produção com destino comercial localizadas em Caçador - SC.

Foto: Fabiane dos Santos

3.4 DISCUSSÃO

Os resultados indicam que *Helicoverpa armigera* está distribuída por todas as regiões do Estado de Santa Catarina. Apesar de a primeira ocorrência ter sido documentada no Novo Mundo, exatamente no Brasil, apenas em 2013, há evidências que a introdução tenha sido feita muito anteriormente e em múltiplas ocasiões (LEITE et al., 2014). Tal fato corrobora com as explosões populacionais registradas, nas diversas regiões agrícolas do país, e com os relatos de perdas e o elevado índice de capturas nas armadilhas monitoradas no Estado.

Segundo Lockwood et al. (2007) quando há introdução de uma espécie exótica existe um período, desde o ingresso até a elevação dos índices populacionais, que pode ser curto ou bastante extenso, denominado de tempo de reação ou período de latência. A distribuição geográfica em todas as regiões de Santa Catarina é devido à alta capacidade de adaptação e migração, favorecida pela habilidade de voar a longas distâncias. A expansão demográfica da *H. armigera* quando em um determinado território é iminente (KRITICOS et al., 2015).

Até o momento não foram esclarecidas as formas de introdução e rotas de dispersão, mas a partir de estudos sobre o comportamento da espécie, pode-se inferir sobre os componentes que levaram a rápida distribuição no Estado. Para que haja um maior entendimento de como ocorreu essa disseminação em Santa Catarina é necessário primeiramente explicar os aspectos de voo, quanto à orientação, seleção de altitude e os demais fatores abióticos, que interferem no processo de migração e dispersão da praga. O deslocamento inter-regional de adultos ocorre com maior intensidade duas horas após o pôr do sol, a favor do vento em baixa elevação (20 metros), até encontrar um cultivo aceitável ou outro habitat. Porém, quando ocorre migração, os voos são em elevadas altitudes com as mariposas se orientando a favor do vento, resultando em uma alta velocidade de deslocamento e viagens prolongadas, acumulando-se em zonas de ar quente. A atração por manchas de plantas é possível pela mistura de culturas e a vegetação que interfere na trajetória do voo (FITT; DILLON; HAMILTON, 1995; DILLON et al., 1996; BARTEKOVA; PRASLICKA, 2003; FENG et al., 2009).

Os voos migratórios são vantajosos para o inseto quando a mudanças sazonais de temperatura e precipitação (CHAPMAN et al., 2010). A maneira como é a ancoragem das mariposas migrantes em uma determina paisagem agrícola ainda precisa ser elucidada, mas barreiras físicas, tais como reflorestamentos, auxiliam na diminuição da

velocidade do vento que pode favorecer a queda desses migrantes (VAUTARD et al., 2010; BARTON, 2014). Na Nova Zelândia foram reportadas lagartas sobre *Pinus radiata* de até 12 metros, e entre 1969 e 1970 foram observados danos em mudas, quando lagartas consumiram mais de 50% da área foliar em 60% dessas (EPPO/CABI, 1996). As espécies florestais supracitadas poderiam estar influenciando a presença de adultos de *H. armigera* em uma determinada região, ressalta-se o fato que em Santa Catarina há cerca de 600 mil hectares de *Pinus* spp., com áreas representativas no entorno dos principais cultivos que são hospedeiros a larvas.

A distribuição da *H. armigera* esteve associada a diversas plantas hospedeiras cultivadas, tais como soja, feijão, trigo, tomate, além de milho onde a *H. zea* seria predominante por ser praga-chave dessa espécie de planta (LEITE et al., 2014). A presença da *H. armigera* no entanto, ocorreu particularmente mais adjacente a soja e feijão e em menor proporção ao milho. Segundo Leite et al., (2014) a *H. armigera* não foi encontrada associada a cultura do milho nas regiões, Centro-Oeste, Sudeste e Sul do país, de fato não coletou-se lagartas para determina-lá como planta hospedeira, porém houve capturas em armadilhas nos locais que apresentavam apenas o cultivo de milho. Pela proporção entre as espécies do gênero *Helicoverpa* nas amostras analisadas, houve uma tendência de se encontrar na grande maioria, a espécie *H. armigera* em soja e feijão. Porém, pode-se cair novamente em um cenário de má interpretação como foi o caso de se achar que era a *H. zea* responsável pelas infestações em algodão e soja, é indispensável que se colete amostras e se faça a caracterização da espécie.

Nas mesmas armadilhas muitas vezes eram encontradas as duas espécies *H. armigera* e *H. zea*, sendo predominante a primeira. Esse fato ocorreu independentemente das culturas próximas das armadilhas, havendo capturas simultâneas em áreas com plantio de trigo, soja e milho. Entretanto algumas capturas foram associadas a determinada plantas mas, não houve danos ocasionadas pela *H. armigera*, como o tabaco. Em contrapartida mesmo com a presença da *H. armigera* nesses locais, observou-se surtos de lagartas das espécies *Crysoideixis includens* e *Spodoptera* spp na região Sul e Oeste do Estado, ocorrendo em feijão e pastagens no ciclo 2013-2014, conforme relato de produtores e observações realizadas durante o monitoramento da *H. armigera*. Tal fato pode ser explicado pelo mau manejo das culturas com um excesso de aplicação de agrotóxicos.

Mesmo sem capturas de adultos em armadilhas instaladas próximas a cultura do tomate, foi observada uma alta infestação de lagartas do gênero *Helicoverpa*, sendo os exemplares identificados da espécie *H. armigera*. A semelhança morfológica com outras espécies de Heliiothinae, principalmente com *Heliothis virescens* e *H. zea*, pode ter adiado o correto diagnóstico da presença da praga em diversas culturas. As características morfológicas no estágio larval, que assegurem uma correta identificação, não são claras para a *H. armigera*, a comparação de estruturas da genitália, e métodos moleculares, são os mais indicados, porém necessitam de equipamento e experiência por parte do identificador. Métodos os quais os produtores não dispõem para a correta identificação.

Diante de uma gama de plantas hospedeiras para a *H. armigera* há diversos fatores relacionados à preferência por determinado cultivo que pode explicar a não observância de lagartas em culturas adjacentes, mesmo ao final da colheita de tomate nas áreas monitoradas e a grande associação entre número de capturas nos locais de plantio de soja. A abundância de uma determinada planta hospedeira pode ser uma resposta à preferência a uma cultura. Segundo Kuussaari et al. (2000) e Jallow et al. (2004) preferência relacionada à abundância da planta hospedeira pode ser uma adaptação da população do inseto, pela interação genética e ambiente, que pode ter levado a predileção a determinado hospedeiro.

Essa adaptação pode ser uma estratégia reprodutiva, pois há uma maior disponibilidade de alimento e consequentemente maior capacidade de sobrevivência. Efetuada a oviposição a larva por sua vez dá preferência à espécie de planta em que foi iniciado o seu ciclo de vida. Além disso, a escolha da planta também pode estar associada com a presença de predadores e parasitoides (CUNNINGHAM; ZALUCKI; WEST, 1999; CUNNINGHAM; ZALUCKI, 2014; LIU; SCHEIRS; HECKEL, 2010).

Outro fator a ser considerado é relacionado à maneira de como a espécie localiza e discrimina uma planta hospedeira. Há hipótese de que a escolha seja feita por características visuais e olfativas, havendo uma preferência pela fase de floração, já que os adultos se alimentam de néctar, procurando uma melhor nutrição, favorecendo o desempenho da prole (JALLOW; PAUL CUNNINGHAM; ZALUCKI, 2004; LIU; SCHEIRS; HECKEL, 2010).

A época de floração de tomateiros nas áreas avaliadas foi anterior a de outras culturas, enquanto os frutos já estão sendo colhidos nessa cultura, a soja, por exemplo, está em período vegetativo. Entretanto

muitas plantas hospedeiras suportam apenas uma geração, sendo necessário outros estudos sobre o número de gerações possíveis na região de Caçador (SC) (FITT, 1989; JALLOW; PAUL CUNNINGHAM; ZALUCKI, 2004).

Há vários elementos que podem interferir na discriminação de uma planta hospedeira, sejam olfativos, visuais, gustativos e aspectos fenológicos, esses estímulos, todavia podem ser alterados pelas experiências prévias com determinada cultura, podendo existir uma maior oviposição naquelas menos atraentes, mas que tem um maior potencial de acolhimento, ou seja, a mais abundante vai proporcionalmente receber mais ovos. Considerando que a *H. armigera* é atraída por estruturas reprodutivas e frutos, e que tomate era a planta hospedeira mais abundante nesse estágio fenológico é provável que isso tenha ocorrido nas áreas monitoradas de Caçador (SC) (JALLOW; PAUL CUNNINGHAM; ZALUCKI, 2004).

As armadilhas contendo feromônio sexual são um meio eficaz para o levantamento de detecção, porém quando a presença de adultos é baseada apenas por esse método é importante interpretar os fatores que podem interferir na variabilidade de capturas e como inferir sobre os valores obtidos. Mesmo com um grande número de capturas em diferentes armadilhas, apenas 26% do total instalado tiveram o inseto-praga coletado. As capturas podem representar tanto os indivíduos que se desenvolveram nas plantas hospedeiras locais, quanto àqueles distantes, havendo diferença na estimativa de adultos e de larvas presentes nos cultivos próximos, podendo expressar a dispersão local bem como o número de machos migrantes (SALVATO et al., 2005; ALLEN; LUTTRELL, 2011). A densidade de estádios imaturos pode, entretanto ser prevista pelo número de captura de machos adultos algumas semanas antes (MILUCH; DOSDALL; EVENDEN, 2013). Isso poderia elucidar a ausência de capturas de machos adultos nas áreas de avaliação de tomate, uma vez que foram instaladas quando já havia a presença de lagartas em tomateiros.

Segundo Baker; Tann e Fitt (2011) as capturas nessas armadilhas são influenciadas pela abundância e receptividade de fêmeas, podendo existir uma concorrência entre fêmeas, e o feromônio sintético. Níveis intermediários de machos foram mais indicativos de elevada densidade larval e pupal em *Plutella xylostella* (L), por ser um referência de fêmeas liberando feromônios, que é mais atrativo para machos do que o sintético (MILUCH; DOSDALL; EVENDEN, 2013). Neste estudo não avaliamos conjuntamente a leitura de armadilhas contendo feromônio sexual sintético e inspeções em plantas quanto à presença de ovos e

larvas, entretanto para a adoção de manejo adequado é fundamental que o produtor adote as duas formas de monitoramento. O manejo não adequado da *H. armigera* pode acarretar problemas futuros com uma ineficiência no controle, pois já há várias notificações de resistência à inseticidas em diversos países, tais como: Nova Zelândia, Tailândia, Índia, China, Indonésia, Paquistão, África do Sul, Austrália, principalmente aos organofosforados, piretróides, carbamatos e endosulfan (L.M. TORRES-VILA, M.C. RODRIGUEZ-MOLINA, 2003; TORRES-VILA et al., 2002; AVILLA; GONZÁLEZ-ZAMORA, 2010). Tais medidas errôneas observaram-se na safra 2013-2014, nas áreas de plantio de tomate em que realizamos monitoramento, houve a aplicação constante de agrotóxicos, realizada a cada três dias segundo informações repassadas pelos produtores. Os inseticidas utilizados pertenciam aos seguintes grupos químicos: Antranilamida, organofosforado, piretroide, metilcarbamato de oxima, benzoilureia e neonicotinoide, muitas vezes com a prática de mistura no “tanque” de diferentes produtos formulados.

Mesmo que o controle adotado seja satisfatório por um determinado período, muitas vezes há ressurgimento da espécie causando danos, que estão associados à resistência de inseticidas, somados a outros fatores ecológicos e biológicos que podem gerar novos surtos da praga (MIRONIDIS et al., 2013). Outras avaliações devem ser feitas para que sejam observados os limiares de danos, e as consequências que o manejo atual pode acarretar futuramente na produção de tomate de Santa Catarina.

O presente estudo mostra um panorama atual da *H. armigera* no Estado de Santa Catarina, em diferentes culturas e pode subsidiar estratégias de manejo, bem como da defesa sanitária vegetal nas ações de monitoramento e para determinar a situação da praga no território catarinense.

