

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

Bases para o manejo da resistência de *Bonagota salubricola* e *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) a inseticidas em pomares de macieira e pessegueiro

Oscar Arnaldo Batista Neto e Silva

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

**Piracicaba
2013**

Oscar Arnaldo Batista Neto e Silva
Tecnólogo em Produção de Grãos

**Bases para o manejo da resistência de *Bonagota salubricola* e *Grapholita molesta*
(Lepidoptera: Tortricidae) a inseticidas em pomares de macieira e pessegueiro**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

**Piracicaba
2013**

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

Silva, Oscar Arnaldo Batista Neto e

Bases para o manejo da resistência de *Bonagota salubricola* e *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) a inseticidas em pomares de macieira e pessegueiro / Oscar Arnaldo Batista Neto e Silva. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.

112 p: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Resistência de insetos a inseticidas 2. Manejo integrado de pragas 3. Fluxo gênico
I. Título

CDD 632.78
S586b

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

Aos meus avós Sebastiana Gentil Batista (*In memorian*) e Oscar Arnaldo Batista (*In memorian*), por tudo que representam para mim,

OFEREÇO

À minha mãe Clara Maria Claret, por seu amor incondicional e sabedoria, a quem devo tudo, com muita gratidão,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que tem me proporcionado.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia, pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Comitê Brasileiro de Ação a Resistência a Inseticidas (IRAC-BR) pelo envio de amostras de inseticidas e algumas populações de *Grapholita molesta*.

Ao Dr. Celso Omoto, professor do Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), pela confiança, oportunidade, apoio na realização deste trabalho, pela ótima convivência e amizade.

Ao Dr. Marcos Botton, pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Centro Nacional de Pesquisa Uva e Vinho (CNPUV), pelo auxílio no trabalho, ensinamentos, conselhos, oportunidades oferecidas, pelo exemplar profissionalismo e pela enorme contribuição para meu crescimento acadêmico-científico e humano.

À Dra. Karina Lucas Silva-Brandão pelo auxílio na parte de análise molecular, pelo incentivo e conhecimentos transmitidos.

Ao Dr. Fernando Luis Cònsoli pelos conhecimentos transmitidos e por viabilizar a realização de parte deste trabalho.

Aos grandes amigos Daniel Bernardi que muito ajudou na condução dos ensaios com *B. salubricola* e Felipe Antônio Domingues pela extraordinária ajuda nas análises estatísticas e interpretação dos dados moleculares.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia (ESALQ/USP), pelos auxílios e ensinamentos transmitidos.

A todos os amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Entomologia (ESALQ/USP), pelo agradável convívio e companheirismo.

A minha família que sempre me apoiou em todos os momentos oferecendo muito carinho, incentivo, apoio e servindo de estímulo para continuar nesta caminhada.

À minha namorada Renata Oliveira Alvarenga, pelo amor, convivência, por ter me incentivado e sempre me proporcionado grande ajuda.

Aos amigos e colegas que são ou foram do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas (ESAL/USP), Alex Sandro Poltronieri, Daniel Bernardi, Danielle Thomazoni, Dariane Segaseta de Oliveira Souza, Edgar Francisco Gaona Mena, Eloísa Salmerom, Everaldo Batista Alves, Felipe Antônio Domingues, José Bruno Malaquias, Juliano Ricardo Farias, Karina Cordeiro Albernaz, Nádia Fernanda Bertan Casarin, Pablo Fresia Coronel, Rebeca da Silva Ribeiro, Rodrigo José Sorgatto, Vitor Antônio Correa Pavinato, pelo apoio em todos os momentos que precisei, pelo companheirismo e também pelos divertidos encontros.

Aos técnicos do laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas (ESALQ/USP), Gislane Aparecida Amâncio de Oliveira Campos e Luis Ricardo Sesso, pelo convívio e auxílios prestados.

Aos estagiários do Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas (ESALQ/USP), Alexandre Donizeti Barbosa, Isabela Maganeti Dal Pozzo, Vitória Grisotto Valério, Guilherme Libardi Miraldo, Ricardo Ferraz Silveira, Vinícius Durrer, Renato, pela amizade e grande ajuda.

A Cristiane Müller, Cristiano Arioli e Dori Edson Nava, pelo apoio, atenção e conselhos entomológicos.

Aos amigos do Laboratório de Interação de Insetos da ESALQ/USP.

À assistente de pesquisa Vânia Sganzerla e aos estagiários e amigos do Laboratório de Entomologia da Embrapa Uva e Vinho, pelo apoio logístico, amizade e auxílio.

Ao pessoal que passou pela pousada dos estagiários da EMBRAPA Uva e Vinho, pelas conversas e agradável convívio.

Aos funcionários do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP e da EMBRAPA Uva e Vinho.

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

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
Referências	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Bioecologia de <i>Bonagota salubricola</i> e <i>Grapholita molesta</i>	21
2.1.1 Lagarta enroladeira – <i>B. salubricola</i>	21
2.1.2. Mariposa oriental – <i>G. molesta</i>	22
2.2. Fatores bioecológicos de <i>B. salubricola</i> e <i>G. molesta</i> e sua relação com a evolução da resistência a inseticidas	24
2.2.1 Potencial biótico	24
2.2.2 Refúgio	24
2.2.3 Dispersão	25
2.2.4 Comportamento de <i>B. salubricola</i> e <i>G. molesta</i>	26
2.3 Resistência de <i>B. salubricola</i> e <i>G. molesta</i> a inseticidas	26
2.4 Manejo da resistência de <i>B. salubricola</i> e <i>G. molesta</i> a inseticidas em macieira e pessegueiro	29
2.5 Marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites para avaliação da estruturação genética de lepidópteros-praga de macieira e pessegueiro	30
Referências	32
3 LINHAS-BÁSICAS E MONITORAMENTO DA SUSCETIBILIDADE DE <i>Bonagota salubricola</i> (Meyrick, 1937) e <i>Grapholita molesta</i> (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) A INSETICIDAS .	41
Resumo	41
Abstract	41
3.1 Introdução	42
3.2 Material e Métodos	43
3.2.1 Populações de <i>B. salubricola</i> e <i>G. molesta</i>	43
3.2.2 Caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade de <i>B. salubricola</i> e <i>G. molesta</i> a inseticidas	44
3.2.3 Monitoramento da suscetibilidade a inseticidas em populações de campo de <i>B. salubricola</i> e <i>G. molesta</i>	46
3.3 Resultados e Discussão	48
3.3.1 Linhas-básicas de suscetibilidade de <i>B. salubricola</i> e <i>G. molesta</i> a inseticidas	48
3.3.2 Monitoramento da suscetibilidade de <i>B. salubricola</i> e <i>G. molesta</i> a inseticidas	53

3.4 Conclusões.....	60
Referências	60
4 VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE <i>Grapholita molesta</i> (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) PROVENIENTES DE POMARES DE MAÇÃ E PÊSSEGO NO SUL DO BRASIL.....	65
Resumo	65
Abstract	65
4.1 Introdução.....	66
4.2 Material e Métodos.....	67
4.2.1 Coleta dos insetos e extração do DNA genômico	67
4.2.2 Amplificação e sequenciamento do mtDNA	70
4.2.3 Amplificação e genotipagem dos marcadores microssatélites	71
4.2.4 Estimativas de variabilidade genética com marcadores mitocondriais	75
4.2.5 Análise da genotipagem e estimativas de variabilidade genética com marcadores microssatélites	76
4.3 Resultados e Discussão.....	77
4.3.1 Medidas de variabilidade genética com marcadores mitocondriais	77
4.3.2 Medidas de variabilidade genética com marcadores microssatélites.....	86
4.3.3 Diversidade genética interpopulacional.....	93
4.3.4 Considerações da variabilidade genética de <i>G. molesta</i> com base nos marcadores mitocondriais e microssatélites	97
4.4 Conclusões.....	103
Referências	103
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	111

RESUMO

Bases para o manejo da resistência de *Bonagota salubricola* e *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) a inseticidas em pomares de macieira e pessegueiro

A lagarta-enroladeira *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) e a mariposa oriental *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) são duas das mais importantes pragas de frutíferas de clima temperado no Brasil. O manejo destes insetos-praga tem sido realizado quase que exclusivamente com inseticidas. Para a implementação de estratégias de manejo pró-ativo de resistência, é importante conhecer o estado atual de suscetibilidade destas espécies a inseticidas para detectar a resistência antes que se observem falhas no controle. Nas condições brasileiras, em regiões onde estes pomares são plantados próximos em algumas regiões, acredita-se que *G. molesta* disperse para a cultura da maçã após a colheita do pêssego, dependendo da proximidade espacial e temporal dos pomares. Portanto, este trabalho teve como objetivos, caracterizar a suscetibilidade de *B. salubricola* e *G. molesta* aos principais inseticidas recomendados para o controle e avaliar a estrutura genética de populações de *G. molesta* provenientes das culturas da macieira e pessegueiro no Brasil. A caracterização da suscetibilidade foi realizada com bioensaio de ingestão com tratamento superficial da dieta com inseticidas, utilizando-se lagartas neonatas provenientes de populações de *B. salubricola* coletadas em macieira no Estado do Rio Grande do Sul (safra 2011/12) e de *G. molesta* provenientes de pomares do Rio Grande do Sul (2010/11 e 2011/12), Santa Catarina (2010/11) e São Paulo (2010/11 e 2011/12). Não foram observadas diferenças na suscetibilidade de populações de campo de *B. salubricola* em relação à população suscetível de referência aos inseticidas chloantraniliprole, phosmet, spinetoram, spinosad e tebufenozide, assim como não foram detectadas diferenças na suscetibilidade de populações de *G. molesta* a chloantraniliprole, metaflumizone, novaluron, pyriproxyfen e spinetoram. Entretanto, foram verificadas diferenças significativas na sobrevivência de populações de *B. salubricola* ao novaluron (3,3% de sobrevivência) e de *G. molesta* aos inseticidas phosmet e tebufenozide, com 2,5 e 4,5% de sobrevivência, respectivamente. Portanto, a frequência de resistência de *B. salubricola* e *G. molesta* ainda é baixa aos inseticidas avaliados. Com base nos marcadores mitocondriais e microssatélites foi possível detectar estruturação genética significativa entre as populações de *G. molesta* que infestam as culturas da macieira e pessegueiro, com indicação de estruturação em função de hospedeiros ($\Phi_{ST} = 0,198$; $P < 0,05$) e da distância geográfica ($r=0,545$; valor de $p < 0,001$). Em geral, a variabilidade genética de *G. molesta* foi bem distribuída nas regiões produtoras de maçã e pêssego e as barreiras geográficas, as condições edafoclimáticas e o manejo da praga parecem estar limitando o acasalamento entre os indivíduos das populações distintas avaliadas. Portanto, devido ao baixo fluxo gênico entre as populações de *G. molesta*, as estratégias de manejo da resistência podem ser implementadas no âmbito local para essa praga.

Palavras-chave: Resistência de insetos a inseticidas; Manejo integrado de pragas; Fluxo gênico

ABSTRACT

Bases for resistance management of *Bonagota salubricola* and *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) to insecticides in apple and peach orchards

The apple leafroller *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) and Oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Busck, 1916) are two of the most important pests of temperate fruit trees in Brazil. Management of these both insect pest has been conducted almost exclusively with insecticides. For the implementation of proactive resistance management strategies, it is important to know the current status of pest susceptibility to insecticides to detect the resistance before control failures with the use of insecticides. In Brazilian conditions, where apple and peach orchards are very often planted close in some regions, it is believed that *G. molesta* may disperse to apple orchards after harvesting peaches, depending on the spatial and temporal proximity of orchards. Therefore, the objectives of this study were to characterize the susceptibility of *B. salubricola* and *G. molesta* to the main insecticides recommended for their control and to evaluate the genetic structure of *G. molesta* populations from the apple and peach orchards in Brazil. *B. salubricola* populations were collected in apple orchards in the State of Rio Grande do Sul (2011/12 growing season) and *G. molesta* populations from orchards in Rio Grande do Sul (2010/11 and 2011/12), Santa Catarina (2010/11) and São Paulo (2010/11 and 2011/12). There were no differences in the susceptibility among field populations of *B. salubricola* in compared to the susceptible reference population to the insecticides chlorantraniliprole, phosmet, spinetoram, spinosad and tebufenozide and among *G. molesta* populations to chlorantraniliprole, metaflumizone, pyriproxyfen and spinetoram. However, there were significant differences in survival of *B. salubricola* populations to novaluron (3.3% survival) and *G. molesta* populations to insecticides phosmet and tebufenozide, with 2.5 and 4.5% survival, respectively. Therefore, the frequency of resistance of *B. salubricola* and *G. molesta* is still low to insecticides evaluated herein. Based on mitochondrial and microsatellites markers, significant genetic structure among *G. molesta* populations was detected based on the host plant ($\Phi_{ST} = 0,198$; $P < 0,05$) and the geographic distance ($r=0,545$; valor de $p<0,001$). In general, the genetic variability of *G. molesta* is well distributed in the producing regions of apple and peach and the geographic barriers, soil and climatic conditions and pest management can be limiting the mating among individuals from distinct populations evaluated in this study. Therefore, due to low gene flow among *G. molesta* populations in Brazil, resistance management strategies can be implemented at local level.

Keywords: Insect resistance to insecticides; Integrated pest management; Gene flow

1 INTRODUÇÃO

A lagarta-enroladeira *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae) e a mariposa-oriental *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) são duas das mais importantes pragas da macieira no Brasil (KOVALESKI; RIBEIRO, 2003; BENTANCOURT et al., 2004; BOTTON et al., 2011). Além dos frutos, *B. salubricola* ataca as folhas (KOVALESKI et al., 1998). Os principais prejuízos causados por *B. salubricola* ocorrem quando as lagartas raspam a casca dos frutos, depreciando-os comercialmente (KOVALESKI; RIBEIRO, 2003; BENTANCOURT et al., 2004; KOVALESKI, 2004). Por outro lado, *G. molesta* além de atacar a macieira, também é uma importante praga na cultura do pessegueiro (BOTTON et al., 2011). Os danos provocados por *G. molesta* podem ser observados nas brotações do ano e nos frutos onde os prejuízos são mais importantes (ARIOLI, 2007).

O manejo de *B. salubricola* e *G. molesta* tem sido realizado principalmente com o emprego de inseticidas organofosforados, com destaque para chlorpyrifos e phosmet (GRÜTZMACHER et al., 1999; BOTTON.; NAKANO.; KOVALESKI, 2000a; KOVALESKI; RIBEIRO, 2002; ARIOLI; BOTTON; CARVALHO, 2004; SIQUEIRA; GRÜTZMACHER, 2005; ARIOLI et al., 2007a; BOTTON et al., 2009), embora recentemente o emprego da técnica de interrupção do acasalamento com feromônios sexuais e novos inseticidas (chlorantraniliprole, lufenuron, novaluron e spinetoram) tenham sido disponibilizados para o controle destas pragas no Brasil (BOTTON et al., 2005; ARIOLI, 2007; MONTEIRO; SOUZA; BELLI, 2008; PASTORI et al., 2012; BRASIL, 2013). Sendo assim, uma das preocupações tem sido a evolução da resistência com o uso frequente de inseticidas.

Até o momento, não foram detectados casos de resistência de *B. salubricola* a inseticidas, no entanto, para *G. molesta* a resistência a inseticidas organofosforados já foi documentada no Canadá (PREE et al., 1998), nos Estados Unidos (USMANI; SHEARER, 2001) e no Brasil (SIEGWART et al., 2011).

O conhecimento de fatores bioecológicos e operacionais é fundamental para a elaboração de programas de manejo da resistência (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977). *B. salubricola* possui vários hospedeiros alternativos, muitas vezes localizados no interior dos pomares de macieira, nas entrelinhas da cultura (ex: trevo, serralha e nabo), além de outras espécies cultivadas (ex: videira, pereira e ameixeira) (BENTANCOURT; SCATONI, 1995;

KOVALESKI et al., 1998), o que permite o inseto desenvolver várias gerações por ano (BOTTON; NAKANO; KOVALESKI, 2000b). No caso de *G. molesta*, não há registros no Brasil de plantas silvestres como hospedeiros alternativos (SALLES, 2001; POLTRONIERI; MONTEIRO; SCHUBER, 2008), além de apresentar várias gerações anuais nas culturas da macieira e do pessegueiro (LOECK; BERTOLDI; SALLES, 1991; SALLES, 1991; GRELLMANN et al., 1992; HICKEL et al., 2003; ARIOLI; CARVALHO; BOTTON, 2005). Nesse caso, estudos da estrutura e similaridade genética entre populações de *G. molesta* forneceriam informações relevantes, pois contribuiriam para a melhor compreensão da variabilidade genética entre populações, além de melhorar o conhecimento de dispersão e manejo fitossanitário. Portanto, a alta pressão de seleção com inseticidas, a ausência de áreas efetivas de refúgio e o ciclo biológico relativamente curto de *B. salubricola* e *G. molesta* contribuem para a rápida evolução da resistência a inseticidas.

Para a implementação de estratégias de manejo pró-ativo de resistência, é importante conhecer o estado atual de suscetibilidade das espécies aos inseticidas utilizados, permitindo que ao longo dos anos seja possível estimar a frequência de indivíduos resistentes antes que se observem falhas no controle, pois estratégias de manejo são eficientes quando a frequência de indivíduos resistentes ainda é baixa (ROUSH; MCKENZIE, 1987), garantindo assim a eficiência de controle e a preservação da vida útil dos inseticidas.

Portanto, este estudo teve como objetivo gerar informações básicas e aplicadas que permitam melhorar o manejo de *B. salubricola* e *G. molesta* nos pomares de macieira e pessegueiro em diferentes regiões produtoras. Foram realizados estudos de caracterização da suscetibilidade de *B. salubricola* e *G. molesta* aos principais inseticidas recomendados para o controle e a avaliação da estrutura genética de populações de *G. molesta* provenientes das culturas da macieira e pessegueiro com o uso de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites.

Referências

- ARIOLI, C.J. **Técnica de criação e controle de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) na cultura da macieira.** 2007. 83 p. Tese (Doutorado em Fitossanidade) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.
- ARIOLI, C.J.; BOTTON, M.; CARVALHO, G.A. Controle químico de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) na cultura do pessegueiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1695-1700, 2004.

ARIOLI, C.J.; CARVALHO, G.A.; BOTTON, M. Flutuação populacional de *Grapholita molesta* (Busck) com feromônio sexual na cultura do pessegueiro em Bento Gonçalves, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p. 1-5, 2005.

ARIOLI, C.; ZART, M.; GARCIA, M.; BOTTON, M. Avaliação de Inseticidas Neonicotinóides para o Controle da Mariposa-Oriental *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) em Laboratório e Pomar Comercial de Maçã com Infestações Artificiais. **Bioassay**, Piracicaba, v. 2, n. 11, p. 1-6, 2007a.

ARIOLI, C.J.; MOLINARI, F.; BOTTON, M.; GARCIA, M.S. **Técnica de criação de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) em laboratório utilizando dieta artificial para produção de insetos visando estudos de comportamento e controle.** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007b. 12 p. (Embrapa Uva e Vinho. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 13).

BENTANCOURT, C.M.; SCATONI, I.B. **Lepidópteros de importância económica, reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales.** Montevideo: Hemisferio Sur - Facultad de Agronomía, 1995. v. 1, 124 p.

BENTANCOURT, C.M.; SCATONI, I.B.; GONZALEZ, A.; FRANCO, J. Biology of *Bonagota cranaodes* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) on seven natural foods. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 299-306, 2004.

BOTTON, M.; ARIOLI, C.J.; RINGENBERG, R.; MORANDI-FILHO, W.J. Controle químico de *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae) em laboratório e pomar de macieira. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 2, p. 225-231, 2009.

BOTTON, M.; KULCHESKI, F.; COLLETTA, V.D.; ARIOLI, C.J.; PASTORI, P.L. Avaliação do uso do feromônio de confundimento no controle de *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) em pomares de pessegueiro. **Idesia**, Arica, v. 23, n. 1, p. 43-50, 2005.

BOTTON, M.; NAKANO, O.; KOVALESKI, A. Controle químico da lagarta-enroladeira *Bonagota cranaodes* (Meyrick) na cultura da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 11, p. 2139-2144, 2000a.

_____. Efeito do raleio de frutos sobre o dano de *Bonagota cranaodes* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae) em cultivares de macieira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 4, p. 717-719, 2000b.

BOTTON, M.; NAVA, D.E.; ARIOLI, C.J.; GRUTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S. **Bioecologia, monitoramento e controle da mariposa-oriental na cultura do pessegueiro no Rio Grande do Sul.** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2011. 11 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 86).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT 2013.** Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 03 fev. 2013.

GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Operational influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, p. 653-658, 1977.

GRELLMANN, E.O.; LOECK, A.E.; SALLES, L.A.B.; FACHINELLO, J.C. Necessidades térmicas e estimativa do número de gerações de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) em Pelotas, RS. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 7, p. 999-1004, 1992.

GRÜTZMACHER, A.D.; LOECK, A.E.; FACHINELLO, J.C.; GRÜTZMACHER, D.D.; GARCIA, M.S. Eficiência dos inseticidas fisiológicos Mimic 240 SC (Tebufenozide) e Intrepid 240 SC (Metoxifenoze) no controle da mariposa oriental *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) na cultura da pereira. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 5, n. 3, p. 211-215, 1999.

HICKEL, E.R.; HICKEL, G.R.; DE SOUZA, O.F.F.; VILELA, E.; MIRAMONTES, O. Dinâmica populacional da mariposa oriental em pomares de pessegueiro e ameixeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 3, p. 325-337, 2003.

KOVALESKI, A. Pragas. In: _____. (Ed.). **Maçã: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 10-33. (Frutas do Brasil, 38).

KOVALESKI, A.; RIBEIRO, L.G. **Manejo de pragas na produção integrada de maçãs**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2002. 8p. (Circular Técnica, 34).

_____. Manejo de pragas na produção integrada de maçã. In: PROTAS, J.F.S.; SANHUEZA, V.R.M. (Ed.). **Produção integrada de frutas: o caso da maçã no Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p. 61-68.

KOVALESKI, A.; BOTTON, M.; EIRAS, A.E.; VILELA, E. **Lagarta-enroladeira da macieira *Bonagota cranaodes* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae): bioecologia, monitoramento e controle**. Bento Gonçalves: EMBRAPA, CNPUV, 1998. 16 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 24).

LOECK, A.E.; BERTOLDI, L.H.M.; SALLES, L.A.B. de. Dinâmica populacional e estimativa do número de gerações de *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) na região de Pelotas, RS. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 1, n. 20, p. 183-192, 1991.

MEYRICK, E. *Phtheochroa cranaodes*. **Exotic Microlepidoptera**, London, v.5, p. 149-150, 1937.

MONTEIRO, L.B.; SOUZA, A. de; BELLI, L. Confusão sexual para o controle de *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae), em pomares de macieira, em Fraiburgo (SC), Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 191-196, 2008.

PASTORI, P.L.; ARIOLI, C.J.; BOTTON, M.; MONTEIRO, L.B.; STOLTMAN, L.; MAFRA NETO, A. Integrated control of two tortricid (Lepidoptera) pests in apple orchards with sex pheromones and insecticides. **Revista Colombiana de Entomologia**, Bogotá, v. 38, p. 224-230, 2012.

POLTRONIERI, A.S.; MONTEIRO, L.B.; SCHUBER, J.M. Prospecção da diapausa da mariposa-oriental no período de dormência do pessegueiro. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 67-72, 2008.

PREE, D.J.; WHITTY, K.J.; Van DRIEL, L.; WALKER, G.M. Resistance to insecticides in oriental fruit moth populations (*Grapholita molesta*) from the Niagara peninsula of Ontario. **The Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 130, n. 3, p. 245-256, 1998.

ROUSH, R.T.; McKENZIE, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 32, p. 361-380, 1987.

SALLES, L.A.B. **Grafolita (*Grapholita molesta*): bioecologia e controle**. Pelotas: Embrapa, CNPF, 1991. 13 p. (Documentos, 42).

SALLES, L.A.B. Mariposa-oriental, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). In: VILELA, E.F.; ZUCCHI, R.A.; CANTOR, F. (Ed.). **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 42-45.

SIEGWART, M.; MONTEIRO, L.B.; MAUGIN, S.; OLIVARES, J.; MALFITANO-CARVALHO, S.; SAUPHANOR, B. Tools for resistance monitoring in oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) and first assessment in Brazilian populations. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 104, n. 2, p. 636-645, 2011.

SIQUEIRA, P.R.E.; GRÜTZMACHER, A.D. Avaliação de inseticidas para controle da *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) em pomares de pessegueiro sob produção integrada na região da campanha do RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 2, p. 185-191, 2005.

USMANI, K.A.; SHEARER, P.W. Susceptibility of male oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) populations from New Jersey apple orchards to azinphosmethyl. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 94, n. 1, p. 233-239, 2001.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bioecologia de *Bonagota salubricola* e *Grapholita molesta*

2.1.1 Lagarta enroladeira – *B. salubricola*

A lagarta-enroladeira *B. salubricola* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae) é considerada uma das principais pragas da cultura da macieira no Sul do Brasil (BENTANCOURT; SCATONI, 1995). A espécie é nativa da América do Sul, sendo encontrada também na Argentina e Uruguai (NUÑEZ; BENTANCOURT; SCATONI et al., 2006). Trata-se de uma espécie de importância quarentenária, visto que a mesma não ocorre nos principais países importadores de maçã da América do Sul.