3.5 CONCLUSÕES

✓Em 1401 machos adultos do gênero *Helicoverpa* foram identificados 87% como sendo da espécie *H. armigera* e 7% da *H. zea*;

✓Do total de municípios monitorados (91) nas safras 2013 – 2014 e 2014 – 2015 em 58% foi confirmada a presença da *H. armigera*;

- ✓ A média diária de mariposas por armadilha da espécie *H. armigera* foi maior na mesorregião do Oeste catarinense;
- ✓ A quantidade de machos adultos de *H. armigera* capturados em armadilhas tipo Delta com feromônio sexual eram aqueles com maior área plantada de soja (*Glycine max*);
- ✓ Por meio de coletas de larvas do gênero *Helicoverpa* e posterior identificação morfológica foi possível caracterizar tomate (*Solanum lycopersicum*) e soja (*Glycine max*) como plantas hospedeiras de *H. armigera*;
- ✓ É iminente a dispersão e a elevação da densidade populacional da praga no Estado de Santa Catarina devendo-se monitorar as unidades de produção de plantas hospedeiras em todas as safras;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, K. C.; LUTTRELL, R. G. Temporal and spatial distribution of *Helicoverpa zea* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) moths in pheromone traps across agricultural landscapes in Arkansas. **Journal of Entomological Science**, v. 46, n. 4, p. 269-283, 2011.

APHIS. **Detection of World Bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Puerto Rico**, 2014. Disponível em: http://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/owb/downloads/DA-2014-45.pdf> Acesso: 21 mar. 2015.

AVILLA, C.; GONZÁLEZ-ZAMORA, J. E. Monitoring resistance of *Helicoverpa armigera* to different insecticides used in cotton in Spain. **Crop Protection**, v. 29, p. 100–103, 2010.

BAKER, G. H.; TANN, C. R.; FITT, G. P. A tale of two trapping methods: *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera, Noctuidae) in pheromone and light traps in Australian cotton production systems. **Bulletin of entomological research**, v. 101, n. 1, p. 9–23, 2011.

BARTON, B. T. Reduced wind strengthens top-down control of an insect herbivore. **Ecology**, v. 95, n. 9, p. 140527093843003, 2014.

CHAPMAN, J. W. et al. Flight Orientation Behaviors Promote Optimal Migration Trajectories in High-Flying Insects. **Science**, v. 327, p. 682–685, 2010.

CUNNINGHAM, J. P.; ZALUCKI, M. P. Understanding Heliothine (Lepidoptera: Heliiothinae) Pests: What is a Host Plant? **Entomological Society of America**, v. 107, n. 3, p. 881–896, 2014.

CUNNINGHAM, J. P.; ZALUCKI, M. P.; WEST, S. A. Learning in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): a new look at the behaviour and control of a polyphagous pest. **Bulletin of Entomological Research**, v. 89, n. 03, p. 201–207, 9 mar. 1999.

DILLON, M. L. et al. A simulation model of wind-driven dispersal of *Helicoverpa* moths. **Ecological Modelling**, v. 86, p. 145–150, 1996.

EPPO/CABI. Data sheets on quarantine pests: *Helicoverpa armigera*. **Journal of Applied Entomology**, v. 12, n. 110, p. 1–6, 1996.

FENG, H. et al. Over the Bohai Sea Seasonal Migration of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera□: Noctuidae). v. 102, n. 1, p. 95–104, 2009.

FITT, G. P. THE ECOLOGY OF HELIOTHIS. **Ann. Rev. Entomol.** 1989, v. 34, n. 66, p. 17–52, 1989.

FITT, G. P.; DILLON, M. L.; HAMILTON, J. G. Spatial dynamics of *Helicoverpa* populations in Australia□: simulation modelling and e□: empirical studies of adult movement. **Computers and electronics in agriculture**, v. 13, p. 177–192, 1995.

GREGG, P. C. Pollen as a Marker for Migration of *Helicoverpa armigera* and *H. punctigera* (Lepidoptera, Noctuidae) from Western Queensland. **Aust J Ecol**, v. 18, p. 209–219, 1993.

JALLOW, M. F. .; PAUL CUNNINGHAM, J.; ZALUCKI, M. P. Intra-specific variation for host plant use in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): implications for management. **Crop Protection**, v. 23, n. 10, p. 955–964, out. 2004.

KRITICOS, D. J. et al. The Potential Distribution of Invading *Helicoverpa armigera* in North America: Is It Just a Matter of Time? **Plos One**, v. 10, n. 3, p. 119-618, 2015.

KURBAN, A et al. Pupal diapause of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): sensitive stage for thermal induction in the Okayama (western Japan) population. **Bulletin of entomological research**, v. 97, n. 3, p. 219–223, 2007.

KUUSAAARI, M.; SINGER, M.; HANSKI, I. Local specialization and landscape-level influence on host use in an herbivorous insect. **Ecology**, v. 81, n. 8, p. 2177–2187, 2000.

L.M. TORRES-VILA., M.C. RODRIGUEZ-MOLINA, A. L.-P. Impact of *Helicoverpa armigera* larval density and crop phenology on yield and quality losses in processing tomato: developing fruit count-based damage thresholds for IPM decision-making. v. 22, p. 521–532, 2003.

LAMMERS, J. W.; MACLEOD, A. Report of a Pest Risk Analysis. **Plant Protection Service (NL) and Central Science Laboratory (UK)**, n. August, p. 1–18, 2007.

LEITE, N. A. et al. Demographics and Genetic Variability of the New World Bollworm (*Helicoverpa zea*) and the Old World Bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e113286, 2014.

LIU, Z.; SCHEIRS, J.; HECKEL, D. G. Host plant flowering increases both adult oviposition preference and larval performance of a generalist herbivore. **Environmental entomology**, v. 39, n. 2, p. 552–560, 2010.

LOCKWOOD, J. L.; HOOPEES, M. F.; MARCHETTI, M. P. **Invasion Ecology**. 1th ed. Oxford, UK: Blackwell, 2007. 313p.

MILUCH, C. E.; DOSDALL, L. M.; EVENDEN, M. L. The potential for pheromone-based monitoring to predict larval populations of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.), in canola (*Brassica napus* L.). **Crop Protection**, v. 45, p. 89–97, mar. 2013.

MIRONIDIS, G. K. et al. Resurgence of the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* in northern Greece associated with insecticide resistance. **Insect Science**, v. 20, p. 505–512, 2013.

MURÚA, M. G. et al. First Record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. **Florida Entomological Society**, v. 97, n. 2, p. 854–856, 2014.

POGUE, M. G. A New Synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and Differentiation of Adult Males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliiothinae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, n. 6, p. 1222–1226, 2004.

QUANTUM GIS user guide version 2.6.1 "Brighton".QGIS. Disponível em: <http://qgisbrasil.org/>. Acesso em 15 nov. 2014.

SALVATO, P. et al. Do sexual pheromone traps provide biased information of the local gene pool in the pine processionary moth? **Agricultural and Forest Entomology**, v. 7, p. 127–132, 2005.

TORRES-VILA, L. M. et al. Insecticide resistance of *Helicoverpa armigera* to endosulfan, carbamates and organophosphates: The spanish case. **Crop Protection**, v. 21, p. 1003–1013, 2002.

SPECHT, A; SILVA, E.; LINK, D. Noctuídeos (Lepidoptera, Noctuidae) do Museu Entomológico Ceslau Biezanko, Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas, RS. **Revista Brasileira de Agrocência**, v. 10, n. 4, p. 389–409, 2004.

4 CAPÍTULO III – Análise do potencial desenvolvimento da *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1809) Lepidoptera:Noctuidae) em cultivo de soja no município de Bom Retiro, região serrana de Santa Catarina, e a correlação entre fatores climáticos e o número de capturas em armadilhas tipo Delta contendo feromônio sexual sintético

RESUMO

Este estudo elaborou um modelo de potencial desenvolvimento do ciclo ovo-emergência do adulto por meio de cálculo de graus-dias, segundo as exigências térmicas em relação às temperaturas do ano de 2013 no município de Bom Retiro (SC) e os estádios fenológicos de soja cultivar Valente. O município apresenta expansão na área de plantio de soja, estando mais isolado em relação às demais regiões produtoras do Estado. Foram também observadas correlações entre o número de mariposas de *Helicoverpa armigera* capturadas em armadilhas com feromônio sexual sintético e fatores climáticos tais como: temperatura, velocidade do vento, umidade e precipitação nos municípios de Campos Novos e Chapecó. O plantio de soja considerado em Bom Retiro foi a partir de outubro com colheita em abril. Gerou-se a informação da ocorrência de duas gerações completas e uma terceira em desenvolvimento no momento da colheita, com larvas de segunda geração com potencial de causar dano em decorrência da fase fenológica da planta hospedeira em estágio reprodutivo. Em relação à análise de correlações climáticas não foi observado valores com significância estatística ($p > 0,05$).

Palavras-chave: Graus-dia. Número de gerações. Soja.

ABSTRACT

The aim of this study was to develop a model of potential rate of development from egg through imago emergency of *Helicoverpa armigera* considering the degree-day requirements, for the insect development. The data of temperatures were obtained during the year 2013 in Bom Retiro, state of Santa Catarina – Brazil, and considering the phenological development of cv. Valente RR soybean in this district. Bom Retiro has experienced an expansion in soybean acreage cultivation, being more isolated in relation to other areas with soybean farmers. Correlations were also made between the number of moths of *Helicoverpa armigera* collected by pheromone traps and climatic factors such as temperature, wind speed, humidity and rainfall at Campos Novos and Chapecó districts. October was considered as the month to sow the soybean and April to harvest. We suggest the occurrence of two full generations and a third generation being in development stage at harvest of soybean. The larvae of the second-generation could cause most damage due to the overlapping of this stage with the reproductive phenological stage of the host plant. The correlations between climatic factors and moths captures in Chapecó and Campos Novos were not statistically significant ($p > 0.05$).

Key-words: degree-days. Lepidoptera. Number of generations. Soybean.

4.1 INTRODUÇÃO

A maioria dos insetos tem variação populacional, conforme variação da temperatura ambiental, sendo assim, os padrões de resposta a esse fator climático é comumente estudados, com o intuito de estabelecer estimativas de potencial desenvolvimento de pragas e consequentemente de infestações. Combinando a temperatura e o tempo fisiológico para o desenvolvimento do inseto, determinamos o índice de graus-dias e os modelos gerados, a partir dos valores obtidos, devem atender as exigências adequadas para cada espécie, considerando os intervalos entre as fases de desenvolvimento do ciclo biológico e a maior amplitude térmica possível (MELO et al., 2006).

As exigências térmicas de temperatura para a *Helicoverpa armigera* são relatadas na literatura por meio de estudos conduzidos em condições controladas de laboratório. Os ensaios de JALLOW; MATSUMURA (2001) apresentam resultados que atendem a maior amplitude térmica em relação aos limiares e somas térmicas, sendo por esse motivo o utilizado como base no presente estudo.

O modelo de graus-dias vem sendo útil na previsão do aumento populacional e para estimar o tempo médio de desenvolvimento de cada fase do ciclo, ovo-larva-adulto. É uma tática que auxilia o melhor gerenciamento de monitoramento e controle da praga, além de poder auxiliar órgãos de defesa sanitária vegetal a definirem estratégias de monitoramento e detecção, otimizando recursos em relação aos anos em que deve ocorrer acréscimo populacional da praga. Quando relacionadas às fases imaturas do inseto com os estádios fenológicos da planta hospedeiras é possível estimar quando é necessária a intensificação do controle, já que a *H. armigera* tem preferência por estruturas reprodutivas.

O município de Bom Retiro localizado na região serrana de SC destaca-se na produção de maçã, entretanto recentemente tem expandido a área plantada de soja, além da produção de tomate. Segundo o Banco de Dados Agregados do Sistema do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de Recuperação Automática (SIDRA/IBGE), em 2014 foram destinados ao plantio de soja 6.500 hectares e 200 hectares ao plantio de tomate, ambas são plantas hospedeiras da *H. armigera*. O clima do município é caracterizado por temperaturas baixas, muitas vezes inferiores a zero grau Celsius, que favorecem um menor número de gerações e até mesmo um longo período de diapausa facultativa. Sendo assim, neste município o número de gerações pode ser menor que nas demais regiões, porém com danos tanto ao cultivo de soja quanto ao

de tomate. A safra de soja no município estende-se do final de outubro com a colheita no início de abril, concomitantemente há a colheita do tomate.

Em relação aos municípios que apenas produzem grãos, com destaque a soja, foram avaliadas a influência da temperatura, precipitação, UR% e velocidade do vento nos municípios de Campos Novos e Chapecó. Segundo informações do IBGE e EPAGRI/CIRAM o município de Chapecó tem clima classificado como Cfa segundo Köppen, mesotérmico úmido com média das temperaturas máximas no verão de 27,7°C e mínimas no inverno de 11,4°C, com pluviometria média anual de 1997 mm. O município de Campos Novos também é classificado como Cfa, mesotérmico brando superúmido, com média das temperaturas máximas no verão 26, 8°C e mínimas no inverno de 8,5°C, com precipitação média de 1758 mm. Esses fatores podem ser determinantes no número de capturas, obtidos em armadilhas Delta com feromônio sexual sintético, seja pela influência na dinâmica populacional do inseto ou pela dispersão e atração do feromônios.