Apesar de *B. salubricola* ser um inseto polífono atacando ameixeira, pereira e videira (BENTANCOURT; SCATONI, 1995), assim como algumas plantas daninhas, como hortênsia, nabo, serralha e trevo (BENTANCOURT; SCATONI, 1995), na região Sul do Brasil tem sido importante principalmente na cultura da macieira (KOVALESKI; RIBEIRO, 2003; BENTANCOURT et al., 2004), provocando injúrias nas folhas e frutos. Os principais prejuízos causados por *B. salubricola* ocorrem quando as lagartas raspam a casca dos frutos, depreciando-os comercialmente podendo ocorrer perdas econômicas de 3% a 5% na produção (BOTTON; NAKANO; KOVALESKI, 2000a; KOVALESKI, 2004). *B. salubricola* pode ser encontrada durante todo ano, mesmo nos meses mais frios, quando se observa lagartas na vegetação de cobertura presente nos pomares, frutos mumificados e nas folhas que ficaram presas às plantas de macieira (BOTTON; NAKANO; KOVALESKI, 2000b).

Com base nas exigências térmicas, Botton; Nakano e Kovaleski (2000) concluíram que *B. salubricola* completa de três a quatro gerações anuais nas principais regiões produtoras do Rio Grande do Sul (Vacaria-RS) e Santa Catarina (São Joaquim-SC e Fraiburgo-SC), sendo que uma geração se desenvolve durante o inverno.

B. salubricola apresenta elevado potencial reprodutivo, sendo que cada fêmea pode depositar até 200 ovos, colocados em massa (em média 40 ovos por postura), sempre na face adaxial das folhas de macieira e de plantas hospedeiras alternativas, não sendo observadas posturas em frutos (KOVALESKI et al., 1998; BOTTON; NAKANO; KOVALESKI, 2000b; BENTANCOURT et al., 2004). Imediatamente após a eclosão, as lagartas se alojam na face abaxial das folhas, onde se alimentam e constroem abrigos juntando folhas, fixando-as aos

frutos e/ou abrigando-se entre estes, até atingir a fase de pupa (KOVALESKI; RIBEIRO, 2003). A presença de uma lagarta em frutos agrupados pode resultar no dano de todas as maçãs, aumentando o número de frutos danificados no pomar (BOTTON; NAKANO; KOVALESKI, 2000b).

O número de ínstares larvais de *B. salubricola* pode variar de cinco (EIRAS et al., 1994; PARRA et al., 1995) a sete (BENTANCOURT et al., 2004), dependendo do hospedeiro em que o inseto se desenvolve. A duração do desenvolvimento larval também varia conforme a dieta. De acordo com Bentancourt et al. (2004), na temperatura de 23°C as lagartas que se alimentam de folhas de macieira apresentam menor duração larval (aproximadamente 26 dias) do que as que se desenvolvem em frutos de maçã (em média 41,7 dias). Esta diferença interfere na duração do ciclo de ovo até a emergência de adultos que pode ser de 41 dias para insetos que se desenvolvem sobre folhas de macieira a 60 dias em frutos de maçã (BENTANCOURT et al., 2004). Em dieta artificial, a duração de uma geração é em torno de 39 dias a 26°C (PARRA et al., 1995).

2.1.2. Mariposa oriental – *G. molesta*

Grapholita molesta (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) é uma praga polífaga que ataca frutíferas da família Rosaceae, destacando-se o pessegueiro, a macieira, a pereira, a ameixeira e o marmeleiro (MONTEIRO; HICKEL, 2004; ARIOLI, 2007; BOTTON et al., 2011). Atualmente, esta praga está distribuída em diversas regiões do mundo. No Brasil, ocorre em toda a região Centro-Sul, sendo sua presença documentada em Minas Gerais (SOUZA; SANTA-CECILIA; SOUSA, 2000), São Paulo, Paraná (POLTRONIERI et al., 2008; POLTRONIERI; MONTEIRO; SCHUBER, 2008), Santa Catarina (REIS FILHO; NORA; MELZER, 1988) e Rio Grande do Sul (BOTTON et al., 2011), cujo ataque do inseto causa significativa redução na produção (BOTTON et al., 2003; MONTEIRO; HICKEL, 2004; ARIOLI, 2007).

Na macieira, o dano provocado por *G. molesta* ocorre tanto em brotações do ano como nos frutos (BOTTON et al., 2011). As lagartas, ao atacarem as brotações, afetam a arquitetura das plantas novas e, estando estas em produção, comprometem a formação das gemas floríferas, sendo comum uma lagarta atacar até sete brotações de uma planta (ARIOLI, 2007). Em frutos, o ataque ocorre preferencialmente próximo ao pedúnculo ou ao cálice, sendo que a lagarta penetra e destrói a polpa junto à região carpelar. Os frutos atacados apresentam

galerias internas e são totalmente depreciados para o comércio “in natura” (NORA; HICKEL, 2002; BOTTON et al., 2003).

No pessegueiro, *G. molesta* também ataca brotações e frutos (BOTTON et al., 2003). Entretanto, os danos de maior importância econômica ocorrem nos frutos. No interior do fruto as lagartas formam galerias em direção ao caroço, liberando os excrementos na superfície, tornando-os imprestáveis para o comércio (SALLES, 2001). Um prejuízo adicional do ataque da mariposa oriental é o dano indireto resultante da abertura de entrada para a podridão parda causada pelo fungo *Monilinia fructicola* (Wint), que eleva as perdas durante a fase de amadurecimento dos frutos nos pomares e ainda durante o armazenamento (BOTTON et al., 2003).

A duração da fase larval é variável em função da temperatura (GRELLMANN et al., 1991) e da planta hospedeira a qual a lagarta se desenvolveu (SILVA, 2008; ARIOLI et al., 2010). Há relação direta entre a temperatura e o número de dias para completar o ciclo, sendo que quanto maior a temperatura, menor o número de dias necessários (GRELLMANN et al., 1991). O período larval varia de 11 a 15 dias, em temperatura constante de 25°C em laboratório (SILVA, 2008).

As lagartas de *G. molesta* passam por cinco ínstares e chegam ao último medindo entre 10 e 14 mm de comprimento (SALLES, 1991). Durante o quinto ínstar, no Estado do Rio Grande do Sul, o inseto pode entrar em diapausa, sendo induzida principalmente pelo fotoperíodo curto (12 horas) associado a baixas temperaturas (DICKSON, 1949; SILVA, 2008; SAUSEN et al., 2011). Nesta fase, as lagartas encerram-se em casulo em locais protegidos, principalmente no tronco das árvores ou no solo (BOBADILLA, 1972). O processo auxilia o inseto a sincronizar a sua biologia com a disponibilidade de recursos para alimentação e reprodução.

Após a fase de diapausa, as lagartas transformam-se em pupas (5-7 mm), ficando geralmente em fendas da casca, na região da base do pedúnculo do fruto, no tronco ou no solo sob a projeção da copa (SALLES, 2001). O adulto apresenta asas de cor cinza escura e medem entre 12 a 15 mm de envergadura. O inseto adulto possui hábito crepuscular com atividades de dispersão, alimentação, acasalamento e postura entre 17 e 22 horas (SALLES, 2001), apresentando longevidade média de 15 a 22 dias (SILVA, 2008). O comportamento de oviposição (local de postura e fecundidade) de *G. molesta* pode ser alterado em função do cultivar de maçã (MYERS; HULL; KRAWCZYK, 2006; SILVA, 2008). Os ovos (de 0,7 a 0,9 mm de diâmetro) são colocados isoladamente, geralmente na face inferior das folhas

novas, em brotações e também nos frutos (MYERS; HULL; KRAWCZYK, 2006). Cada fêmea pode ovipositar de 110 a 202 ovos, conforme o hospedeiro larval em que se desenvolve (SILVA, 2008).

2.2. Fatores bioecológicos de *B. salubricola* e *G. molesta* e sua relação com a evolução da resistência a inseticidas

O conhecimento dos fatores que afetam a evolução da resistência permite a elaboração de estratégias de manejo para prevenir, retardar ou reverter a evolução da resistência a inseticidas (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977a, 1977b; ROUSH; McKENZIE, 1987).

2.2.1 Potencial biótico

O número de gerações anuais está diretamente ligado ao crescimento populacional e, conseqüentemente, a necessidade de controle da praga. Quanto maior o número de gerações do inseto durante o ano, maior é a interferência na velocidade de evolução da resistência. *G. molesta* apresenta de 4-7 gerações anuais enquanto que *B. salubricola* completa de 3-4 gerações (BOTTON; NAKANO; KOVALESKI, 2000b).

Para *G. molesta*, o tempo necessário para completar uma geração foi estimado em 23,9 dias e a taxa líquida de reprodução (R_0) foi de 26,4 indicando que *G. molesta* aumenta em média 26,4 vezes a cada geração (SILVA et al., 2010). Para a espécie *B. salubricola* não foram encontradas informações sobre o potencial biótico na literatura.

2.2.2 Refúgio

A presença/ausência de áreas de refúgio ou hospedeiros alternativos é um fator decisivo para a manutenção de indivíduos suscetíveis, sendo sua presença altamente desejável no manejo da resistência de insetos a qualquer tática de controle.

G. molesta se alimenta somente de plantas da família Rosaceae, principalmente macieira e pessegueiro (POLTRONIERI, 2008; BOTTON et al., 2011), enquanto que *B. salubricola* utiliza outras plantas como fonte de alimentação (BENTANCOURT; SCATONI, 1995; KOVALESKI et al., 1998). Esta característica evidencia maior risco de evolução de resistência a inseticidas por *G. molesta* em comparação a *B. salubricola*, visto que esta última

teria chances de escapar de aplicações de inseticidas, enquanto se alimenta em hospedeiros alternativos, o que preservaria indivíduos suscetíveis. Além disso, uma geração de *B. salubricola* ocorre nestes hospedeiros alternativos durante o inverno (quando não há aplicação de inseticidas), enquanto que *G. molesta* entra em diapausa na fase larval (REIS FILHO; NORA; MELZER, 1988; POLTRONIERI; MONTEIRO; SCHUBER, 2008).

Esta característica de polifagia pode colaborar para o retardamento da evolução da resistência devido à imigração de indivíduos suscetíveis provenientes de áreas com hospedeiros alternativos (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977a), proporcionando a diluição da resistência pela reintrodução de alelos que conferem a suscetibilidade.

A polifagia é uma característica que pode colaborar com a dinâmica populacional e condição de praga, uma vez que, as populações podem desenvolver-se simultaneamente em diferentes plantas hospedeiras dentro de uma região, ou podem persistir no ambiente em baixa densidade populacional até a fêmea encontrar um hospedeiro capaz de sustentar o desenvolvimento das lagartas.

2.2.3 Dispersão

A dispersão e a migração tem grande impacto na evolução da resistência, pois os movimentos locais dentro da cultura e entre hospedeiros são importantes na dinâmica sazonal destas pragas, especialmente, nos mais diversos sistemas de cultivo onde os locais de alimentação e de oviposição podem estar permanentemente disponíveis para a espécie *B. salubricola* por meio de hospedeiros alternativos.

A capacidade de voo de *G. molesta* é pequena, em média de 141 m para machos e de 160 m de distância para fêmeas (YETTER; STEINER, 1932). De acordo com Ellis e Hull (2013), em teste de marcação, liberação e recaptura, 90-95% das mariposas *G. molesta* são recapturados em menos de 400 m dos pontos de liberação, independente da cultura. Mas de acordo com Gonzalez (2003), a dispersão pode chegar a 1-2 Km, permitindo ocorrer uma movimentação entre pomares (HUGHES; DORN, 2002; HUGHES; HERN; DORN 2004). Esta possibilidade permite que genes que conferem resistência possam ser introduzidos em diferentes populações devido à dispersão de *G. molesta*.

Para a espécie *B. salubricola* não existem informações sobre a mobilidade de adultos, tornando desejáveis estudos para se estimar o tamanho efetivo da população, fluxo gênico, entre outros parâmetros biológicos importantes. O conhecimento da existência de eventos

migratórios é de extrema importância ao manejo de resistência de insetos a inseticidas, pois populações sedentárias ou que tenham uma taxa reduzida de imigrantes suscetíveis têm maior potencial de evolução de resistência.

2.2.4 Comportamento de *B. salubricola* e *G. molesta*

O comportamento de alimentação de *B. salubricola* e *G. molesta* dificulta o controle químico, pois ficam protegidas no interior da folhagem ou entre frutos (KOVALESKI et al. 1998) ou no interior dos ramos ou frutos (BOTTON et al., 2011). Estes hábitos aumentam a dificuldade de se atingir o inseto durante a pulverização de inseticidas. Por este motivo, mesmo com o surgimento de novas moléculas inseticidas, os organofosforados ainda são bastante utilizados (KOVALESKI, 2004; BOTTON et al., 2009), devido, principalmente, a sua eficiência e baixo custo. Estes inseticidas, na maioria das vezes, apresentam uma ação de profundidade capaz de intoxicar o inseto mesmo dentro do fruto ou no ponteiro. Devido à dificuldade de atingir o inseto muitas vezes são necessárias pulverizações sequenciais de inseticidas para obter um controle satisfatório o que aumenta a pressão de seleção para a resistência.

Em função da alta capacidade reprodutiva, o intervalo entre gerações relativamente curto e o hábito alimentar polífago, *B. salubricola* e *G. molesta* estão expostas a repetidas pressões de seleção com inseticidas, propiciando um cenário favorável para seleção de indivíduos resistentes.

2.3 Resistência de *B. salubricola* e *G. molesta* a inseticidas

A resistência a inseticidas é definida como a habilidade de uma linhagem de um organismo em tolerar doses de tóxicos que seriam letais para a maioria da população da mesma espécie (GEORGHIOU, 1972), ou seja, a aplicação constante de um mesmo produto químico (inseticida) aumenta a frequência de alguns indivíduos resistentes (pré-adaptados) presentes na população por mecanismos de resistência bioquímica, fisiológica e/ou comportamental.

No Brasil, estudos de detecção de populações de *B. salubricola* resistentes a inseticidas ainda não foram realizados. No entanto, estes estudos já foram iniciados para *G.*

molesta, sendo detectada resistência ao chlorpyrios na região de Vacaria-RS e Lages-SC (SIEGWART et al., 2011).

Em outros países, foram reportados registros de *G. molesta* resistentes a inseticidas em pomares de pessegueiros localizados no Distrito de Ontário (Canadá) (PREE et al., 1998) e em pomares de macieira em New Jersey (EUA) a azinphosmethyl (USMANI; SHEARER, 2001), fato que tem levado pesquisadores a desenvolver estudos referentes à resistência do inseto a organofosforados, piretroides e carbamatos (KANGA et al., 1999), bem como a elucidação dos mecanismos de resistência envolvidos (KANGA et al., 1997, 2001).

Os principais mecanismos de resistência de insetos a inseticidas podem ser divididos em bioquímicos, fisiológicos ou comportamentais (GEORGHIU, 1972). Dentre estes podem ser citados a destoxificação ou metabolização do inseticida por enzimas (HEMINGWAY, 2000); a redução da penetração do inseticida pela cutícula do inseto (KANGA et al., 1997); a redução ou insensibilidade do sítio de ação do inseticida (KANGA et al., 1997) e a resistência comportamental, a qual o inseto resistente detecta a presença de inseticida e evita o contato com o produto (SARFAZ; DOSDALL; KEDDIE, 2005; COOPERBAND; ALLAN, 2009).

Várias enzimas e sistemas enzimáticos estão envolvidos na resistência metabólica, como a glutathione-S-transferase (GSTs), oxidases de função mista (OFMs) e carboxilesterases (ESTs), entre outras enzimas, que aumentam sua eficiência ou quantidade nas linhagens resistentes (HEMINGWAY, 2000).

O mecanismo de resistência bioquímico de *G. molesta* a inseticidas organofosforados e carbamatos foram estudados por Kanga et al. (1997), nas fases larval e adulta. Os autores afirmaram que a destoxificação por esterases em ambas as fases do inseto (lagartas e adultos) é um dos principais fatores de resistência da mariposa oriental aos inseticidas avaliados, enquanto que as medições das atividades de glutathione-S-transferase e oxidases de função mista não demonstraram envolvimento com a resistência. A destoxificação por esterases também foi apontada por Usmani e Shearer (2001) e Pree et al. (2005) como mecanismo de resistência de *G. molesta* a organofosforados.

No Brasil, Siegwart et al. (2011) realizaram testes bioquímicos avaliando a atividade dos principais sistemas envolvidos na desintoxicação de inseticidas em insetos. Os autores concluíram que uma população de *G. molesta* resistente a clorpirifós apresentou aumento significativo da atividade de oxidase de função mista, em relação à linhagem suscetível de referência.

Outro importante mecanismo de resistência detectado em populações de *G. molesta* resistentes a carbofuran e carbaril foi a redução de sensibilidade do sítio de ação (KANGA et al., 1997). A redução de penetração de carbofuran pela cutícula do inseto também foi sugerida como mecanismo de resistência de *G. molesta* a organofosforados (KANGA et al., 1997), o que pode potencializar a resistência proporcionada pelos outros mecanismos.

Portanto, dos quatro principais mecanismos de resistência a inseticidas, apenas o mecanismo de resistência comportamental ainda não foi comprovado para *G. molesta*. Vale ressaltar que este mecanismo é o mais difícil de ser validado experimentalmente e por isto só foi comprovado para poucas espécies de insetos (SARFAZ; DOSDALL; KEDDIE, 2005; COOPERBAND; ALLAN, 2009).

Para a detecção, monitoramento e manejo eficiente da resistência de insetos a inseticidas, um dos passos fundamentais tem sido a definição do método de bioensaio. Nesse sentido, diversas técnicas estão disponíveis para estimar as linhas-básicas de suscetibilidade de lepidópteros-praga a inseticidas (KANGA et al., 1997, 2003; PREE et al., 2005; MAGALHÃES, 2011; SIEGWART et al., 2011).

Para *B. salubricola*, os bioensaios para estimar as linhas-básicas de suscetibilidade da praga são todos de ingestão com o tratamento superficial da dieta artificial (BERNARDI et al., 2011; PEREIRA, 2012). Vale ressaltar que os trabalhos descritos não tinham o propósito de monitorar a suscetibilidade da praga. Ademais, nenhum dos trabalhos foi feito com inseticidas químicos, sendo estes realizados com bactérias entomopatogênicas à base de *Bacillus* (PEREIRA, 2012) e um inseticida à base de nim (azadiractina) (BERNARDI et al., 2011).

No caso de *G. molesta*, as técnicas de bioensaio mais utilizadas para caracterizar a linha-básica e monitorar a suscetibilidade tem sido conduzidas nas fases larval e/ou adulta. Para a fase larval, o bioensaio de ingestão tem sido bastante utilizado, mediante o tratamento da superfície da dieta artificial com inseticidas (MAGALHÃES, 2011; SIEGWART et al., 2011), ou a incorporação do inseticida na dieta (BORCHERT; WALGENBACH; KENNEDY, 2005; JONES, 2010). Há também trabalhos conduzidos com a aplicação tópica do inseticida sobre lagartas de *G. molesta* utilizando-se de um microaplicador (USMANI; SHEARER, 2001) ou torre de Potter (PREE et al., 2005).

Na fase adulta, os métodos mais utilizados são o de contato com superfícies tratadas (KANGA et al., 1997, 2003; PREE et al., 2005) e a de aplicação tópica com microaplicador (USMANI; SHEARER, 2001; JONES, 2010; MAGALHÃES, 2011) ou de pulverização com

torre de Potter (PREE et al., 1998). Em função dos mecanismos de resistência de *G. molesta* (destoxificação por esterases e a insensibilidade do sítio de ação) serem expressos durante a fase larval e adulta, Kanga et al. (1997) sugeriram que bioensaios para o monitoramento da resistência de *G. molesta* a organofosforados e carbamatos sejam realizados com os adultos capturados no campo com armadilha adesiva contendo feromônio sexual, em função da facilidade de obtenção de insetos, em comparação com bioensaio na fase larval.

Entre as consequências do estabelecimento da resistência de *B. salubricola* e *G. molesta* a inseticidas estão as pulverizações mais frequentes, o aumento da dose do produto utilizado e a substituição do produto por outro inseticida, geralmente mais tóxico ou mais caro (GEORGHIOU, 1983). Portanto, a resistência de *B. salubricola* e *G. molesta* a inseticidas compromete diretamente os princípios do MIP, devido a maior contaminação do meio ambiente por defensivos agrícolas, a destruição de inimigos naturais e a elevação dos custos para o controle da praga (GEORGHIOU, 1983).

2.4 Manejo da resistência de *B. salubricola* e *G. molesta* a inseticidas em macieira e pessegueiro

As estratégias para o manejo da resistência a inseticidas têm sido divididas em três grupos principais: manejo por moderação, por saturação ou por ataque múltiplo (GEORGHIOU, 1983). O manejo por moderação tem por objetivo reduzir a pressão de seleção com a redução no número de aplicações de inseticidas, pulverizações localizadas, utilização de inseticidas mais seletivos a inimigos naturais, aplicação do inseticida no estágio da praga que seja mais vulnerável ao controle e a manutenção de áreas não tratadas para servirem de refúgio aos indivíduos suscetíveis. Por sua vez, o manejo por saturação tem o objetivo de diminuir o custo adaptativo dos indivíduos resistentes na presença da pressão de seleção (inseticida) por meio do uso de substâncias que atuem como sinergistas ou pelo uso de altas doses dos produtos (ROUSH; TABASHNIK, 1990).

A estratégia por ataque múltiplo preconiza a utilização de dois ou mais inseticidas em rotação ou em mistura e exige que os produtos utilizados apresentem modos de ação distintos e não possuam resistência cruzada (ROUSH, 1989). O princípio da mistura de inseticidas é que os indivíduos resistentes a um determinado produto A serão controlados pelo produto B e vice-versa; e que a resistência a cada composto é independente e inicialmente baixa, portanto, a ocorrência de indivíduos resistentes aos dois produtos será extremamente rara

(GEORGHIOU, 1983). O princípio básico da rotação de inseticidas é baseado no princípio de que a frequência de indivíduos resistentes a um inseticida tende a declinar durante a aplicação de outros produtos alternadamente (GEORGHIOU, 1983).

Considerando as estratégias de manejo de resistência, a rotação e a mistura de produtos químicos têm sido muito exploradas e com excelentes resultados para diversas pragas, inclusive para *G. molesta* (KANGA et al., 2003). Estudos de estabilidade de resistência de *G. molesta* a inseticidas em pessegueiro foram conduzidos por Kanga et al. (2003), estabelecendo-se quatro tratamentos para manejar a resistência, sendo as mudanças na suscetibilidade de cada população monitoradas entre os anos de 1996-1999. A frequência de resistência de *G. molesta* a organofosforados, reduziu de 55 para 14% e para piretroides, diminuiu de 30 para 10%, com rotação de inseticidas consistindo do tratamento endossulfan – piretroide – organofosforado. Os dados indicaram que a resistência em geral, foi instável. Portanto, verificou-se que a estratégia baseada na rotação de inseticidas por grupo químico para cada geração de *G. molesta* garantiu sucesso no manejo de resistência tanto para piretroides quanto para organofosforados.

Outra possibilidade tem sido a utilização da disrupção do acasalamento para o controle de *B. salubricola* e *G. molesta*, e a utilização do controle biológico natural ou clássico (NAVA, 2008; PASTORI et al., 2008; RODRIGUES et al., 2011), os quais podem contribuir para a redução da pressão de seleção exercida por inseticidas e conseqüentemente, colaborando para o restabelecimento da suscetibilidade a inseticidas nestas espécies.

2.5 Marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites para avaliação da estruturação genética de lepidópteros-praga de macieira e pessegueiro

A estruturação genética refere-se à distribuição da variabilidade entre e dentro de populações e subpopulações naturais, onde os alelos e os genótipos ocorrem de maneira heterogênea no espaço e no tempo (HAMRICK, 1982; FUTUYMA, 1992). O conhecimento desta variabilidade genética da espécie de inseto-praga, a qual se pretende manejar, fornece informações relevantes quanto ao refinamento das estratégias de manejo (DENHOLM; ROWLAND, 1992; MILLER et al., 2003).

Para quantificar esta variabilidade genética entre e dentro das populações do inseto-praga, o uso de marcadores moleculares tem se revelado uma ferramenta eficiente e, também, bastante acessível. A escolha da técnica e do marcador a serem utilizados depende do

problema a ser analisado e dos recursos disponíveis para a realização do trabalho (SUNNUCKS, 2000; SOLFERINI; SELIVON, 2001). Marcadores moleculares baseados na amplificação de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) por reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) têm sido frequentemente utilizados em estudos sobre a diversidade e a estrutura genética populacional de insetos-praga (CHAPUIS et al., 2005; ALBERNAZ et al., 2012; DOMINGUES et al., 2012). Vários são os marcadores moleculares usados em estudos de variabilidade genética e fluxo gênico, entre eles destacam-se os marcadores mitocondriais e microssatélites (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998; TORRIANI et al., 2010; ALBERNAZ et al., 2012; DOMINGUES et al., 2012).