O objetivo do presente estudo foi de elaborar um modelo de potencial desenvolvimento do ciclo ovo-emergência do adulto, correlacionando com os estádios fenológicos da planta hospedeira, soja cultivar Valente RR, e temperaturas do município de Bom Retiro na região serrana de Santa Catarina. Além de, analisar a correlação entre o número de capturas observados em dois dos principais produtores de soja do Estado e as temperaturas, precipitações, UR% e velocidade do vento, nos meses de monitoramento das safras 2013 – 2014 e 2014 – 2015.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para testar um modelo de avaliação do potencial de desenvolvimento, usaram-se como referência as temperaturas máximas, mínimas e médias mensais (graus Celsius °C) do município de Bom Retiro, na região da serra catarinense, no ano de 2013, por estar expandindo a área plantada de soja, estando mais isolado geograficamente em relação as demais regiões produtores do Estado, destacando-se também no cultivo de tomate que é hospedeira da praga. Os dados climáticos para essa avaliação foram obtidos por meio da Estação de Avisos de São Joaquim, administrada pela CIDASC, que coleta informações climáticas no município de Bom Retiro, através de uma estação meteorológica DAVIS que descarrega dados em formato de

arquivo texto (txt), os quais são posteriormente transferidos para planilha de Excel.

A planta hospedeira padrão para gerar o modelo foi à soja, cultivar Valente RR, com semeadura ocorrendo de 25 de outubro a 10 de dezembro e a colheita de 01 a 25 de abril, conforme informações da Cooperativa Regional Agropecuária, Vale do Itajaí (Cravil). Essa cultivar tem um ciclo com duração média de 153 dias. Considerou-se a semeadura em 25 de outubro com colheita no mês de abril. Para representar a relação entre o tempo e as fases de desenvolvimento do inseto e da planta foi utilizado o diagrama de Gantt, que fornece um esquema claro de quando se inicia cada fase e quando termina baseada em uma linha do tempo.

Para a construção do modelo foi considerado as exigências térmicas das diferentes fases de desenvolvimento do inseto, segundo os dados obtidos por Jallow e Matsumura (2001), que considera a fase de ovo com 10,5°C como temperatura limiar inferior para o desenvolvimento e 51 GD (graus-dias); 11,3°C e 215 GD para a fase larval até a pré-pupa; 13,8°C e 151,8 GD para a fase de pupa.

Por meio dos dados de temperaturas mínimas e máximas mensais e as exigências térmicas para o desenvolvimento do inseto, foi calculado os graus-dias diários, conforme método Silveira Neto et al. (1976). Os resultados foram obtidos com auxílio da Dra. Maria Conceição Perez Young Pessoa, pesquisadora do Laboratório de Quarentena Costa Lima-Embrapa Meio Ambiente.

Para avaliar a influência dos fatores abióticos na captura de adultos machos foi feita análise de correlação de Pearson, relacionando temperatura (°C), pluviometria (mm), umidade relativa (UR%) e velocidade do vento (Km/h). Os dados climáticos foram obtidos por meio do Centro de Informações de Recursos Ambientais de Hidrometeorologia, da Empresa de Pesquisa e Extensão Rural de SC (Epagri/CIRAM). Todos os dados analisados foram compilados em planilhas eletrônicas do Excel e as figuras foram elaborados através do software SigmaPlot 12.5, na versão de avaliação.

4.3 RESULTADOS

Para a avaliação do potencial desenvolvimento da *Helicoverpa armigera* no município de Bom Retiro (SC), como referências, foram utilizadas as temperaturas registradas no ano de 2013 (Tabela 2). Verifica-se que a média de 29,5±2,5°C das temperaturas máximas do período analisado são inferiores ao limiar superior de 32,5°C, para o

incremento da duração das fases do ciclo biológico para o desenvolvimento da *H. armigera*. No entanto a média da temperatura mínima no período que foi de $6,7 \pm 3,2^{\circ}\text{C}$ foi sempre abaixo do limiar inferior de $13,3^{\circ}\text{C}$ segundo Jallow e Matsumura (2001).

Comparando com os limiares inferiores propostos por Jallow e Matsumura (2001), apenas nos meses de dezembro e fevereiro as temperaturas mínimas mensais foram superiores para o desenvolvimento da fase de ovo ($10,5^{\circ}\text{C}$), mas não para as fases de larva e pupa, que são de $11,3^{\circ}\text{C}$ e $13,8^{\circ}\text{C}$ respectivamente. As temperaturas médias, contudo foram sempre superiores aos limiares inferiores, considerados para o desenvolvimento da *H. armigera*.

Tabela 2: Temperaturas máximas, mínimas e médias registradas no ano de 2013, na estação meteorológica localizada no município de Bom Retiro-SC e compiladas pela unidade técnica da CIDASC - Estação de Avisos de São Joaquim.

MESES	Tmáxima	Tmínima	Tmédia
Janeiro	28,7	6,8	18,8
Fevereiro	30,9	10,6	19,5
Março	27,8	7,8	17,6
Abril	25,8	2,0	15,2
Maiο	27,2	-2,5	12,4
Junho	22,5	-0,1	11,8
Julho	24,9	-4,6	10,1
Agosto	25,8	-1,5	11,3
Setembro	28,7	1,2	13,5
Outubro	27,4	4,4	15,2
Novembro	29,0	4,9	17,1
Dezembro	33,4	10,7	19,6
Média	27,7	3,3	15,1

Estão representados no diagrama Gantt (Figura 15), a relação entre os dias pós-semeadura (DAS) e o tempo de desenvolvimento para cada fase, número de gerações, assim como os estádios fenológicos da cultivar de soja Valente RR, considerando a data de semeadura em 25 de outubro e colheita em 01 abril de 2014. Cada barra horizontal está indicando o início do evento, sua duração até o término.

A presença de adultos de primeira e segunda geração seria observada entre V12 (12º nó) e R6 (grão cheio), entre os meses de 25 de

dezembro e 23 de fevereiro, respectivamente, com oviposições da segunda geração ocorrendo em 29 de dezembro. Potencialmente seriam observadas lagartas no intervalo de 10 a 45 DAS, entre 03 de novembro a 03 de dezembro, na primeira geração, quando as plantas estariam na fase vegetativa, entre VE (emergência) e V5 (5º nó). A segunda geração, entretanto estaria na fase larval entre 70 a 100 DAS, no período de 02 de janeiro a 01 de fevereiro, e potencialmente causaria danos, pois as plantas estariam no estágio reprodutivo entre R1 (início da floração) a R5 (início do enchimento das vagens) que é quando a *H. armigera* torna-se mais importante, pois é uma espécie que ataca estruturas reprodutivas, sendo necessária a intensificação das vistorias na unidade de produção.

A duração em dias das fases de desenvolvimento da *H. armigera* em soja cv. Valente RR corresponde a: 8, 36, 17, 62 respectivamente para as fases de ovo, larva, pupa e adulto para a primeira geração; 5, 30, 21,62 para a segunda geração; 6 dias para ovo na terceira geração, sendo que as larvas estariam em desenvolvimento com 188,38 GD acumulados dos 215 necessários para a mudança de fase até o momento da colheita, não sendo possível completar essa geração, e se alguns indivíduos chegassem até o final da fase larval, poderiam empupar e dessa forma haveria a disponibilidade de pupas no solo, que poderiam entrar em diapausa durante o inverno, se as temperaturas se mantivessem abaixo de 13,3°C segundo Jallow e Matsumura (2001). Em anos com inverno menos rigoroso em que fossem encontradas plantas hospedeiras espontâneas como soja “guaxa” haveria disponibilidade de alimento e viabilidade de desenvolvimento de outras gerações.

Na figura 15 as barras horizontais correspondem ao início e o fim de cada fase, sendo que os números indicados referem-se ao tempo em dias para completar a etapa do ciclo. Comparando-se as barras do primeiro quadro com as do segundo, que estão no mesmo intervalo de tempo, observa-se a relação em determinada geração da fase do ciclo de vida da praga e o estágio fenológico da planta hospedeira. As barras mais escuras indicadas quanto ao estágio fenológico advertem em quais fases podem ocorrer prejuízos, pois correspondem aos estádios reprodutivos da soja cultivar Valente RR. A fase crítica ocorre entre os 71 a 96 DAS, quando haveria a presença de larvas de segunda geração, responsáveis por injúrias, considerando que haveria estruturas reprodutivas nas plantas.

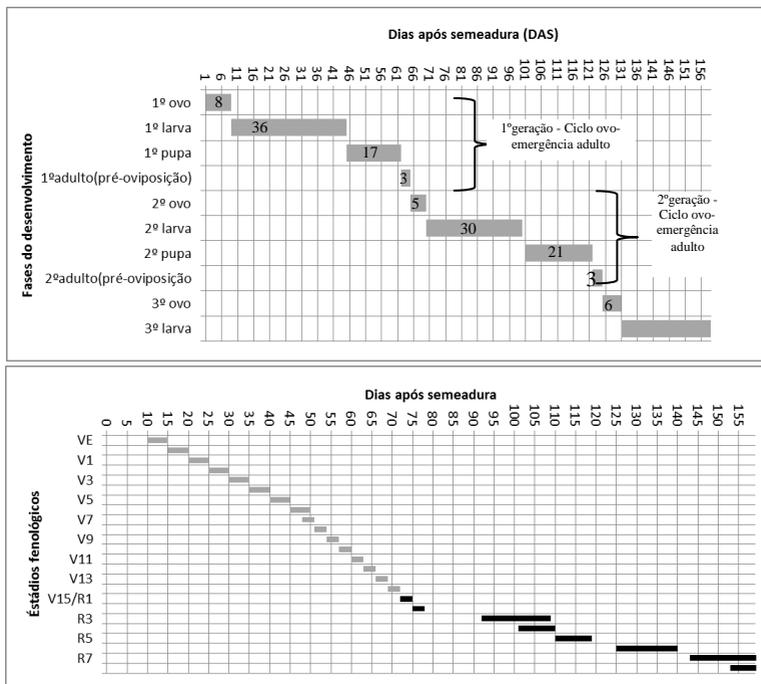


Figura 15: Diagrama de Gantt representando a relação do tempo (Dias Após a Sementeira – DAS) e as fases de desenvolvimento da *Helicoverpa armigera*, e dos estádios fenológicos da cultivar de soja Valente.

Quando analisadas as correlações de Pearson entre as temperaturas máximas, médias e mínimas, pluviometria, umidade relativa e velocidade do vento, não foram observadas correlação significativa para os parâmetros climáticos nos períodos analisados (Tabela 3). Para o município de Campos Novos, as correlações positivas obtiveram valores mais elevados para as temperaturas mínimas e médias 0,994 e 0,991^{ns} ($p > 0.050$); umidade relativa 0,901^{ns} ($p > 0.050$), enquanto o valor mais elevado de correlação negativa foi sobre a velocidade do vento, -0,958^{ns}. Valores elevados de correlação positiva para a precipitação foram observados em ambos os municípios na 0,990^{ns} ($p > 0.050$) (Campos Novos) e 0,907^{ns} (Chapecó). Os valores de correlação foram menores e na maioria negativos em Chapecó, sendo o menor valor observado com relação à velocidade do vento (-0,0594^{ns}) ($p > 0,050$).

Tabela 3: Coeficientes de correlação de Pearson, entre o total de capturas de *Helicoverpa armigera* e os diferentes fatores climáticos.

Local	T°Cmín.	T°C.máx.	T. média	UR (%)	Precip. (mm)	Vel. Vento (Km/h)
Campos Novos	0,994 ^{ns}	-0,705 ^{ns}	0,991 ^{ns}	0,901 ^{ns}	0,990 ^{ns}	-0,958 ^{ns}
Chapecó	-0,441 ^{ns}	-0,404 ^{ns}	-0,631 ^{ns}	0,635 ^{ns}	0,907 ^{ns}	-0,0594 ^{ns}

^{ns} - Não significativo ($p > 0.050$)

Nas figuras 16, 17, 18 e 19 estão representados nas barras verticais os números de mariposas da espécie *H. armigera* capturadas em armadilha tipo Delta com feromônios sexual sintético nos meses de dezembro de 2014 e janeiro e fevereiro para Campos Novos e adicionalmente março e abril para Chapecó de 2015. As linhas sobrepostas indicam as temperaturas mínimas, máximas, médias, UR%, precipitação e velocidade do vento.

Observa-se um maior número de mariposas capturadas nos meses de janeiro e março, respectivamente em Campos Novos e Chapecó, quando ocorreram os maiores índices pluviométricos no período avaliado e UR% aliado a uma menor velocidade do vento (Figuras 17 e 19).