Os marcadores mitocondriais, desde a década 70, têm sido um dos marcadores mais utilizados em estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas, fluxo gênico, filogeografia, eventos de especiação e outros aspectos biológicos e evolutivos em diversos grupos de animais, vegetais entre outros reinos (AVISE, 2000), demonstrando sua praticidade. O fato da molécula de mtDNA apresentar uma alta taxa de evolução, ser circular, pequena e de estrutura gênica simples faz com que ela seja muito utilizada em estudos de caráter evolutivo e filogenético (ARIAS; FRANCISCO; SILVESTRE, 2003). O genoma mitocondrial de *G. molesta* está completamente sequenciado (GONG et al., 2012) e esta informação auxiliará bastante no estudo da variabilidade genética desta espécie.

Os marcadores microssatélites, também conhecidos como STR (*Short Tandem Repeats*) ou SSR (*Simple Sequence Repeats*) são sequências de um a seis nucleotídeos, repetidas em “tandem”, altamente polimórficas, codominantes e flanqueadas por regiões conservadas e não repetidas de DNA (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). As mutações que ocorrem nos microssatélites são mudanças no número de repetições, causadas por erros no momento da replicação e/ou crossing-over desigual. Estes erros são responsáveis pela adição ou deleção de repetições que conferem o caráter altamente polimórfico destes locos. Trata-se de um poderoso marcador molecular para descrever a estrutura genética das populações, fluxo gênico e estimar parâmetros genéticos populacionais (HARPER; MACLEAN; GOULSON, 2003; ALBERNAZ et al., 2012; DOMINGUES et al., 2012).

A principal desvantagem no uso de marcadores microssatélites, em comparação ao mitocondrial reside no custo e tempo requerido para desenvolver *primers* específicos para cada loco. Contudo, esta desvantagem tem diminuído com o passar dos anos, pois tem sido observado que ocorre conservação de sítios microssatélites e sequências flanqueadoras entre espécies relacionadas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). Portanto, é possível utilizar

primers, denominados heterólogos, que foram desenvolvidos para outra espécie do gênero ou *primers* “desenhados” para a mesma espécie e previamente publicados na literatura.

Em hipótese, a troca de genes ocorre com maior probabilidade entre populações próximas geograficamente do que entre populações mais distantes. Em grande escala, o fluxo gênico pode determinar a possibilidade dos genes de resistência espalhar ao longo da área de distribuição geográfica da espécie, influenciando a velocidade de evolução da resistência do inseto a inseticidas. Portanto, o estudo da estrutura genética das populações é um componente importante de programas de manejo e controle de pragas, pois podem fornecer informações sobre níveis de variabilidade genética, graus de diferenciação entre as populações e padrões de fluxo gênico. Trabalhos para estimar a variabilidade genética de *G. molesta* já foram realizados na África (TIM et al., 2008) e Itália (TORRIANI et al., 2010) com uso de marcadores mitocondriais e microssatélites, respectivamente.

No caso específico de *G. molesta*, entender a estrutura populacional e a troca de genes entre populações (fluxo gênico) permitem estimar o grau de isolamento ao longo do espaço e do tempo, identificando biótipos que podem estar associados aos seus hospedeiros preferenciais (MARTEL et al., 2003). Essas informações são essenciais para o delineamento e refinamento de práticas de manejo (CAPRIO; TABASHNIK, 1992; ALSTAD; ANDOW, 1995), principalmente no tocante ao manejo de resistência a inseticidas (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977a, 1977b).

Referências

- ALBERNAZ, K.C.; SILVA-BRANDÃO, K.L.; FRESIA, P.; CÔNSOLI, F.L.; OMOTO, C. Genetic variability and demographic history of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Brazil inferred by mtDNA sequences. **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 102, n. 3, p. 333-343, 2012.
- ALSTAD, D.N.; ANDOW, D.A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. **Science**, Washington, v. 268, p. 1894-1896, 1995.
- ARIAS, M.C.; FRANCISCO, F.O.; SILVESTRE, D. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. In: MELO, G.A.R.; ALVES-DOS-SANTOS, I. **Apoidea Neotropica: homenagem aos 90 anos de Jesus Santiago Moure**. Criciúma: Editora UNESC, 2003. p. 305-309.
- ARIOLI, C.J. **Técnica de criação e controle de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) na cultura da macieira**. 2007. 83 p. Tese (Doutorado em Fitossanidade) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

ARIOLI, C.J.; GARCIA, M.S.; ZART, M.; BOTTON, M. Biologia da mariposa oriental em dieta artificial à base de milho. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 11, p. 481-486, 2010.

AVISE, J.C. **Phylogeography**: the history and formation of species. Cambridge: Harvard University Press, 2000. 447 p.

BENTANCOURT, C.M.; SCATONI, I.B. **Lepidópteros de importância económica, reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales**. Montevideo: Hemisferio Sur - Facultad de Agronomía, 1995. v. 1, 124 p.

BENTANCOURT, C.M.; SCATONI, I.B.; GONZALEZ, A.; FRANCO, J. Biology of *Bonagota cranaodes* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) on seven natural foods. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 299-306, 2004.

BERNARDI, D.; SILVA, O.A.B.N. e; BERNARDI, O.; SILVA, A. da; CUNHA, U.S. da; GARCIA, M.S. Eficiência e efeitos subletais de nim sobre *Bonagota salubricola* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 412-419, 2011.

BOBADILLA, R. **Polilla oriental de la fruta**. Santiago: Servicio Agrícola y Ganadero, 1972. 14p. (Boletín Técnico, 1952).

BORCHERT, D.; WALGENBACH, J.F.; KENNEDY, G.G. Assessment of sublethal effects of methoxyfenozide on Oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 98, n. 3, p. 765-771, 2005.

BOTTON, M.; NAKANO, O.; KOVALESKI, A. Controle químico da lagarta-enroladeira *Bonagota cranaodes* (Meyrick) na cultura da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 11, p. 2139-2144, 2000a.

_____. Efeito do raleio de frutos sobre o dano de *Bonagota cranaodes* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae) em cultivares de macieira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 4, p. 717-719, 2000b.

BOTTON, M.; ARIOLI, C.J.; BAVARESCO, A.; SCOZ, P.L. Principais pragas do pessegueiro. In: GARRIDO, L.C.; BOTTON, M. (Org.). **Sistema de produção de pêsego de mesa na Região da Serra Gaúcha**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p. 1-16. (Embrapa Uva e Vinho. Sistemas de Produção, 3).

BOTTON, M.; ARIOLI, C.J.; RINGENBERG, R.; MORANDI-FILHO, W.J. Controle químico de *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae) em laboratório e pomar de macieira. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 2, p. 225-231, 2009.

BOTTON, M.; NAVA, D.E.; ARIOLI, C.J.; GRUTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S. **Bioecologia, monitoramento e controle da mariposa-oriental na cultura do pessegueiro no Rio Grande do Sul**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2011. 11 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 86).

- CAPRIO, M.A.; TABASHNIK, B.E. Gene flow accelerates local adaptation among finite populations: simulating the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, p. 611-620, 1992.
- CHAPUIS, M.P.; LOISEAU, A.; MICHALAKIS, Y.; LECOQ, M.; ESTOUP, A. Characterization and PCR multiplexing of polymorphic microsatellite loci for the locust *Locusta migratoria*. **Molecular Ecology Notes**, London, v. 5, n. 3, p. 554-557, 2005.
- COOPERBAND, M.F.; ALLAN, S.A. Effects of different pyrethroids on landing behavior of female *Aedes aegypti*, *Anopheles quadrimaculatus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 46, n. 2, p. 292-306, 2009.
- DENHOLM, I.; ROWLAND, M.W. Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 37, p. 91-112, 1992.
- DICKSON, R.C. Factors governing the induction of diapause in the oriental fruit moth. **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 42, p. 511-537, 1949.
- DOMINGUES, F.A.; SILVA-BRANDÃO, K.L.; ABREU, A.G.; PERERA, O.P.; BLANCO, C.A.; CÔNSOLI, F.L.; OMOTO, C. Genetic structure and gene flow among Brazilian populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 105, n. 6, p. 2136-2146, 2012.
- EIRAS, A.E.; DELMORE, L.R.K.; PARRA, J.R.P.; PIQUE, M.P.R., VILELA, E.F.; KOVALESKI, A. Biologia comparada da lagarta-enroladeira *Phtheochroa cranaodes* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae) em duas dietas artificiais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 251-257, 1994.
- ELLIS, N.H.; HULL, L.A. Factors influencing adult male *Grapholita molesta* dispersal in commercial *Malus* and *Prunus* host crops. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 146, n. 2, p. 232-241, 2013.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220 p.
- FUTUYMA, D. J. **Biologia evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 1992. 631 p.
- GEORGHIOU, G.P. The evolution of resistance to pesticides. **Annual Review of Ecology Systematics**, Palo Alto, v. 3, n. 1, p. 133-168, 1972.
- _____. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIOU, G.P.; SAITO, T. (Ed.). **Pest resistance to pesticides**. New York: Plenum, 1983. p. 769-792.
- GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, p. 319-323, 1977a.
- _____. Operational influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, p. 653-658, 1977b.

GONG, Y.J.; SHI, B.C.; KANG, Z.J.; ZHANG, F.; WEI, S.J. The complete mitochondrial genome of the oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae). **Molecular Biology Reports**, Basel, v. 39, n. 3, p. 2893-2900, 2012.

GONZALEZ, H.R. **Las polillas de la fruta en Chile (Lepidoptera: Tortricidae; Pyralidade)**. Santiago: Universidade de Chile, 2003. 188 p. (Série Ciências agrônômicas, 9).

GRELLMANN, E.O.; LOECK, A.E.; SALLES L.A.B.; FACHINELLO J.C. Ciclo evolutivo de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Olethreutidae) em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 13, n. 4, p.21-26, 1991.

HAMRICK, J.L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, Columbus, v.69, n. 10, p. 1685-1693, 1982.

HARPER, G.L.; MACLEAN, N.; GOULSON, D. Microsatellite markers to assess the influence of population size, isolation and demographic change on the genetic structure of the UK butterfly, *Polyommatus bellargus*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, p. 3349-3357, 2003.

HEMINGWAY, J. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 30, n. 11, p. 1009-1015, 2000.

HUGHES, J.; DORN, S. Sexual differences in the flight performance of the oriental fruit moth, *Cydia molesta*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 103, p. 171-182, 2002.

HUGHES, J.; HERN, A.; DORN, S. Preimaginal environment influences adult flight in *Cydia molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 33, n. 5, p. 1155-1162, 2004.

JONES, M.M. **Susceptibility of oriental fruit moth (*Grapholita molesta* (Busck)) to selected insecticides and mixtures**. 2010. 124 p. Thesis (Ph.D. in Entomology) - University of Illinois at Urbana, Champaign, 2010.

KANGA, L.H.B.; PREE, D.J.; PLAPP JR., F.W.; VAN LIER, J.L. Sex-Linked altered acetylcholinesterase resistance to carbamate insecticides in adults of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Guelph, v. 71, n. 1, p. 29-39, 2001.

KANGA, L.H.B.; PREE, D.J.; VAN LIER, J.L.; WALKER, G.M. Monitoring for resistance to organophosphorous, carbamate, and pyrethroid insecticides in the oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae). **The Canadian Entomologist**, New York, v. 131, n. 4, p. 441-450, 1999.

_____. Management of insecticide resistance in Oriental fruit moth (*Grapholita molesta*; Lepidoptera: Tortricidae) populations from Ontario. **Pest Management Science**, Sussex, v. 59, n. 8, p. 921-927, 2003.

KANGA, L.H.B.; PREE, D.J.; VAN LIER, J.L.; WHITTY, K.J. Mechanisms of resistance to organophosphorus and carbamate insecticides in Oriental fruit moth populations *Grapholita molesta* (Busck). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Guelph, v. 59, n. 1, p. 11-23, 1997.

KOVALESKI, A. Pragas. In: _____. (Ed.). **Maçã: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 10-33. (Frutas do Brasil, 38).

KOVALESKI, A.; RIBEIRO, L.G. Manejo de pragas na produção integrada de maçã. In: PROTAS, J.F.S.; SANHUEZA, V.R.M. (Ed.). **Produção Integrada de Frutas: o caso da maçã no Brasil**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p. 61-68.

KOVALESKI, A.; BOTTON, M.; EIRAS, A.E.; VILELA, E. **Lagarta-enroladeira da macieira *Bonagota cranaodes* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae): bioecologia, monitoramento e controle**. Bento Gonçalves: EMBRAPA, CNPUV, 1998. 16 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 24).

MAGALHÃES, L.C. **Managing insects and insect resistance: from apple orchards to transcriptomics**. 2011. 108 p. Thesis (Ph.D. in Entomology) - North Carolina State University, Raleigh, 2011.