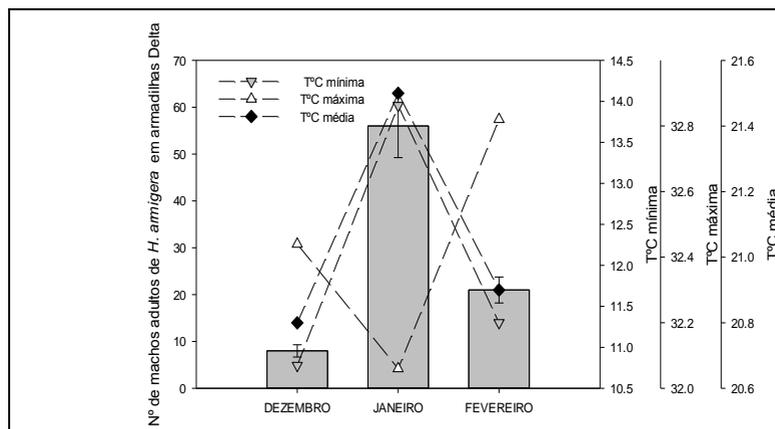


Figura 16: Número de machos adultos (\pm desvio padrão) de *Helicoverpa armigera* em armadilhas tipo Delta com feromônio sexual sintético e as temperaturas mínimas, máximas e médias em diferentes meses do ano, na safra 2013-2014 no município de Campos Novos.

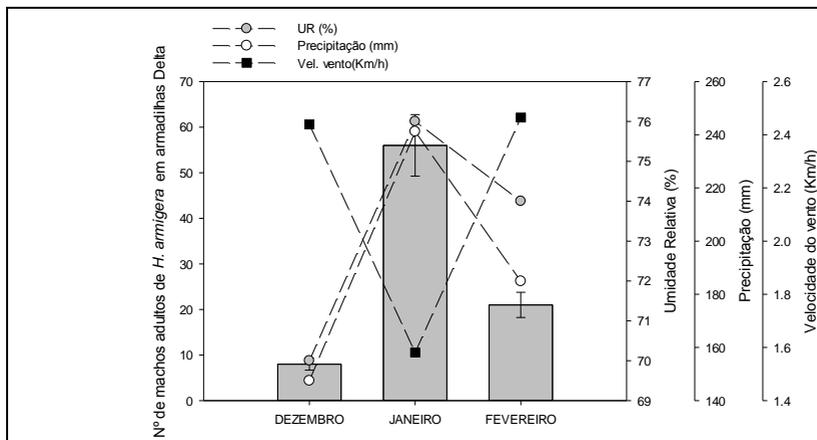


Figura 17: Número de machos adultos (\pm desvio padrão) de *Helicoverpa armigera* em armadilhas tipo Delta com feromônio sexual sintético e os diferentes índices de umidade relativa, precipitação e velocidade do vento em diferentes meses do ano, na safra 2013 -2014 no município de Campos Novos.

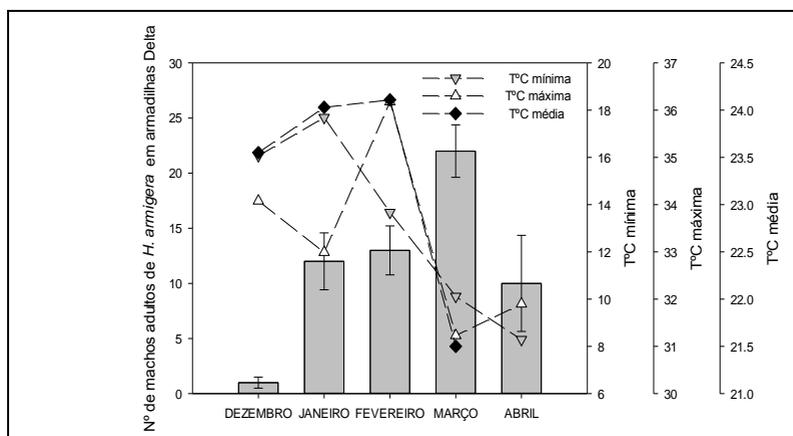


Figura 18: Número de machos adultos (\pm desvio padrão) de *Helicoverpa armigera* em armadilhas tipo Delta com feromônio sexual sintético e as temperaturas mínimas, máximas e médias em diferentes meses do ano, na safra 2013 -2014 no município de Chapecó.

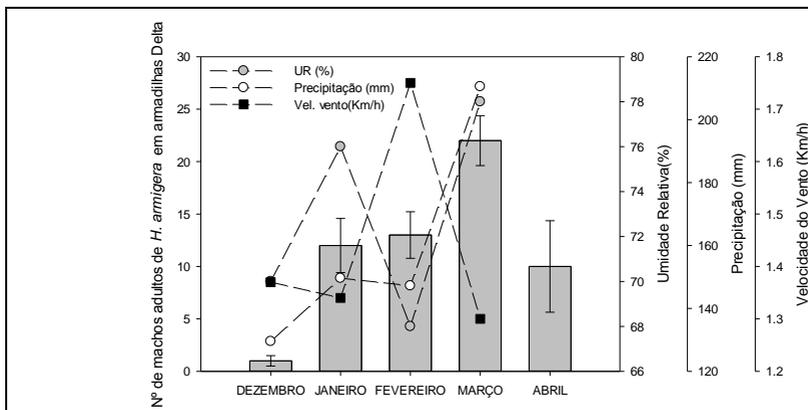


Figura 19: Número de machos adultos (\pm desvio padrão) de *Helicoverpa armigera* em armadilhas tipo Delta com feromônio sexual sintético e os diferentes índices de umidade relativa, precipitação e velocidade do vento em diferentes meses do ano, na safra 2013 -2014 no município de Chapecó.

4.3 DISCUSSÃO

O fator considerado determinante e mais usado em modelos com o princípio de prever a dinâmica populacional é a temperatura. As temperaturas estão associadas ao incremento da velocidade de desenvolvimento, fecundidade e conseqüentemente aumento da prole. Vários modelos são propostos na literatura para prever a dinâmica populacional da *H. armigera* utilizando na maioria o cálculo de graus-dia, que representa o somatório de temperaturas que estão acima do limiar inferior para o desenvolvimento da *H. armigera* e outras pragas (BARTEKOVA; PRASLICKA, 2003; JALLOW; MATSUMURA, 2001; MURRAY; LEADER, 2008).

Para propor um modelo potencial para o desenvolvimento da *H. armigera* simulou-se como seria o ciclo biológico do inseto-praga em Bom Retiro, um local de inverno rigoroso, com temperaturas abaixo de zero e que tem expandido sua produção agrícola para o cultivo de soja e tomate. Para tal utilizou-se os dados fenológicos de uma variedade de soja cultivada na região. Por meio do cálculo de graus dia identificou-se a ocorrência de até três gerações, sendo que a segunda geração é a que poderia causar dano à cultura, pois as larvas estariam presentes no estágio reprodutivo da cultura, entre os 70 aos 100 dias após a semeadura (DAS). Uma terceira geração se desenvolveria no momento

da colheita, podendo ocorrer à mudança para a fase de pupa, ficando em diapausa sob o solo durante o inverno até que as condições se tornassem favoráveis para o seu desenvolvimento.

Pessoa et al. (2008) para a região de Barretos, norte de São Paulo, observou seis gerações de *H. armigera* em apenas uma safra, sem indicativo de diapausa. Em Bom Retiro pode ocorrer a diapausa, influenciando o número de gerações para a próxima estação. Segundo Kurban et al. (2007) a diapausa é influenciada mais pela temperatura a partir do 5º instar larval e pré-pupa do que pelo fotoperíodo, podendo ocorrer diapausa a partir de temperaturas abaixo de 20°C, que pode variar em sexos e entre regiões geográficas. Portanto, para outras regiões de Santa Catarina, poderia haver um desenvolvimento mais rápido e com um maior número de gerações.

Comparando os dados disponíveis no compêndio de espécies invasivas do Centro Internacional de Agricultura e Biotecnologia (CABI), os valores calculados comparativamente com o informado em outros locais são compatíveis. A duração da fase de ovo considerando a média de três gerações foi de $6,3 \pm 1,5$, estando dentro do intervalo de 3 a 14 dias apontado por diversos autores. Em avaliações feitas na África do Sul, Sudeste e Sul da Ásia e em Guaíra (SP) o número de dias foi geralmente três, abaixo dos valores observados em Bom Retiro (SC). Na África do Sul para temperaturas entre 17°C foi observado 9 dias, semelhante aos 8 dias com temperatura média de 15,9°C observado na primeira geração em Bom Retiro (SC). A duração média da fase larval (larva+pré-pupa) foi de $33 \pm 4,2$ que é descrito na literatura como de 12 a 36 dias. Na Bulgária, as larvas de primeira geração, provenientes do período de diapausa se alimentam por 14 a 36 dias; Irã 14 a 18 dias no verão e 17 a 21 no outono em seis gerações; África do Sul 18 dias a 22,5°C e 51 dias a 17,5°C; Sul e Sudeste da Ásia, os tempos de desenvolvimento foram em média de 18,3 dias em temperaturas entre 21°C e 27°C, com pequenas variações dependentes da planta hospedeira. O tempo médio de desenvolvimento de pupa foi de $19 \pm 2,8$ dias, superior aos valores do que está descrito na África do Sul, Bulgária e Sul e Sudeste da Ásia que é de 10 a 14 dias, podendo variar entre 6 dias a 35°C e 30 dias a 15°C (CABI DATASHEET, 2015)

Em relação à análise de correlações entre condições climáticas e capturas nos municípios de Campos Novos e Chapecó apesar de não serem estatisticamente significativas em decorrência do curto período analisado, foram positivas para umidade relativa (UR) e precipitação, negativas para velocidade do vento e temperatura máxima em ambos os locais. Houve divergência, porém, em relação à temperatura mínima e

média, enquanto no município de Campos Novos foram positivas em Chapecó as mesmas foram negativas. Hameed et al. (2015) também observaram correlação negativa com a temperatura máxima e mínima, além de uma alta correlação positiva com surtos de *H. armigera* em relação a precipitação e a umidade relativa. Nos locais em que foram avaliadas as correlações, as temperaturas no período de maior captura eram de: 31°C a 32°C máxima; 10 a 14°C mínima; 21,5°C a média. Tais temperaturas podem ter sido determinantes na dinâmica da espécie nesses locais.

As correlações entre o número de capturas e fatores climáticos podem interferir sobre a biologia do inseto, pois afetam o comportamento e a sua fisiologia, além de interferir nas práticas agrícolas principalmente as relacionadas à aplicação de inseticidas, podendo ser preditivo para o ressurgimento e surtos de pragas, alterando a dinâmica espaço temporal da população de insetos (SILVEIRA NETO, et al., 1976; FENG et al., 2010; HAMEED et al., 2015). Entretanto pode interferir sobre o efeito da emissão do feromônio sexual sintético, pois a velocidade do vento pode afetar a dispersão do feromônios, determinando a correlação negativa (-0.958^{ns}) entre capturas e velocidade do vento encontrada em Campos Novos.

Neste estudo a análise de correlações entre capturas e fatores climáticos não se mostra a melhor maneira de analisar a origem de surtos populacionais da praga, pois outros fatores devem ser mais importantes, tais como a disponibilidade de alimentos e a presença de inimigos naturais.

Novos estudos devem ser realizados para esclarecer os fatores abióticos que interferem na dinâmica populacional da praga, assim como é necessário ter atenção às práticas agrícolas, principalmente aos métodos de controle, que quando inadequados podem ocasionar aumento da população e conseqüentemente surtos da praga. É preciso realizar monitoramento durante o ano todo para identificar de que forma ocorre a flutuação populacional da *H. armigera*, a fim de gerar informações regionalizadas que possam auxiliar no manejo da praga.

4.4 CONCLUSÕES

- ✓A previsão com base em graus-dias identificou a possibilidade de duas gerações completas da praga, com uma terceira geração ocorrendo no período da colheita;
- ✓O ciclo ovo-emergência para cada geração completasse em aproximadamente 60 dias;

- ✓É possível que haja pupas sob o solo no início do plantio da safra subsequente, remanescentes da última geração que se manteve em diapausa facultativa durante o inverno;
- ✓As correlações de Pearson entre o número de capturas e os fatores climáticos: precipitação, umidade relativa, velocidade do vento e temperaturas não foram estatisticamente significativas;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARTEKOVA, A.; PRASLICKA, J. The Effect of Ambient Temperature on the Development of Cotton Bollworm (*Helicoverpa armigera* Hübner , 1809). **Plant Protect. Sci.**, v. 42, n. 4, p. 135–138, 2003.
- DATASHEET *Helicoverpa armigera* (cotton bollworm). In: **Invasive Species Compendium**. Wallingford: CABI, 2015. Disponível em: <<http://www.cabi.org/isc/datasheetreport?dsid=26757>>. Acesso em: 15 jun. 2015.
- FENG, H. et al. Modeling the population dynamics of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) over a wide area in northern China. **Ecological Modelling**, v. 221, n. 15, p. 1819–1830, jul. 2010.
- HAMEED, A. et al. Forecasting and Modelling of *Helicoverpa armigera* (Hübner .) in Relation to Weather Parameter in Multan , Punjab , Pakistan. **Pakistan J. Zool.**, v. 47, n. 1, p. 15–20, 2015.
- IBGE. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/>. Acesso em: 15 jun. 2015
- JALLOW, M. F. A; MATSUMURA, M. Influence of temperature on the rate of development of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera□: Noctuidae). **Plant Pathology**, v. 36, n. 4, p. 427–430, 2001.
- MELO, L.A.M.P; TENENTE, R C V; OLIVEIRA, M.R.V. **Cálculo de graus-dia acumulados para subsidiar ações de gerenciamento de risco de pragas**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355163/2022523/cot145.pdf/ef9e5e0a-efd0-4c7e-8995-53a10c587cdf>. Acesso em: 30 jul. 2015.
- MURRAY, M. S.; LEADER, I. P. M. P. **Using Degree Days to Time Treatments for Insect Pests**. Disponível em: <<https://climate.usurf.usu.edu/includes/pestFactSheets/degree-days08.pdf>>. Acesso em: 23 jul. 2014.

PESSOA, M. C. P. Y.; MARINHO-PRADO, J. S.; SÁ, L. A. N. DE. **Avaliação do potencial desenvolvimento de *Helicoverpa armigera* (Hubner, 1809) (Lepidoptera: Noctuidae) em cultivo de soja na região de Barretos- norte do estado de São Paulo.** Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2014. 28p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Meio Ambiente; 63).

SILVEIRA NETO, S.; NAKANO, O.; BARBIN, D.; VILLA-NOVA, N. A. Manual de ecologia dos insetos. São Paulo: Ceres, 1976. 419 p.

5 CAPÍTULO IV - Identificação molecular por meio de PCR-RFLP e análise da diversidade genética da *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) no Estado de Santa Catarina inferida com marcadores microssatélites

RESUMO

As espécies *Helicoverpa armigera* e *Helicoverpa zea* são similares morfológicamente, sendo necessários métodos de dissecação da genitália de indivíduos adultos ou moleculares para a discriminação das espécies. Neste sentido, duas regiões parciais do *mtDNA*, os genes citocromo oxidase subunidade I (COI) e citocromo b (CytB), foram analisados por PCR-RFLP com enzimas de restrição *BstZ171* and *HphI*. Os padrões moleculares específicos corroboraram as identificações morfológicas. Por sua vez, a diversidade genética foi analisada por meio de quatro marcadores microssatélites, HaD47, HarSSR6, HaB60, HaC87, os valores obtidos apontam uma alta diversidade genética. A média de alelos por loco foi de 7,44, com heterozigosidade média esperada (uHe) de 0,654 e heterozigosidade média observada (Ho) de 0,212. O índice de fixação médio foi de 0,595. Os resultados do presente estudo são importantes para definir estratégias de manejo.

Palavras-chave: Marcadores microssatélites. Lepidoptera. *Helicoverpa armigera*. Diagnóstico molecular.

ABSTRACT

The species *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* are morphologically similar, being necessary the dissection of adult genitalia or molecular tools to discriminate those species. Two partial regions of the *mtDNA*, cytochrome oxidase subunit I (COI) and cytochrome b (Cyt B) genes, were examined by PCR-RFLP with endonucleases *BstZ171* and *HphI*. The restriction patterns, confirm the morphological identification. The genetic diversity among samples of populations of State Santa Catarina were analyze by polymorphic microsatellite markers HaD47, HarSSR6, HaB60, HaC87, and suggest high diversity genetic. The average alleles for loci 7,44, with average expected heterozygosity (uHe) 0,654 and observed heterozygosity (Ho) de 0,212. The fixation index average was 0,595. Results from these studies are importants for management practices form pest control.

Key-words: Markers microsatellites. Lepidoptera. *Helicoverpa armigera*. Molecular species diagnosis.

5.1 INTRODUÇÃO

A análise molecular é um importante instrumento para o correto diagnóstico nos casos em que há dúvidas geradas pelos caracteres morfológicos. O correto diagnóstico auxilia os órgãos de defesa sanitária vegetal, bem como os produtores a adotarem um manejo adequado quando há confirmação da introdução de uma nova espécie potencial causadora de dano econômico (QUEIROZ; LIMA, 2010).

Dentre as técnicas para a identificação de *Helicoverpa armigera* o uso de PCR-RFLP (Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição) tem sido adotado com êxito, por ser um método rápido e de baixo custo (BEHERE et al., 2008; QUEIROZ et al., 2013). Além do uso para a identificação de espécies, marcadores moleculares podem ser úteis para o estudo da diversidade genética de populações, subsidiando a caracterização de resistência a inseticidas e a toxinas de plantas geneticamente modificadas.

A diversidade genética é resultante da migração, seleção, deriva genética e mutação, sendo que sua distribuição denomina a estrutura genética de uma população (RODERICK, 1996). Tais estudos fornecem informações sobre o isolamento ou troca de material genético principalmente para espécies com uma alta capacidade de dispersão que migram a longas distâncias e podem aumentar a frequência de alelos resistentes em uma determinada população ou até mesmo diluir essa resistência quando há indivíduos suscetíveis (WEEKS et al., 2010; TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013). A diversidade genética também pode estar ligada a diferenças fisiológicas e do comportamento do inseto, tais como a preferência por determinada planta hospedeira, período de diapausa, resposta à feromônios, parasitoides, refletindo a adaptação a diferentes agroecossistemas e zonas ecológicas (JALLOW; PAUL CUNNINGHAM; ZALUCKI, 2004; BEHERE et al., 2013).

Diversos estudos utilizando marcadores microssatélites têm sido feitos em regiões agrícolas de países como Austrália, China e Índia, entre outros, para entender as consequências do manejo adotado quanto ao uso de inseticidas e a plantas *Bt* em *H. armigera* (BEHERE et al., 2007; WEEKS et al., 2010; BEHERE et al., 2013; TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013). Entretanto, o uso de microssatélites em estudos com lepidopteras ainda causa divergências, porque muitas sequências apresentam múltiplas cópias no genoma e similar quantidade em regiões flaqueadoras, mas ainda assim têm um uso promissor (ZHANG, 2004).

Atualmente há muitos estudos sobre a diversidade genética da *H. armigera* sendo realizados no país. No entanto, poucos estudos foram publicados até o momento e nenhum utilizando marcadores microssatélites (LEITE et al., 2014; MASTRANGELO et al., 2014). Assim, este estudo tem como objetivos identificar as espécies de *Helicoverpa* com o uso de por PCR-RFLP e caracterizar a diversidade genética das amostras de populações por meio de marcadores microssatélites naquelas com indivíduos previamente identificados morfológicamente.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Amostras do gênero *Helicoverpa*

As coletas de mariposas do gênero *Helicoverpa* foram descritas no item 3.2.1 (Capítulo 2). Do total coletado, 100 foram submetidas à identificação molecular por PCR-RFLP (ANEXO III) e 87 a análise da diversidade genética por meio de marcadores microssatélites. Para PCR-RFLP foram utilizadas tanto amostras de *H. armigera* quanto de *H. zea* conforme identificação morfológica. Na análise de diversidade genética por marcadores microssatélites as 87 amostras foram agrupadas em quatro populações conforme a região geográfica (Tabela 4).

Tabela 4: Indicação das regiões e municípios que foram agrupados como populações de *Helicoverpa armigera* para análise de diversidade genética por meio de marcadores microssatélites.

População	Região	Municípios
POP 1 - CN	Meio-Oeste	Campos Novos, Zortéa,
POP 2 - BR	Serrana	Bom Retiro
POP 3 - XAP	Oeste	Chapecó, Nova Itaberaba.
POP 4 - EO	Extremo-Oeste	Descanso, Dionísio Cerqueira, Jupiá, Iporã do Oeste, Palma Sola.

5.2.2 Extração e quantificação de DNA

O DNA foi extraído a partir de tecidos de partes dos insetos adultos (asas, cabeça, tórax, pernas), que haviam sido anteriormente submetidos à identificação morfológica e armazenados a -20°C logo após a retirada do abdômen e posteriormente a -80°C .

Foi utilizado o método CTAB com pH 11,0 para a extração do DNA (BOITEUX; FONSECA; SIMON, 1999). Para tal, as amostras foram maceradas em cadinhos com Nitrogênio líquido e acondicionadas em tubos de microcentrífuga de 2,0 ml contendo 700 μl de Tampão CTAB (2% CTAB; 100 mM de Tris-HCL, pH 8,0 50 mM NaCl e 0,2% de mercaptoetanol).

Os tubos foram incubados a 60°C por uma hora, invertendo-os a cada 10 min. Após este período os tubos foram deixados em temperatura ambiente por 5 min, aos quais foram adicionados 700 μl de CIA (Clorofórmio; Álcool Isoamílico, 24:1), seguido de inversão dos tubos por 5 min. Após, os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 5 min, transferindo-se o sobrenadante para tubos de 1,5 ml com a adição de 500 μl de isopropanol, mantendo a -20°C durante uma noite.

Os microtubos foram então submetidos a uma nova centrifugação a 13.000 rpm por 12 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com 400 μl de álcool 70% e absoluto, respectivamente, com centrifugações de 5 min por 13.000 rpm a cada lavagem.

Após as lavagens, o sobrenadante foi eliminado e o precipitado (*pelet*) foi seco a temperatura ambiente por 2h30min e ressuscitado em 50 μl de RNase, permanecendo por 3 h em incubador à 37°C . As amostras permaneceram armazenadas à -20°C . O DNA foi quantificado em gel de agarose 0,8%, e diluído para 10 ng/ μl antes do uso.

5.2.3 PCR amplificação para RFLP

As amplificações foram feitas de sequências parciais dos genes mitocondriais do citocromo oxidase I (COI) e citocromo B (CytB), pelos seguintes pares de iniciadores (primers):

➤LCO 1490-J-1514 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') e HCO 2198-N2175 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3');

➤CytB-10933 (5'-TAGGATATGTTTTACCTTGAGGAC-3') e CytB-11388 (5'-TCCTCCTAATTTATTAGGAATTG-3').

As reações de PCR foram realizadas em termociclador Veriti (Applied Biosystems) programado para: 94°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 1 min; temperatura de anelamento de 48°C por 1 min, e 72°C por 1.30 min, com extensão final de 72°C por 5 min. O volume final foi de 25 µl, contendo 2,5 µl de tampão (10X), 0,2 mM de dNTPs, 0,4 mM de cada iniciador, 1U de Taq DNA polimerase (GENETBIO), 2 µl de DNA genômico de amostras de espécies do gênero *Helicoverpa*. Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose a 1,5% com ladder 100 pb.

5.2.4 Digestão com Enzimas de Restrição (PCR-RFLP)

Para a identificação molecular das espécies foi utilizada a técnica de PCR-RFLP. O produto da PCR (10 µl) foi digerido com 0,5 µl de enzima de restrição (*HphI* ou *BstZ171*) em um volume final de 25 µl contendo também 2,5 µl Tampão (NEBuffer 10X) e água ultra-pura. O volume de PCR foi definido com base na quantificação em gel de agarose 1,5% com ladder Low DNA Mass (Invitrogen). As amostras foram incubadas por 6 h a 37°C com inativação a 65°C por 30 min. Os produtos da digestão foram separados por eletroforese com voltagem constante de 80V em gel de agarose 3,0% e registrados em fotodocumentador UVP.

5.2.5 Amplificação dos marcadores microssatélites (*ssr*) por PCR

Foram utilizados oito marcadores microssatélites (SCOTT, 2003; JI, 2005) combinados inicialmente em multiplex de quatro pares cada e posteriormente ajustados para dois, sendo apenas os iniciadores forward marcados com fluorescência (Tabela5). As reações foram feitas utilizando o kit KAPA 2G (Kapa Biosystems, Inc. Boston, USA). O produto da reação multiplex foi composto de 5 µl de KAPA 2G, 0,2 µl de cada primer e água ultra pura para completar o volume final de 10 µl. As amplificações por PCR ocorreram em termociclador Veriti (Applied Biosystems) programado para: 94°C por 3 min; 37 ciclos de 94°C por 1 min; temperatura de anelamento de 58°C e 60°C para os diferentes multiplex, por 1 min, e 72°C por 1 min, com extensão final de 72°C por 30 min. Metade do produto da PCR (5 µl) foi utilizado em eletroforese com voltagem constante de 90V em gel de agarose 3,0% para verificar a amplificação de cada iniciador e registrar em fotodocumentador UVP.