MARTEL, C.; RÉJASSE, A.; ROUSSET, F.; BETHENOD, M.T.; BOURGUET, D. Host-plant-associated genetic differentiation in Northern French populations of the European corn borer. **Heredity**, London, v. 90, p. 141-149, 2003.

MEYRICK, E. *Phtheochroa cranaodes*. **Exotic Microlepidoptera**, London, v.5, p. 149-150, 1937.

MILLER, N.J.; BIRLEY, A.J.; OVERALL, A.D.J.; TATCHELL, G.M. Population genetic structure of the lettuce root aphid, *Pemphigus bursarius* (L.), in relation to geographic distance, gene flow and host plant usage. **Heredity**, London, v. 91, p. 217-223, 2003.

MONTEIRO, L.B.; HICKEL, E. Pragas de importância econômica em fruteiras de caroço. In: MONTEIRO, L.B.; MAY DE MIO, L.L.; MONTE SERRAT, B.; MOTTA, A.C.V.; CUQUEL, F.L. (Org.). **Fruteiras de caroço: uma visão ecológica**. Curitiba: UFPR, 2004. p. 223-264.

MYERS, C.T.; HULL, L.A.; KRAWCZYK, G. Seasonal and cultivar-associated variation in the oviposition preference of oriental fruit moth, (Lepidoptera: Tortricidae) adults and feeding behavior of neonate larvae in apples. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, n. 2, p. 349-358, 2006.

NAVA, D.E. **Controle biológico de insetos-praga em frutíferas de clima temperado: uma opção viável, mas desafiadora**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 20 p. (Documentos, 2008).

NORA, I.; HICKEL, E.R. Pragas da macieira. In: EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. **Manual da cultura da macieira**. Florianópolis, 2002. p. 463-525.

- NUÑEZ, S.; BENTANCOURT, C.M.; SCATONI, I.B. *Bonagota salubricola* (Meyrick). In: BENTANCOURT, C.M.; SCATONI, I.B. (Ed.). **Lepidopteros de importancia económica em el Uruguay**: reconocimiento, biología y daños de las plagas agrícolas y forestales. Hemisferio Sur: Facultad de Agronomía, Uruguay, 2006. p. 168-175.
- PARRA, J.R.P.; EIRAS, A.E.; HADDAD, M.L.; VILELA, E.F; KOVALESKI, A. Técnica de criação de *Phtheochroa cranaodes* Meyrick (Lepidoptera: Tortricidae) em dieta artificial. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 4, p. 537-543, 1995.
- PASTORI, P.; ARIOLI, C.; BOTTON, M.; MONTEIRO, L.B.; MAFRA-NETO, A. Avaliação da Técnica de Disrupção Sexual Utilizando Emissores SPLAT[®] Visando ao Controle de *Bonagota salubricola* (Meyrick) e *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) na Pré-colheita de Maçãs da Cultivar 'Fuji'. **Bioassay**, Piracicaba, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2008.
- PEREIRA, J. **Eficácia de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) e *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae) e identificação de biótipos por meio de bioensaios e infravermelho próximo**. 2012. 61p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- POLTRONIERI, A.S.; MONTEIRO, L.B.; SCHUBER, J.M. Prospecção da diapausa da mariposa-oriental no período de dormência do pessegueiro. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 1, p. 67-72, 2008.
- POLTRONIERI, A.S.; MONTEIRO, L.B.; SCHUBER, J.M.; CARDOSO, N.A. Conexidade populacional de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) entre pomares de pessegueiro e macieira. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 3, p. 339-347, 2008.
- PREE, D.J.; WHITTY, K.J.; Van DRIEL, L.; WALKER, G.M. Resistance to insecticides in oriental fruit moth populations (*Grapholita molesta*) from the Niagara peninsula of Ontario. **The Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 130, n. 3, p. 245-256, 1998.
- PREE, D.J.; WHITTY, K.J.; POGODA, M.K.; BITTNER, L.A. Status of resistance to insecticides in populations of the oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) in southern Ontario. **Journal of the Entomological Society of Ontario**, Ontário, v. 136, p. 53-70, 2005.
- REIS FILHO, W.; NORA, I.; MELZER, R. Population dynamics of *Grapholita molesta* (Busck, 1916) and its adaptation on apple in South Brazil. **Acta Horticulturae**, Korbek-Lo, v. 1, n. 232, p. 204-208, 1988. Apresentado no INTERNATIONAL WORKSHOP ON APPLE CULTURE IN THE TROPICS AND SUBTROPICS, 1988, Florianópolis.
- RODRIGUES, M.L.; GARCIA, M.S.; NAVA, D.E.; BOTTON, M.; PARRA, J.R.P.; GUERRERO, M. Selection of *Trichogramma pretiosum* lineages for control of *Grapholita molesta* in peach. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 94, n. 3, p. 398-403, 2011.
- ROUSH, R.T. Designing resistance management programs: How can you choose? **Pesticide Science**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 423-441, 1989.
- ROUSH, R.T.; MCKENZIE, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 32, p. 361-380, 1987.

ROUSH, R.T.; TABASHNIK, B.E. **Pesticide resistance in arthropods**. London: Chapman and Hall, 1990. 303p.

SALLES, L.A.B. **Grafolita (*Grapholita molesta*): bioecologia e controle**. Pelotas: Embrapa, CNPF, 1991. 13 p. (Documentos, 42).

_____. Mariposa-oriental, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). In: VILELA, E.F.; ZUCCHI, R.A.; CANTOR, F. (Ed.). **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 42-45.

SARFRAZ, M.; DOSDALL, L.M.; KEDDIE, B.A. Evidence for behavioural resistance by the diamond back moth, *Plutella xylostella* (L.). **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v. 129, n. 6, p. 340-341, 2005.

SAUSEN, C.D.; SANT'ANA, J.; REDAELLI, L.R.; PIRES, P.D.S. Diapause initiation and alterations in the life cycle of *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) as induced by photoperiodic conditions. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 40, n. 5, p. 529-532, 2011.

SIEGWART, M.; MONTEIRO, L.B.; MAUGIN, S.; OLIVARES, J.; MALFITANO-CARVALHO, S.; SAUPHANOR, B. Tools for resistance monitoring in oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) and first assessment in Brazilian populations. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 104, n. 2, p. 636-645, 2011.

SILVA, O.A.B.N. e. **Efeito de dietas, diapausa e inseticidas reguladores de crescimento sobre o desempenho reprodutivo de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) em laboratório**. 2008. 89 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

SILVA, O.A.B.N. e.; BOTTON, M.; GARCIA, M.S.; BISOGNIN, A.Z.; NAVA, D.E. Desenvolvimento e reprodução da mariposa oriental em macieira e pessegueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 10, p. 1082-1088, 2010.

SOLFERINI, V.N.; SELIVON, D. Polimorfismo de isoenzimas. In: MATIOLO, S.R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2001. p. 137-142.

SOUZA, B.; SANTA-CECILIA, L.V.C.; SOUSA, L.O.V. Ocorrência e danos de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) em pessegueiros no município de Caldas, MG. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 185-188, 2000.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 15, p. 199-203, 2000.

TIMM, A.E.; GEERTSEMA, H.; WARNICH, L. Population genetic structure of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in South Africa. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 101, n. 1, p. 197-203, 2008.

TORRIANI, M.V.G.; MAZZI, D.; HEIN, S.; DORN, S. Structured populations of the oriental fruit moth in an agricultural ecosystem. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, p. 2651-2660, 2010.

USMANI, K.A.; SHEARER, P.W. Susceptibility of male oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) populations from New Jersey apple orchards to azinphosmethyl. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 94, n. 1, p. 233-239, 2001.

YETTER, W.P.; STEINER, L.F. Efficiency of bait traps for the oriental fruit moth as indicated by the release and capture of marked adults. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 25, n. 1, p. 106-116, 1932.

3 LINHAS-BÁSICAS E MONITORAMENTO DA SUSCETIBILIDADE DE *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) e *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) A INSETICIDAS

Resumo

A lagarta-enroladeira *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) e a mariposa oriental *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) são duas das mais importantes pragas de frutíferas de clima temperado no Brasil. O manejo destes insetos-praga tem sido realizado quase que exclusivamente com inseticidas. Portanto, objetivou-se caracterizar as linhas-básicas e monitorar a suscetibilidade destas espécies a inseticidas em populações de *B. salubricola* e *G. molesta* coletadas em pomares comerciais de macieira e pessegueiro do Brasil. Populações de *B. salubricola* foram coletadas em macieira no Estado do Rio Grande do Sul (safra 2011/12) e de *G. molesta* provenientes de pomares do Rio Grande do Sul (safras 2010/11; 2011/12), Santa Catarina (2010/11) e São Paulo (2010/11 e 2011/12). A técnica de bioensaio adotada foi a de ingestão com tratamento superficial da dieta com inseticida e exposição de lagartas neonatas. Após a caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade de *B. salubricola* e *G. molesta* a inseticidas, foram definidas as concentrações diagnósticas (CL₉₉) para o monitoramento da resistência. Não foram observadas diferenças na suscetibilidade de populações de campo de *B. salubricola* em relação à população suscetível de referência aos inseticidas chlorantraniliprole, phosmet, spinetoram, spinosad e tebufenozide, assim como não foram detectadas diferenças na suscetibilidade das populações de *G. molesta* a chlorantraniliprole, metaflumizone, novaluron, pyriproxyfen e spinetoram. Entretanto, observaram-se diferenças significativas na sobrevivência de populações de *B. salubricola* a novaluron (3,3% de sobrevivência) e de *G. molesta* a phosmet e tebufenozide, com 2,5 e 4,5% de sobrevivência, respectivamente. Assim pode-se concluir que a frequência de resistência ainda é baixa para os inseticidas avaliados em populações de *B. salubricola* e *G. molesta* no Brasil.

Palavras-chave: Resistência; Mariposa oriental; Lagarta-enroladeira; Macieira; Pessegueiro

Abstract

The apple leafroller *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) and Oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Busck, 1916) are two of the most important pests of temperate fruit trees in Brazil. The management of these both insect pests has been conducted almost exclusively with insecticides. Therefore, the objectives of this study were to characterize the baselines and monitor the susceptibility of *B. salubricola* and *G. molesta* populations to insecticides in commercial apple and peach orchards in Brazil. *B. salubricola* populations were collected in apple orchards in the State of Rio Grande do Sul (2011/12 growing season) and *G.*

molesta populations from orchards in Rio Grande do Sul (2010/11 and 2011/12), Santa Catarina (2010/11) and São Paulo (2010/11 and 2011/12). The bioassay method was the diet surface treatment with insecticide with exposure of neonate larvae. After characterizing the baseline susceptibility data for *B. salubricola* and *G. molesta* to insecticides, diagnostic concentrations (CL_{99}) were defined for monitoring resistance. There were no differences in the susceptibility among field populations of *B. salubricola* in compared to the susceptible reference population to the insecticides chlorantraniliprole, phosmet, spinetoram, spinosad and tebufenozide as well as *G. molesta* populations to chlorantraniliprole, metaflumizone, pyriproxyfen and spinetoram. However, there were significant differences in survival of *B. salubricola* populations to novaluron (3.3% survival) and *G. molesta* populations to insecticides phosmet and tebufenozide, with 2.5 and 4.5% survival, respectively. Therefore, the frequency of resistance to the insecticides evaluated herein is still low among *B. salubricola* and *G. molesta* populations in Brazil.

Keywords: Resistance; Oriental Fruit Moth; Apple leafroller; Apple orchard; Peach orchard

3.1 Introdução

A lagarta-enroladeira *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) e a mariposa oriental *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) são duas das mais importantes pragas das frutíferas de clima temperado, com destaque para a macieira e o pessegueiro (KOVALESKI et al., 1998; SALLES, 2001; BOTTON et al., 2011). Os danos provocados por *G. molesta* são resultantes da alimentação das lagartas nas brotações e frutos onde os prejuízos são mais importantes (ARIOLI, 2007). O ataque desse inseto pode causar perdas significativas na produção (BOTTON et al., 2003; MONTEIRO; HICKEL, 2004; ARIOLI, 2007). Além dos frutos, *B. salubricola* ataca as folhas, sendo que neste último não há perdas econômicas (KOVALESKI et al., 1998). Os principais prejuízos causados por *B. salubricola* ocorrem quando as lagartas raspam a casca dos frutos, depreciando-os comercialmente (KOVALESKI, 2004).

O manejo de *B. salubricola* e *G. molesta* tem sido realizado principalmente com o emprego de inseticidas organofosforados, com destaque para chlorpyrifos e phosmet (GRÜTZMACHER et al., 1999; BOTTON et al., 2000, 2009; KOVALESKI; RIBEIRO, 2002; ARIOLI; BOTTON; CARVALHO, 2004; SIQUEIRA; GRÜTZMACHER, 2005; ARIOLI et al., 2007), embora, recentemente o emprego da técnica de disrupção do acasalamento com feromônios sexuais e novos inseticidas (chlorantraniliprole, lufenuron,

novaluron e spinetoram) tenham sido disponibilizados para o controle destas pragas no Brasil (BOTTON et al., 2005; ARIOLI 2007; MONTEIRO; SOUZA; BELLI, 2008; PASTORI et al., 2012; BRASIL, 2013).