As análises dos fragmentos por meio de eletroforese capilar foram feitas em sequenciador automático Applied Biosystems 3500 XL. O produto da reação de PCR (1 µl) foi adicionado a 0,25 µl do marcador Gene Scan 600 LIZ (Life Technologies) e 8,75 µl de formamida (Life Technologies). Os picos de alelos foram verificados com o uso do software GeneMapper, ajustando-se a diluição quando identificada falha na amplificação ou sinais muito intensos. Os produtos da reação de PCR do multiplex composto pelos pares de iniciadores HaC87 e HaC14, não foram diluídos para a genotipagem. Apenas o multiplex dos iniciadores HaB60 e HarSSR6 foram submetidos a diluição de 1:20 em água ultrapura.

Tabela 5: Características e sequências dos pares de iniciadores de oito locos microssatélites em *Helicoverpa armigera*

Loco	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Ta (°C)	Tamanho esperado	Marcação 5'
HaC14	TCCACACAGTTGCATTATGA	CGCCATAATCCTATTGATTC	60	161	VIC
HaD47	TCAAACACACATACTTGACTA	TCCAGCAGTGGAAATGCGA	60	140-200	PET
HarSSR6	TGTTGTTCAGAGCTGCC	TTCAGCAACACAACCGTACA	60	292-330	6-FAM
HarSSR10	CAGGACATGCAATGATGAG	TTTGATACTGAGTCTGATGTG	60	300-320	NED
HaB60	CACCACCTGACATAACGC	AAAGGAGCAGCAATTGCAAGC	58	160	6-FAM
HaC87	ACGCGAGCACCAACTGTAA	GAGACCAATAGCAGTAGTTC	58	120	VIC
HarSSR7	AAGCAATAATTACCAGAAACAG	GTTTATTCTGTATTTCATTAATAG	58	120	NED
HarSSR9	AGCTCCACAACCTTAACTAC	GCAAACGATCACTGATATTAAC	58	120	PET

5.2.6 Análise da diversidade genética

Com o uso do software GenAlEx 6.5 vinculado a uma planilha do Excel foram estimados os números de alelos por locos, as frequências alélicas, as estatísticas F de Wright (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Perfil molecular por PCR-RFLP

Comparativamente a outros estudos com estas espécies e os perfis moleculares obtidos de local de reconhecimento para as enzimas de restrições utilizadas, houve coincidência em 100% nos resultados das análises morfológicas e pela técnica PRC-RFLP para a *H. armigera*. Porém, para *H. zea* encontrou-se três amostras que não corresponderam à análise morfológica, provavelmente por equívoco na comparação de estrutura da genitália, pois representam as primeiras amostras submetidas à identificação no período de avaliação. Sendo assim para a *H. zea*, considerando que apenas 7 amostras eram atribuídas a essa espécie, houve coincidência de 85%.

Com a metodologia empregada, foi obtida a amplificação parcial via PCR dos genes COI (700 pb) e CytB (500 pb). Posteriormente, os amplicons foram expostos a enzima de restrição *BstZ171*, gerando duas bandas (Figura 20). Entretanto, isso não ocorreu quando foi utilizada a endonuclease *Hph I* (Figura 21). Foram constatadas outras bandas além das duas esperadas (Figura 21, canaleta 11), provavelmente devido a clivagens inespecíficas, o que deve ser averiguado, visando as possíveis modificações na sequência do gene ou mesmo das condições da reação de restrição adotadas no presente estudo.

A região amplificada do gene CytB produziu duas novas bandas quando digeridas entre 200 pb e 300 pb com a enzima *Hph I*, não ocorrendo clivagem quando utilizada a *BstZ171*.

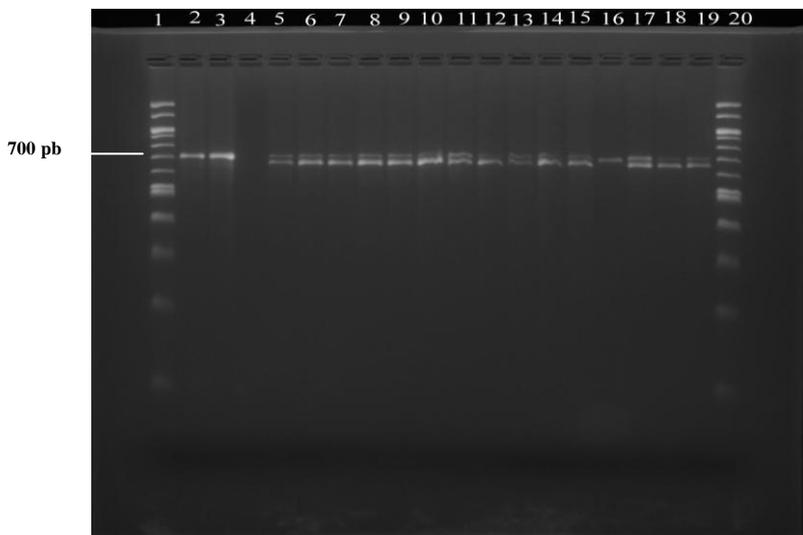


Figura 20: Amplificação parcial da região COI (700pb) de *Helicoverpa armigera* e *Helicoverpa zea* por PCR seguida de digestão pela enzima de restrição (*BstZI71*). Canaletas 1 e 20 ladder (100pb); 2 e 3 produto da PCR não digerido; 4 água; 16 *Helicoverpa zea*; todas as demais *Helicoverpa armigera*.

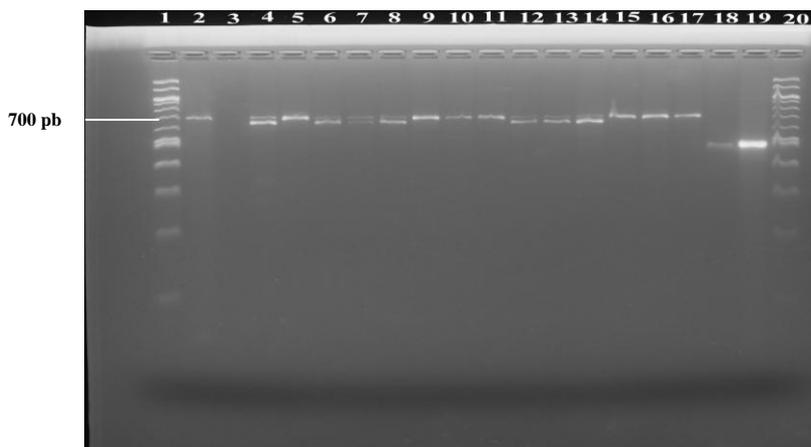


Figura 21: Amplificação parcial da região COI (700pb) de *Helicoverpa armigera* e *Helicoverpa zea* por PCR seguida de digestão pela enzima de restrição (*BstZI71*) e (*Hph I*). Canaletas 1 e 20 ladder (100pb); 2; 18; 19 produto da PCR não digerido; 3 água; 5,6,7,8,12,13,14 amostras digeridas com (*BstZI71*); 9,10,11,15,16,17 mesmas amostras digeridas com (*Hph I*).

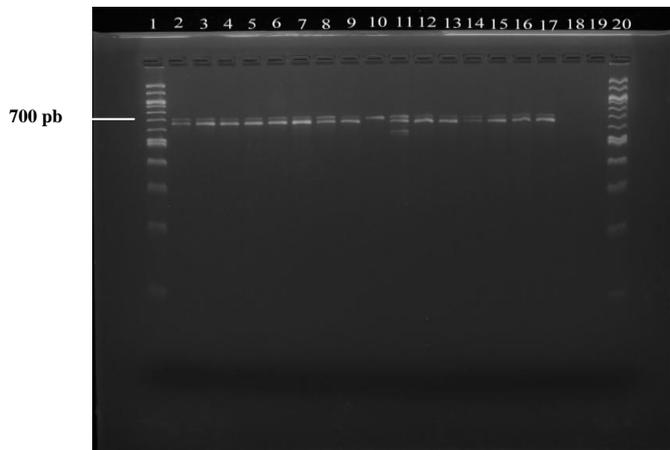


Figura 22: Amplificação parcial da região COI (700pb) de *Helicoverpa armigera* e *Helicoverpa zea* com digestão por enzima de restrição (*BstZ171*). 1 e 20 ladder (100pb); 10-*H. zea*; 11 inespecífico; 18 e 19 produto não amplificado; todas as demais *H. armigera*.

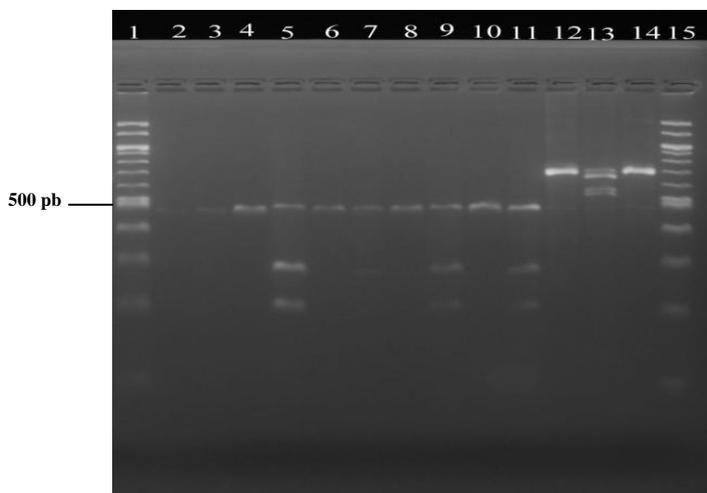


Figura 23: Amplificação de PCR parcial região CytB (500pb) de *Helicoverpa armigera* e *H. zea* com digestão por enzima de restrição (*Hph I*) e (*BstZ171*) 1 e 15 ladder (100pb); 2,3,4 produto da PCR não digerido; 5,9,11 digestão por (*Hph I*); 6,7,8,10 digestão por (*BstZ171*); COI (700 pb) 12,14 (*BstZ171*); 13 (*Hph I*).

5.3.2 Diversidade genética

Foram caracterizados os genótipos de 87 indivíduos pertencentes a quatro amostras de populações de *H. armigera* agrupadas por região geográfica: Meio-Oeste (POP 1 - CN); Serrana (POP 2 - BR) Oeste (POP 3 - XAP), e Extremo-Oeste (POP 4 - EO) do Estado de Santa Catarina em relação a quatro locos microssatélites. Considerando as quatro amostras de populações foram detectados 119 alelos, sendo que a amostra de população (POP 1 - CN) exibiu o maior número (38 alelos) e na amostra da população (POP 4 - EO) foi encontrado o menor número (21 alelos). É importante salientar que quanto maior foi o tamanho populacional maior o número de alelos bem como a média desses por loco. Os locos foram apresentaram média de 10 alelos para o loco HaC14; 13 no loco HarSSR6 e seis para os locos HaB60 e HaC87.

A heterozigosidade média esperada (uHe) foi de 0,654 e a heterozigosidade média observada (Ho) de 0,212. O índice de fixação médio foi de 0,595, sendo o maior valor encontrado na população 4 - EO (0,645) e o menor na população 1 - CN (0,516) (Tabela 6). Esses valores mostram excesso de homozigotos com relação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 6: Estimativas dos índices de diversidade genética de quatro subpopulações de *Helicoverpa armigera*, agrupadas por regiões geográficas: Oeste (XAP), Meio-Oeste(CN);Serrana (BR) e Extremo-Oeste (EO) de Santa Catarina.

Populações	N	Nº de alelos	<i>P</i>	<i>Ap</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>uHe</i>	<i>f</i>
POP 1 - CN	32	38	1	9,50	4,37	0,289	0,705	0,52
POP 2 - BR	23	35	1	8,75	4,80	0,227	0,706	0,60
POP 3 - XAP	18	25	1	6,25	3,77	0,178	0,594	0,61
POP 4 - EO	14	21	1	5,25	3,77	0,153	0,713	0,65
Média	22	30	1	7,44	4,18	0,212	0,654	0,595

N: Número de indivíduos analisados; N° de alelos: número de alelos; *Ap*: número médio de alelos por loco; *Ne*: número efetivo de alelos; *Ho*: heterozigosidade observada; *uHe*: heterozigosidade esperada enviesada; *f*: índice de fixação

Os valores da estatística F são apresentados na Tabela 7. O índice de fixação de alelos dentro de populações (F_{IS}) para os quatro locos analisados produziu o valor médio de 0,611, sendo que o loco HaC14 apresentou o maior coeficiente (0,88) e o loco HaC87 o menor (0,31). O coeficiente de fixação em relação ao total (F_{IT}) com média de 0,632 foi máximo em HaC14 (0,886) e mínimo em HaC87 (0,353), indicando redução da heterozigosidade devido a endogamia intrapopulacional e deriva genética entre populações. A divergência genética (F_{ST}) em relação aos quatro locos nas subpopulações analisadas, variou de 0,04 para HaC14 a 0,08 para HarSSR6, tendo média de 0,06, o qual corresponde a uma moderada diferenciação genética, conforme sugerido por Wright (1978). O número de migrantes médio foi de 4,2, sendo maior para HaC14 (5,5) e menor para HarSSR6 (3,1).