Com a recente introdução de novos inseticidas no mercado para o controle de *B. salubricola* e *G. molesta*, é imprescindível conhecer o estado atual de suscetibilidade destas pragas a estes inseticidas, antes da utilização em larga escala dos novos produtos. Estas informações darão subsídios para a implementação de um programa pró-ativo de manejo da resistência, permitindo que ao longo dos anos seja possível estimar a frequência de indivíduos resistentes antes que se observem falhas de controle. É conhecido que estratégias de manejo da resistência de insetos a inseticidas são mais eficientes quando a frequência de indivíduos resistentes ainda é baixa (ROUSH; McKENZIE, 1987), garantindo a eficiência de controle e a preservação da vida útil dos produtos. Portanto, neste trabalho foram caracterizadas as linhas-básicas e monitoramento da suscetibilidade de *B. salubricola* e *G. molesta* a inseticidas em populações coletadas em pomares comerciais de macieira e pessegueiro nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo.

3.2 Material e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Resistência de Artrópodes a Pesticidas do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP e no Laboratório de Entomologia da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves - RS. A coleta de insetos foi realizada em pomares comerciais de pessegueiro e macieira nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo.

3.2.1 Populações de *B. salubricola* e *G. molesta*

A população suscetível de referência de *B. salubricola* foi proveniente de insetos coletados no ano de 2011, em frutos de maçã de um pomar com 12 anos cultivado no sistema de produção orgânica localizado no município de Antônio Prado-RS. As lagartas e posturas foram coletadas diretamente das plantas de macieira e levadas ao Laboratório de Entomologia

da Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves - RS, sendo mantidas em dieta artificial (PARRA, et al., 1995).

A população suscetível de referência de *G. molesta* foi proveniente da criação do Laboratório de Biologia e Controle Biológico do Departamento de Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, localizada no município de Capão do Leão-RS. A criação de laboratório foi iniciada a partir de insetos coletados em frutos de maçã, em fevereiro de 2005, proveniente de um pomar localizado no município de Vacaria, RS.

Para o monitoramento da suscetibilidade, as populações de campo de *B. salubricola* (Tabela 3.1) e *G. molesta* (Tabela 3.2) foram coletadas em diferentes localidades de produção de maçã e pêssego do Brasil. Os pomares foram selecionados com base em históricos de falhas de controle relatados pelos técnicos e produtores.

Após a coleta, os insetos foram criados em dieta artificial à base de feijão ‘Carioca’ e levedura de cerveja para *B. salubricola* (PARRA et al., 1995) e à base de farinha de milho e germe de trigo para *G. molesta* (ARIOLI et al., 2007). Todos os experimentos foram conduzidos em condições controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$, fotofase de 14 horas para *B. salubricola* e 16 horas para *G. molesta*). Desde o estabelecimento em laboratório os insetos foram mantidos em dieta artificial e sem pressão de seleção exercida por inseticidas.

3.2.2 Caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade de *B. salubricola* e *G. molesta* a inseticidas

Para a caracterização das linhas-básicas de suscetibilidade, foram realizados bioensaios de ingestão com a técnica de tratamento superficial da dieta artificial com os seguintes inseticidas: chlorantraniliprole (Altacor 350 WG[®], DuPont do Brasil S.A. – Barueri-SP), metaflumizone (BAS 320I; Basf S.A., São Paulo-SP), novaluron (Rimon 100 EC[®]; Milenia Agrociência S.A, Londrina-PR), phosmet (Imidan 500 WP[®]; Cross Link Consultoria e Comércio, Barueri-SP), pyriproxyfen (Tiger[®], Sumitomo chemical do Brasil Repres. Ltda, São Paulo-SP), spinetoram (Delegate 250 WG[®]; Dow AgroSciences Industrial Ltda, São Paulo-SP), spinosad (Tracer 480 SC[®]; Dow AgroSciences Industrial Ltda - São Paulo – SP) e tebufenozide (Mimic 240 SC[®]; Dow AgroSciences Industrial Ltda, São Paulo-SP).

A dieta artificial utilizada no bioensaio com *B. salubricola* foi modificada de Parra et al. (1995), aumentando-se a quantidade de água em 100% e quantidade de ágar em 150%. A

dieta utilizada para *G. molesta* também foi modificada de Arioli et al. (2007), aumentando-se a quantidade de água em 300% e a de ágar em 100%. Isto foi necessário para permitir verter a dieta nos poços das placas de bioensaio. Após a preparação da dieta, esta foi mantida em banho-maria regulada à 50°C para que se mantivesse no estado não geleificado da dieta. Com auxílio de uma micropipeta, foram depositados 1,25 mL de dieta artificial em cada célula da placa plástica contendo 24 células (COSTAR®). As placas contendo dieta permaneceram em câmara de fluxo laminar na presença de luz ultravioleta até a geleificação da dieta. Os inseticidas testados foram diluídos em água destilada, adicionando-se também o surfactante Triton® na concentração de 0,1%.

Com auxílio de uma micropipeta eletrônica, 30µL da solução do inseticida na concentração a ser testada foi aplicada nas células contendo dieta geleificada enquanto que na testemunha foi adicionado somente surfactante. Posteriormente, as placas foram mantidas na câmara de fluxo laminar por pelo menos 90 minutos. Após a secagem do inseticida, duas lagartas de primeiro instar (< 24 h de idade) de *B. salubricola* ou de *G. molesta* foram inoculadas nas células. As placas foram tampadas e acondicionadas em câmara climatizada regulada nas mesmas condições da criação de manutenção.

Para a determinação dos períodos de avaliação dos bioensaios para cada inseticida, pré-testes foram realizados selecionando-se os períodos que proporcionaram os melhores valores para os parâmetros avaliados (coeficiente angular, χ^2), demonstrando maior ajuste aos modelos de Probit e log-log complementar. Sendo assim, a avaliação da mortalidade de 1 dia após a inoculação (DAI) foi estabelecida como padrão para a realização dos bioensaios com metaflumizone e phosmet, 3 DAI para chlorantraniliprole, novaluron, spinetoram e tebufenozide e 5 DAI para pyriproxyfen. Os indivíduos foram considerados mortos quando não reagiram com movimentos vigorosos ao toque do pincel. Cada inseticida foi avaliado em sete concentrações espaçadas logaritmicamente. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, utilizando cinco repetições (uma placa por repetição, 24 lagartas por placa) para cada concentração, totalizando 120 lagartas por concentração.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de Probit e de log-log complementar utilizando o programa SAS (Proc Probit) (SAS INSTITUTE, 2000). A partir da curva de concentração-resposta foi estimada a concentração letal CL₅₀ e o respectivo intervalo de confiança (IC 95%) e valor de coeficiente angular. Para a estimativa das CL₉₀ e CL₉₉ e respectivos intervalos de confiança (IC 95%), os dados foram submetidos ao modelo binomial

com função de ligação complemento log-log (gompit) (Proc Probit), (SAS INSTITUTE, 2000).

3.2.3 Monitoramento da suscetibilidade a inseticidas em populações de campo de *B. salubricola* e *G. molesta*

Para a espécie *B. salubricola*, posturas e lagartas de todos os ínstares foram coletadas diretamente nas plantas de macieira (folhas e frutos) e levadas ao laboratório de Entomologia da Embrapa Uva e Vinho em Bento Gonçalves, RS. As lagartas neonatas e de terceiro/quarto ínstar foram transferidas, com o auxílio de um pincel, para tubos de vidro esterilizados (2,5 cm de diâmetro × 8,5 cm de altura) contendo dieta artificial. As lagartas foram mantidas nesta condição até a pupação mantendo-se a criação e multiplicação em laboratório, conforme procedimentos descritos por de Parra et al. (1995).

Para *G. molesta* órgãos vegetais (ponteiros de pêssego e frutos de pêssego e maçã) atacados pelo inseto foram coletados e acondicionados em caixas de isopor para transporte ao Laboratório de Entomologia da Embrapa Uva e Vinho em Bento Gonçalves, RS. Os ponteiros de pessegueiro, frutos de pessegueiro e macieira infestados pelo inseto foram examinados para a localização das lagartas, as quais foram retiradas e transferidas, individualmente, para tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro × 8,5 cm de altura) contendo dieta artificial (ARIOLI et al., 2007). Os tubos foram tamponados com algodão hidrófobo, onde os insetos permaneceram até atingir a fase de pupa. Posteriormente, a metodologia de criação foi seguida de acordo com Arioli et al. (2007). Foram estabelecidas em laboratório somente as populações as quais iniciaram com no mínimo 150 indivíduos coletados diretamente no campo, descartando-se as demais.

O monitoramento da suscetibilidade das populações de *B. salubricola* e *G. molesta* foi realizado com as lagartas recém-eclodidas (< 24 horas de idade), utilizando bioensaio de ingestão com as concentração diagnóstica (CL₉₉) de cada inseticida que foi obtida a partir das respostas de concentração-mortalidade da população suscetível de referência. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo que para cada população monitorada (Tabelas 3.1 e 3.2) foram realizadas de oito a treze repetições (uma placa por repetição, 48 lagartas por placa) para cada concentração diagnóstica.

Os dados de porcentagem de sobrevivência das populações de *B. salubricola* e *G. molesta* nas diferentes regiões foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Os dados

foram testados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) e de homocedasticidade pelos testes de Hartley (HARTLEY, 1950) e Bartlett (BARTLETT, 1937). Após a análise de variância, quando significativa ($p \leq 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando o software SAS[®] (SAS INSTITUTE, 2000).

Tabela 3.1 - Identificação das populações de *B. salubricola* coletadas em macieira, procedência e data de coleta

Código	Município	Longitude	Latitude	Data de Coleta
B-M/RS1	Vacaria, RS	51°27.936'	29°06.259'	12/05/12
B-M/RS2	Vacaria, RS	50° 53.795'	29°03.926'	10/05/12
B-M/RS3	Vacaria, RS	51°27.470'	29°04.663'	11/05/12
B-M/RS4	Bento Gonçalves, RS	50°54.767'	29°09.708'	28/04/12
B-M/RS5	Bento Gonçalves, RS	50°55.689'	29°11.357'	30/04/12
B-M/RS6	Pinto Bandeira, RS	51°24.965'	29°07.606'	04/05/12
B-M/RS7	Pinto Bandeira, RS	51°24.495'	29°08.203'	01/05/12

Tabela 3.2 - Identificação das populações de *G. molesta*, planta hospedeira, procedência e data de coleta

Código	Hospedeiro	Município	Longitude	Latitude	Data de Coleta
G-P/SP1	Pessegueiro	Paranapanema, SP	48° 39' 17''	23° 20' 26''	28/05/10
G-P/RS1	Pessegueiro	Pinto Bandeira, RS	51°24.965'	29°07.606'	16/02/12
G-P/RS2	Pessegueiro	Pelotas, RS	52°32.884'	31°25.750'	08/02/12
G-P/RS3	Pessegueiro	Pelotas, RS	52°32.545'	31°25.953'	10/02/12
G-P/SP2	Pessegueiro	Paranapanema, SP	48° 39' 17''	23° 20' 26''	05/12/11
G-M/SC1	Macieira	São Joaquim, SC	49° 55' 55''	28° 17' 38''	10/03/10
G-M/SC2	Macieira	São Joaquim, SC	50° 06.591'	27° 55' 01''	17/05/11
G-M/RS1	Macieira	Caxias do Sul, RS	50° 55' 17''	27° 01' 34''	26/04/11
G-M/RS2	Macieira	Antônio Prado, RS	51° 16' 58''	28° 51' 28''	27/05/11
G-M/RS3	Macieira	Vacaria, RS	50° 58.945'	28°33.003'	01/03/10
G-M/RS4	Macieira	Pinto Bandeira, RS	51°24.495'	29°08.203'	14/03/12
G-M/SP1	Macieira	Paranapanema, SP	48° 43' 22''	23° 23' 20''	24/02/12
G-M/RS5	Macieira	Bento Gonçalves, RS	51° 31' 08''	29° 10' 15''	17/03/12