Os valores obtidos indicam que a maior parte da diversidade genética encontra-se dentro das populações embora exista moderada variação interpopulacional. O número de migrantes (N_m) estimado sugere alto fluxo gênico, impedindo que haja perdas significativas na variabilidade genética determinada por deriva entre populações, sendo, portanto o fluxo gênico determinante na frequência alélica e homogeneização.

Tabela 7: Estimativa das estatísticas F de Wright (F_{IS} , F_{ST} , F_{IT}) e do número de migrantes para as quatro populações para cada um dos quatro locos microsatélites.

Iniciador SSR	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	N_m
HaC14	0,88	0,88	0,04	5,5
HarSSR6	0,86	0,87	0,08	3,1
HaB60	0,38	0,42	0,05	4,3
HaC87	0,31	0,35	0,06	3,8
Média	0,611	0,632	0,06	4,2

Os valores apresentados na Tabela 8 assinalam um maior valor de F_{ST} nas populações agrupadas por distância geográfica entre POP 4 – EO e POP 1 – CN; POP 2 – BR ambos com 0,05 e menores valores (0,03) entre POP 2 –BR E POP 3 – XAP com POP 1 – CN. A proximidade entre os valores sugere pouca diferença genética entre populações.

Tabela 8: F_{ST} “par a par” a partir de quatro iniciadores microssatélites considerando quatro populações por distância geográfica de *Helicoverpa armigera* oriundas do Estado de Santa Catarina.

	POP 1 - CN	POP 2 - BR	POP 3 - XAP	POP 4 - EO
POP 1 - CN				
POP 2 - BR	0,03			
POP 3 - XAP	0,03	0,04		
POP 4 - EO	0,05	0,05	0,04	

Ressalta-se que os poucos indivíduos amostrados para a presente análise podem ser determinantes nos resultados obtidos, sendo um fator limitante para a elaboração de hipóteses sobre a estrutura genética de populações.

5.4 DISCUSSÃO

5.4.1 O perfil molecular obtido por PCR-RFLP por meio de *mtDNA* COI ou CytB

O perfil molecular obtido via PCR-RFLP por meio dos genes da *mtDNA*, COI ou CytB, para a identificação de espécies do gênero *Helicoverpa* por padrões de PCR-RFLP já foram testadas anteriormente por Kranthi et al., 2005 e Behere et al. (2008) com êxito. A digestão de *mtDNA* COI e CytB com o uso de enzimas de restrição permitiu a diferenciação entre duas espécies, *Helicoverpa zea* e *Helicoverpa armigera*. Foram submetidas à identificação apenas amostras de indivíduos na fase adulta, porém segundo Behere et al. (2008) tal procedimento não representa problemas na análise, sendo um método de diagnóstico que poderia ser utilizado ainda na fase larval, quando não é possível realizar distinção por características morfológicas.

As separações das bandas em eletroforese tiveram uma melhor resolução em gel de agarose 3,0%, comparativamente a concentração de 2,5% conforme descrito por Behere et al. (2008) e Kranthi et al. (2005) e também testada no presente estudo. Entretanto, foram constatadas outras bandas além das duas esperadas (Figura 28, canaletas 11), provavelmente devido a clivagens inespecíficas, o que deve ser averiguado, visando as possíveis modificações na sequência do gene ou mesmo das condições da reação de restrição adotadas no estudo. O uso da técnica de sequenciamento, principalmente, para as amostras que tiveram perfil molecular diferente do padrão de clivagem se constitui

numa alternativa que permitirá uma melhor compreensão destas diferenças no padrão de bandas nos perfis obtidos.

5.4.2 Diversidade genética

Dos oito locos testados em apenas quatro foi possível realizar a análise de fragmentos por meio de eletroforese capilar em sequenciador automático, pois não foi possível verificar alelos específicos, verificado pela ausência de picos quando visualizados no GeneMapper em amostras avaliadas por meio dos locos HaD47, HarSSR9, HarSSR7 e HarSSR10, marcados respectivamente com as fluorescências NED e PET. Foram testadas diferentes concentrações, porém sem êxito, podendo significar um problema na marcação dos primers, optando-se pela nova síntese dos mesmos para prosseguir com esse estudo inserindo os quatro locos supracitados.

Corroborando com os estudos realizados com diferentes marcadores moleculares, foi verificada uma alta diversidade genética em *mtDNA*, sendo detectados 119 alelos, com média de 7,44 alelos por loco mesmo com poucos indivíduos analisados. Compilando os resultados encontrados de diferentes autores em diversos locais do mundo, sejam por meio de marcadores microssatélites, isoenzimas, RAPD, *mtDNA* COI, verifica-se o mesmo padrão de alta diversidade genética, atribuída a uma alta capacidade de dispersão, percorrendo grandes distâncias, relatadas em até 3000 Km para a *Helicoverpa armigera* (NIBOUCHE et al., 1998; MASTRANGELO et al., 2014). A elevada diversidade genética entre indivíduos devem ser levadas em conta quanto ao manejo, considerando que a agricultura brasileira é pautada pelo uso intensivo de agrotóxicos e por variedades de diversas espécies expressando a mesma toxina *Bt*, todas essas se constituindo hospedeiras da *H. armigera*. Há então uma pressão de seleção direta para alelos de resistência tanto a inseticidas quanto a plantas com toxinas *Bt* (ALBERNAZ, 2011; TAY et al., 2013; LEITE et al., 2014). Anteriormente a liberação de um evento transgênico que expresse determinada toxina *Bt* dever-se-ia pensar em identificar os alelos raros que possam conferir resistência e verificar os aspectos ecológicos e biológicos do inseto-praga. Desta forma, seria possível determinar com maior robustez o tamanho da área de refúgio, além de facilitar a fiscalização para averiguar se de fato essas áreas estão sendo adotados por produtores nas diversas regiões agrícolas do país (PAVINATO, 2010; RESENDE et al., 2014).

Contudo o número de alelos estimado pode ser influenciado pelo método de análise utilizado. No presente estudo foram encontrados os tamanhos de 162 pb e 118 pb para os locos HaB60 e HaC87, respectivamente, corroborando com os encontrados por Weeks et al. (2010) pelos métodos de sequenciamento e genotipagem manual. Entretanto, existem divergências, para tamanho e número de alelos, entre as pesquisas realizadas por Scott (2005) e Endersby (2007) em avaliações de insetos coletados em diferentes regiões da Austrália. Como consequência, o primeiro encontrou alta diferenciação e estrutura genética entre populações, que não foi identificada no estudo subsequente.

Segundo Weeks et al., (2010) o contraste entre os dois estudos foi ocasionado pela diferença entre os sistemas adotados, pois um utilizou a identificação de alelos por meio automatizado, consistindo em separação por eletroforese em 5% de não desnaturada poliacrilamida com análise subsequente em GS2000 (Corbett Research, Mortlake, NSW, Austrália) e outro por gel de poliacrilamida desnaturado e comparado por meio de ladder, havendo diferença entre os números, frequência e tamanho de alelos.

Para um mesmo loco (HaB60) os mesmos autores identificaram os seguintes tamanhos de alelos para cada método: 165/166 pb (sequenciamento); 135/138 pb (automático); 165/168 pb (manual), sendo estes valores muito divergentes daqueles encontrados no presente estudo (162 e 84 pb).

Por uma análise de regressão Weeks (2010) identificou que para o mesmo número de amostras deveria encontrar 30, 15 e 12 alelos para os locos HaC14, HaB60 e HaC87, entretanto Scott et al. (2005a) encontrou 32, 25 e 33 respectivamente. Todavia, no presente estudo encontramos 41 (HaC14); 25 (HaB60) e 25 (HaC87).

As diferenças nos estudos de Scott (2005) e Endersby (2007) resultaram na identificação de homozigotos com alelos de tamanho 142 pb em sistema manual e 123 pb para automatizado, o sequenciamento mostrou que de fato era homozigoto (142 pb). Para o mesmo loco porém, outro indivíduo, foi homozigoto (135 pb) para manual, heterozigoto para automatizado (120 pb e 138 pb), sequenciamento entretanto identificou homozigoto (136 pb) (WEEKS et al., 2010).

Para fazer inferências consistentes, os resultados observados em estudos de diversidade genética populacional precisam ser baseados em um número razoável de locos. Os marcadores microssatélites com baixa frequência no genoma são difíceis de serem isolados em lepidópteros. Além disso, mais de 70% das sequências de microssatélites clonadas em

Helicoverpa armigera não são adequados como marcadores genéticos. Por fim, há baixa frequência de repetições e falsos positivos em bibliotecas genômicas (ZHANG, 2004; JI; ZHANG, 2004).

Mesmo assim, diversas pesquisas já foram realizadas para averiguar a estrutura genética de populações da *H. armigera* em diferentes países (SCOTT et al., 2005;2006; 2007; ENDERSBY et al., 2007; WEEKS et al., 2010), com os mesmos marcadores microssatélites utilizados em nosso estudo. Entre as pesquisas de Scott (2005) e Endersby (2007) o F_{ST} para os oito locos, entre o manual e automatizado foi de 0,0716 e 0,0035 respectivamente, que refletem nas diferenças entre os resultados obtidos. A interpretação dos dados de microssatélites pode ser errônea pela ocorrência de alelos nulos que conduzem a desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), mascarando os dados e produzindo um falso excesso de homozigotos. Quando alelos nulos foram excluídos dos resultados de Enderby (2007) e Behere et al. (2013) os valores de F_{ST} aumentaram. No caso do estudo mais recente analisado populações da Índia com o marcador Exon-Primed Intron-Crossing (EPIC)-PCR, foi observada estrutura genética dentro de uma região geográfica, estação de cultivo e planta hospedeira mesmo em distâncias de 60 km com F_{ST} de 0,192.

Apesar das problemáticas quanto ao uso de marcadores microssatélites em lepidopteras esse método é ainda promissor frente à quantidade de polimorfismo dos mesmos, razão pela qual foram utilizados no presente estudo. Novas hipóteses poderão ser atribuídas com o aumento do tamanho amostral e com a utilização de outros quatro locos microssatélites.

5.5 CONCLUSÕES

- ✓ A análise molecular por meio de PCR-RFLP corroborou com as identificações morfológicas por diferença de estruturas da genitália de machos do gênero *Helicoverpa*;
- ✓ Há uma alta diversidade diversidade genética na amostra realizada;
- ✓ Os resultados apontam excesso de homozigotos com relação ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg;
- ✓ É necessário incluir novos locos microssatélites e elevar o tamanho amostral para que possa ser levantado hipóteses sobre a diversidade genética da *Helicoverpa armigera* em Santa Catarina;

✓ Em razão do *mtDNA* ser uma herança materna é necessário observar se a taxa de migração obtida é válida uma vez que as análises foram efetivadas com a coleta de machos por meio de armadilhas com feromônios sexual;

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

De acordo com os resultados obtidos neste estudo a espécie *Helicoverpa armigera* está distribuída em todas as regiões de produção agrícola do Estado de Santa Catarina. A praga foi encontrada principalmente em áreas de plantio de soja, além de ter sido responsável por danos em tomateiros na safra 2013 – 2014 quando se observou um manejo inadequado para o controle da praga, com constantes aplicações de inseticidas.

Em todo o Brasil na safra 2014 – 2015 não foram relatados surtos da praga que tenham causado enormes prejuízos. No entanto, o monitoramento deve ser constante e ininterrupto, devendo ser feito por meio de armadilhas e inspeções em plantas hospedeiras, sendo essencial para avaliar o grau de infestação em áreas de plantio. A Defesa Sanitária Vegetal (DSV) de Santa Catarina necessita ter informações sobre o *status* da praga para que possa tomar decisões frente à legislação vigente relacionada à *H. armigera* e aos prejuízos que possam ocorrer para o setor agrícola catarinense.

O presente estudo possibilitou um diagnóstico da *H. armigera* no Estado, utilizando métodos científicos que possibilitaram analisar a ocorrência da praga e sua distribuição, além de prever o estabelecimento da espécie por meio de uma proposta de modelo de desenvolvimento do ciclo ovo-emergência e os riscos associados ao controle inadequado para a dinâmica populacional da espécie observada em análise de diversidade genética. Os resultados obtidos foram fundamentais para subsidiarem a não adoção do estado de emergência que autorizaria o uso de benzoato de emamectina em SC, corroborando a necessidade de o serviço da DSV ser pautado em pareceres técnico-científicos.

Ressalta-se a necessidade de se concluir o estudo da diversidade genética apresentado nesta dissertação e adicionalmente incluir novos estudos baseados em análises moleculares poderão esclarecer dúvidas sobre o estabelecimento da praga no Estado e a relação com as plantas hospedeiras cultivadas em território catarinense. O modelo de desenvolvimento do ciclo ovo-emergência também precisa ser ampliado para todas as regiões do Estado, auxiliando políticas públicas, técnicos e produtores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERNAZ, K. C. **Suscetibilidade à proteína Cry1Ac e diversidade genética em populações de *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil.** 2011. 83 p. Tese (Doutorado em Entomologia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2011.

BEHERE, G. T. et al. Molecular markers to discriminate among four pest species of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of entomological research**, v. 98, n. 6, p. 599–603, dez. 2008.

BEHERE, G. T. et al. Population Genetic Structure of the Cotton Bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in India as Inferred from EPIC-PCR DNA Markers. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 15, 2013.

BOITEUX, L.; FONSECA, M. E. .; SIMON, P. . Effects of plant tissue and DNA purification method on randomly amplified polymorphic DNA-based genetic fingerprinting analysis in carrot. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 124, n. 1, p. 32–38, 1999.

CAPRIO, M. A. Gene flow accelerates local adaptation among finite populations: simulating the evolution of insecti. **Entomological Society of America**, v. 85, n. 3, p. 611–620, 1992.

ENDERSBY, N. M. et al. Is there genetic structure in populations of *Helicoverpa armigera* from Australia? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 122, p. 253–263, 2007.

HARTL, D.L. & CLARK, A.G. **Princípios de Genética De Populações - 4ª Edição - 2010.** 4.ed., Editora Artmeds., 2010, 542 p.

JALLOW, M. F.; PAUL CUNNINGHAM, J.; ZALUCKI, M. P. Intra-specific variation for host plant use in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): implications for management. **Crop Protection**, v. 23, n. 10, p. 955–964, out. 2004.

JI, Y.-J.; WU, Y.-C.; ZHANG, D.-X. Novel polymorphic microsatellite markers developed in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera□: Noctuidae). **Insect Science**, v. 12, p. 331–334, 2005.

JI, Y.-J.; ZHANG, D.-X. Characteristic of microsatellite DNA in lepidopteran genomes and implications for their isolation. **Acta Zoologica Sinica**, v. 50, n. 4, p. 608–614, 2004.

KRANTHI, S. et al. A PCR – RFLP tool for differentiating *Helicoverpa armigera* and *H. assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). **Current Science** n. 89, p. 1322-1323.

LEITE, N. A. et al. Demographics and Genetic Variability of the New World Bollworm (*Helicoverpa zea*) and the Old World Bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p.10 e113286, 2014.

MASTRANGELO, T. et al. Detection and Genetic Diversity of a Heliiothine Invader (Lepidoptera□: Noctuidae) From North and Northeast of Brazil. **Journal of economic entomology**, v. 107, n. 3, p. 970–980, 2014.

MICHENER, C.D.;SOKAL, R.R. A quantitative approach to a problem of classification. **Evolution**, v. 11, p. 490–499, 1957.

NEI, MF. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals . *Genetics*, Bethesda, v. 89, p. 583-590, 1978.

NIBOUCHE, S. et al. Allozyme polymorphism in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): comparison of African and European populations. **Heredity**, v. 80, n. 4, p. 438–445, 1998.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 2012.

QUEIROZ, P. R.; LIMA, L. H. C. Análise da variabilidade genética de populações de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

ocorrendo em culturas de algodão e tomate. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 8, n. 1, 2010.

QUEIROZ, P. R. M. et al. **Identificação molecular de *Helicoverpa armigera*: tecnologia a serviço dos cotonicultores de Mato Grosso**.

Primavera do Leste Instituto Mato-Grossense do Algodão, , 2013.

Disponível em:

<http://www.imamt.com.br/system/anexos/arquivos/201/original/circular_tecnica_edicao6_bx_1_.pdf?1384879618>. Acesso em: 21 jun. 2015.

RESENDE, D. C. et al. Adoção da área de refúgio e manejo de resistência de insetos. **Revista Política Agrícola**, v. 1, n. XXIII, p. 119–128, 2014.

RODERICK, G. K. Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. **Annual review of entomology**, v. 41, n. 149, p. 325–352, 1996.

SCOTT, K. D. et al. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae).

Molecular Ecology Notes, v. 4, p. 204–205, 2004.

SCOTT, K. D. et al. Assessing moth migration and population structuring in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) at the regional scale: example from the Darling Downs, Australia. **Journal of economic entomology**, v. 98, n. 6, p. 2210–2219, 2005.

SCOTT, K. D. et al. Gene-flow between populations of cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) is highly variable between years. **Bulletin of Entomological Research**, v. 95, n. 04, p. 381–392, 9 mar. 2007.

SCOTT, L. J. et al. Population dynamics and gene flow of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton and grain crops in the Murrumbidgee Valley, Australia. **Journal of economic entomology**, v. 99, n. 1, p. 155–163, 2006.

TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 510–21, jun. 2013.

TAN, S. J. et al. Isolation and characterization of DNA microsatellite from cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*, Hubner). **Molecular Ecology Notes**, v. 1, p. 243–244 ST – Isolation and characterization of DN, 2001.

TAY, W. T. et al. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.

WEEKS, A R. et al. Genetic variation among *Helicoverpa armigera* populations as assessed by microsatellites: a cautionary tale about accurate allele scoring. **Bulletin of entomological research**, v. 100, n. 4, p. 445–450, 2010.

ZHANG, D. X. Lepidopteran microsatellite DNA: Redundant but promising. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 19, n. 10, p. 507–509, 2004.

ANEXO I: Caracterização dos estádios fenológicos da soja Cultivar valente RR.

Estádio fenológico	DAS
VE	10
VC	15
V1	20
V2	25
V3	30
V4	35
V5	40
V6	45
V7	48
V8	51
V9	54
V10	57
V11	60
V12	63
V13	66
V14	69
V15/R1	72
R2	75
R3	92
R4	101
R5	110
R6	125
R7	143
R8	153

ANEXO II - Dados climáticos (médias anuais) dos municípios de Campos Novos e Chapecó

Local	T°C mínimas	T°C máximas	T°C médias	Umidade Relativa	Precipitação mm
Campos	14	32	20,8-	70% -74%	147,5- 191,2
Novos	10,8°C	32,4 °C	21,5°C		
Chapecó	8,3° 17,7°C	31,2 34°C	21,5- 24,1°C	68% -78%	129,5-210,5

ANEXO III - Identificação geográficas e datas de coletas das amostras de *Helicoverpa armigera*. As amostras foram utilizadas na análise PCR-RFLP e para locos microssatélites, para o último são excluídas as amostras que não se agrupam as regiões geográficas delimitadas.

Local	Latitude (hdd,dddd °)	Longitude (hdd,dddd °)	Data de Coleta
Água Doce	-26.81907	-51.51392	20/01/2014
Água Doce	-26.8183	-51.51503	20/03/2014
Bom Retiro	-27.82017	-49.53304	18/03/2014
Bom Retiro	-27.82017	-49.53304	18/03/2014
Bom Retiro	-27.82037	-49.53316	25/03/2014
Bom Retiro	-27.82037	-49.53316	26/03/2014
Bom Retiro	-27.82017	-49.53304	18/03/2014
Bom Retiro	-27.82037	-49.53316	23/01/2014
Bom Retiro	-27.82037	-49.53316	06/03/2014
Bom retiro	-27.82017	-49.53304	01/04/2014
Bom retiro	-27.82017	-49.53304	01/04/2014
Bom retiro	-27.82017	-49.53304	01/04/2014
Bom retiro	-27.82017	-49.53304	25/03/2014
Bom Retiro	-27.82037	-49.53316	25/03/2014
Bom Retiro	-27.82037	-49.53316	25/03/2014
Bom Retiro	-27.82037	-49.53316	18/03/2014
Bom Retiro	-27.82037	-49.53316	25/03/2014
Braço do Norte	-28.22878	-49.10396	25/03/2014
Caçador	-26,42317	-50,59972	28/01/2014
Caçador	NA	NA	24/03/2014
Caçador	NA	NA	24/03/2014
Campo Erê	-26.49163	-53.08910	11/02/2014
Campo Erê	-26.49163	-53.08910	11/02/2014
Campos Novos	-27.479491	-51.4404189	18/12/2013
Campos Novos	-27.38575	-51.05731	18/12/2013
Campos Novos	-27.479491	-51.4404189	18/12/2013
Campos Novos	-27.51664	-51.285763	10/01/2014
Campos Novos	-27.32638	-50.95556	13/02/2014
Campos Novos	-27.329707	-50.910057	21/02/2013
Campos Novos	-27.51664	-51.285763	13/02/2014

Campos Novos	-27.32638	-50.95556	12/03/2014
Campos Novos	-27.51664	-51.285763	06/02/2014
Campos Novos	-27.51664	-51.285763	06/02/2014
Campos Novos	-27.329707	-50.910057	21/02/2014
Campos Novos	-27.38575	-51.05731	13/02/2014
Campos Novos	-26.77967	-53.50588	21/02/2014
Campos Novos	-27.51664	-51.285763	13/02/2014
Campos Novos	-27.38575	-51.05731	21/02/2014
Campos Novos	-27.479491	-51.4404189	12/01/2014
Campos Novos	-27.513291	-51.284266	10/01/2014
Campos Novos	-27.513291	-51.284266	10/01/2014
Campos Novos	-27.3763	-51.06509	10/01/2014
Campos Novos	-27.3763	-51.06509	10/01/2014
Campos Novos	-27.3763	-51.06509	24/01/2014
Campos Novos	-27.3763	-51.06509	24/01/2014
Campos Novos	-27.32638	-50.95556	10/01/2014
Campos Novos	-27.51664	-51.285763	10/01/2014
Campos Novos	-27.32638	-50.95556	10/01/2014
Campos Novos	-27.38575	-51.05731	10/01/2014
Campos Novos	-27.38575	-51.05731	10/01/2014
Chapecó	-27.17911	-52.62983	18/03/2014
Chapecó	-27.17911	-52.62983	05/03/2014
Chapecó	-27.18014	-52.62852	18/03/2014
Chapecó	-27.17911	-52.62983	05/02/3014
Chapecó	-27.18014	-52.62852	28/02/2014
Chapecó	-27.03815	-52.78802	16/01/2014
Chapecó	-26.71602	-53.14919	07/02/2014
Chapecó	-27.03815	-52.78802	08/03/2014
Chapecó	-27.18014	-52.62852	10/02/2014
Chapecó	-27.03815	-52.78802	05/02/2014
Chapecó	-27.03815	-52.78802	05/02/2014
Chapecó	-26.90413	-52.80416	24/02/2014
Chapecó	-26.90413	-52.80416	05/02/2014
Chapecó	-27.03815	-52.78802	10/02/2014
Criciúma	NA	NA	05/02/2014
Criciúma	NA	NA	05/02/2014
Descanso		-53.52104	28/01/2014
	-26.43348		
Descanso		-53.49304	01/04/2014
	-26.84642		

Descanso	-26.77967	-53.50588	20/03/2014
Descanso	-26.77967	-53.50588	13/03/2014
Dionísio Cerqueira	-26.30504	-53.51027	06/02/2014
Dona Ema	-26.756200	-48.923970	20/01/2014
Galvão	-26.44718	-52.67056	20/03/2014
Galvão	-26.44718	-52.67056	20/03/2014
Içara	NA	NA	
Iporã do Oeste	NA	NA	20/03/2014
Iporã do Oeste	-26.98171	-53.47514	06/03/2014
Itajaí	-26.91595	-48.72329	
Jaguaruna	-28.65613	-49.01144	25/02/2014
Jupiaí	-26.40691	-52.71120	20/03/2014
Jupiaí	-26.40691	-52.71120	20/03/2014
Lages	-27.768044	-50.41711	23/01/2014
Lages	-28.078277	-50.574843	22/01/2014
Lages	-28.078277	-50.574843	22/01/2014
Nova Itaberaba	-26.90413	-52.80416	24/02/2014
Nova Veneza	-28.66807	-49.52384	22/01/2014
Otacílio Costa	-27.55859	-50.01059	24/01/2014
Otacílio Costa	-27.55859	-50.01059	24/01/2014
Otacílio Costa	-27.55859	-50.01059	24/01/2014
Palma Sola	-26.29853	-53.24598	04/04/2014
Palma Sola	-26.29853	-53.24598	04/04/2014
Papanduva	-26.33948	-50.20920	28/01/2014
Sto. Amaro da Imperatriz	-27,69136	-48,73796	06/05/2014
Tigrinhos	-26.7163	-53.1502	07/02/2014
Tigrinhos	-26.7163	-53.1502	21/01/2014
Tigrinhos	-26.7163	-53.1502	21/01/2014
Zortéa	-27.46863	-51.47599	15/01/2014
Zortéa	-27.46863	-51.47599	13/02/2014
Zortéa	-27.46863	-51.47599	13/02/2014
Zortéa	-27.46863	-51.47599	13/02/2014

*NA: não georreferenciada