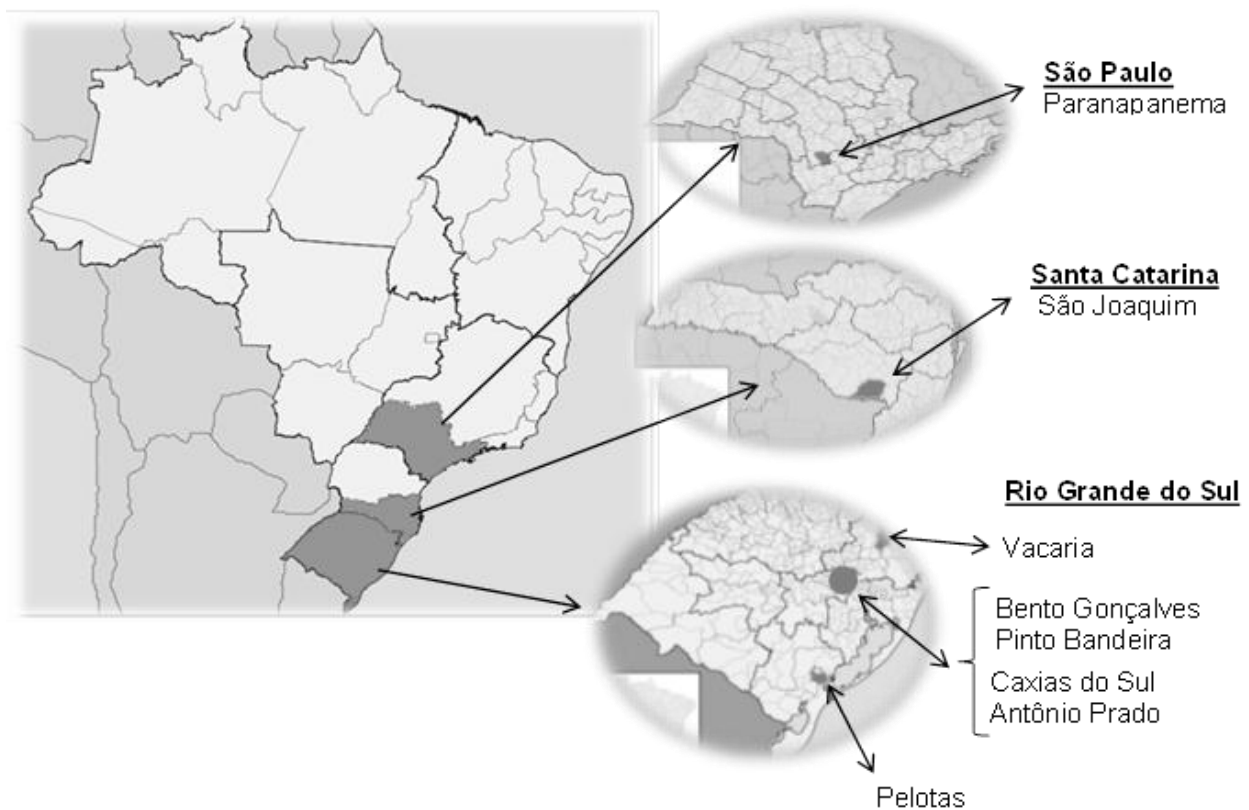


Figura 3.1 Mapa com os municípios de coleta das populações de *B. salubricola* e *G. molesta*.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Linhas-básicas de suscetibilidade de *B. salubricola* e *G. molesta* a inseticidas

Foi observada alta suscetibilidade de *B. salubricola* e *G. molesta* aos inseticidas testados (Tabelas 3.3. e 3.4). O método de bioensaio utilizado (tratamento superficial da dieta artificial) e as análises de Probit e log-log complementar descrevem de maneira consistente as respostas biológicas de lagartas de *B. salubricola* e *G. molesta* aos inseticidas avaliados. É importante destacar que a definição da técnica de bioensaio é um dos principais objetivos em programas de monitoramento da resistência, pois quanto melhor o método, maior é a discriminação entre linhagens suscetíveis e resistentes. A partir da análise dos intervalos de confiança das CL_{50} , constatou-se que não houve diferenças significativas entre estas espécies quanto à tolerância para a maioria dos inseticidas. Os testes de razão de tolerância baseados

na CL_{50} (*B. salubricola* / *G. molesta*), indicam que *B. salubricola* é mais tolerante aos inseticidas novaluron (6,3 vezes) e spinetoram (4,2 vezes) em comparação a *G. molesta*. Com relação ao spinetoram, foi necessária uma menor concentração para causar mortalidade das duas espécies quando comparado a chlorantraniliprole. Analisando-se a CL_{50} , spinetoram foi 3,1 vezes mais ativo para *B. salubricola* e 14,5 vezes mais ativo para *G. molesta* do que o inseticida chlorantraniliprole. Jones (2010) também detectou maior atividade do inseticida spinetoram (1,8 vezes mais tóxico) em comparação ao chlorantraniliprole para *G. molesta*.

Até o momento, não há relato sobre a definição de linha-básica e monitoramento da suscetibilidade de *B. salubricola* a inseticidas. Os testes descritos na literatura tiveram o somente o propósito de estimar a linha-básica e foram realizados com bactérias entomopatogências à base de *Bacillus* (PEREIRA, 2012) e um inseticida à base de nim (azadiractina) (BERNARDI et al., 2011). Portanto, esta deficiência de trabalhos para esta espécie impossibilita comparações. Por outro lado, reforça a importância das informações obtidas, que podem auxiliar na tomada de decisão quanto ao controle desta espécie e ao manejo da resistência a inseticidas.

No caso de *G. molesta*, a maior dificuldade de comparação dos dados com a literatura é em função das diferentes técnicas de bioensaios e tempos de avaliação utilizados pelos autores (JONES, 2010; MAGALHÃES, 2011; SIEGWART et al., 2011). As técnicas de bioensaio mais utilizadas no monitoramento da suscetibilidade de lagartas de *G. molesta* são o tratamento da superfície da dieta (SIEGWART et al., 2011) e a incorporação do inseticida na dieta (JONES, 2010), além da aplicação tópica sobre lagartas. Devido a estas diferenças metodológicas, alguns valores de CL_{50} encontradas neste trabalho diferem dos obtidos por outros autores (JONES, 2010; MAGALHÃES, 2011; SIEGWART et al., 2011).

A escolha do método de tratamento superficial da dieta artificial neste trabalho advém do fato de ser mais realístico do que a incorporação do inseticida na dieta para a espécie *G. molesta*. No campo, as lagartas de *G. molesta* somente vão ingerir a quantidade de inseticida que estiver na superfície do fruto ou ponteiro. Considerando que a lagarta leva até 24 h para adentrar no fruto de maçã (MYERS; HULL; KRAWCZYK, 2006a, 2006b; CHAVES, 2013), passado este tempo o inseto não mais irá ingerir inseticida, pois estará se alimentando no interior do fruto, tendo pouco tempo de contato com o inseticida. Quando o inseto ataca o ponteiro (principalmente em pessegueiro), a situação é diferente pois o inseto pode entrar em contato com o inseticida mais de uma vez, já que as lagartas necessitam de mais de um

ponteiro para o completo desenvolvimento larval (MYERS; HULL; KRAWCZYK, 2006b; SILVA et al., 2010).

Valores de CL inferiores para alguns inseticidas foram encontrados por Jones (2010), mas provavelmente associado ao método de bioensaio que foi utilizado pelo autor (incorporação do inseticida na dieta). Desta maneira, o inseto permanece ingerindo o inseticida mesmo após a penetração, além disso, os autores utilizaram um tempo maior de exposição da lagarta ao inseticida (a avaliação da mortalidade foi realizada 4 dias após a inoculação). Apesar de Magalhães (2011) ter conduzido os bioensaios com o mesmo método utilizado no presente estudo, o autor utilizou outro critério de mortalidade (lagartas moribundas foram consideradas como mortas), além de aumentar o período de exposição das lagartas ao inseticida (avaliação de mortalidade 5 dias após a inoculação). Portanto a soma destes dois fatores reflete a diferença dos valores encontrados no presente trabalho com os relatados na literatura.

Tabela 3.3 - Linhas-básicas de suscetibilidade de *B. salubricola* (população suscetível de referência) a inseticidas com bioensaio de tratamento superficial da dieta artificial ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$, fotofase de 14 horas)

Inseticida	N ¹	Modelo de regressão						
		Probit			Log-log complementar			
		CL ₅₀ (IC 95%)	Coefficiente Angular ($\pm\text{EPM}^4$)	χ^2 (g.l.) ⁵	CL ₉₀ (IC 95%)	CL ₉₉ (IC 95%)	Coefficiente Angular ($\pm\text{EPM}^4$)	χ^2 (g.l.) ⁵
Chlorantraniliprole	1.452	1,07 (0,66-1,52)	1,52 ($\pm 0,17$)	20,59 (6)	6,90 (5,04-10,81)	19,13 (11,94-42,85)	1,56 ($\pm 0,19$)	20,96(6)
Novaluron	1.291	30,19 (21,9-39,5)	1,49 ($\pm 0,12$)	10,7 (6)	189,7 (159,8-231,9)	509,8 (396,3-696,3)	1,61 ($\pm 0,10$)	3,96 (6)
Phosmet	557	7,62 (4,84- 10,91)	1,90 ($\pm 0,25$)	10,62 (5)	33,14 (22,93-59,39)	72,28 (43,83-184,9)	2,04 ($\pm 0,28$)	11,26 (5)
Spinetoram	1090	0,34 (0,23-0,50)	1,54 ($\pm 0,17$)	9,45 (4)	1,73 (1,42-2,22)	4,09 (3,06-5,99)	1,85 ($\pm 0,14$)	3,14 (4)
Spinosad	1.274	0,36 (0,16-0,61)	1,15 ($\pm 0,16$)	27,30 (6)	5,58 (2,35-6,81)	12,26 (6,52-37,75)	1,29 ($\pm 0,16$)	20,20 (6)
Tebufenozide	1.056	9,42 (5,55-13,03)	1,53 ($\pm 0,23$)	5,55 (4)	46,13 (37,43-61,72)	110,08 (78,30-190,5)	1,83 ($\pm 0,24$)	2,93 (4)

¹Número de insetos testados; ²Concentração letal 50 (ppm) e intervalo de confiança a 95% ; ³Concentração letal 90 e 99 (ppm) e intervalo de confiança a 95%; ⁴Erro padrão da média; ⁵Valor do qui-quadrado calculado e grau de liberdade (g.l.).

Tabela 3.4 - Linhas-básicas de suscetibilidade de *G. molesta* (população suscetível de referência) a inseticidas com bioensaio de tratamento superficial da dieta artificial ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$, fotofase de 16 horas)

Inseticida	N ¹	Modelo de regressão						
		Probit			Log-log complementar			
		CL ₅₀ (IC 95%)	Coefficiente Angular ($\pm\text{EPM}^4$)	χ^2 (g.l.) ⁵	CL ₉₀ (IC 95%)	CL ₉₉ (IC 95%)	Coefficiente Angular ($\pm\text{EPM}^4$)	χ^2 (g.l.) ⁵
Chlorantraniliprole	1.432	1,16 (1,00-1,30)	2,89 ($\pm 0,20$)	7,47 (7)	3,16 (2,88-3,53)	5,58 (4,83-6,69)	2,81 ($\pm 0,20$)	7,17 (7)
Metaflumizone	829	0,96 (0,55-1,32)	2,55 ($\pm 0,23$)	12,01 (4)	2,93 (2,59-3,41)	5,52 (4,61-6,97)	2,52 ($\pm 0,19$)	16,2 (4)
Novaluron	760	4,76 (3,98-5,50)	2,20 ($\pm 0,26$)	4,13 (4)	17,72 (14,50-23,63)	37,82 (27,51-61,68)	2,10 ($\pm 0,24$)	7,01 (4)
Phosmet	1.250	11,33 (10,16- 12,46)	3,02 ($\pm 0,36$)	1,78 (4)	24,57 (22,21-27,73)	37,40 (32,56-44,70)	3,79 ($\pm 0,29$)	1,96 (5)
Pyriproxyfen	978	222,5 (160,3-282,9)	1,73 ($\pm 0,19$)	19,04 (4)	964,62 (825,0-1.199)	2.011 (1.531-3.179)	2,17 ($\pm 0,30$)	13,8 (4)
Spinetoram	672	0,08 (0,07-0,10)	2,49 ($\pm 0,28$)	1,12 (3)	0,32 (0,26-0,41)	0,62 (0,47-0,90)	2,39 ($\pm 0,23$)	4,76 (3)
Tebufenozide	893	5,13 (4,47-5,75)	3,30 ($\pm 0,31$)	2,20 (4)	12,23 (10,91-14,06)	19,65 (16,74-24,28)	3,36 ($\pm 0,28$)	4,78 (4)

¹Número de insetos testados; ² Concentração letal 50 (ppm) e intervalo de confiança a 95% ; ³ Concentração letal 90 e 99 (ppm) e intervalo de confiança a 95%; ⁴ Erro padrão da média; ⁵ Valor do qui-quadrado calculado e grau de liberdade (g.l.).

3.3.2 Monitoramento da suscetibilidade de *B. salubricola* e *G. molesta* a inseticidas

Foram observadas diferenças significativas na suscetibilidade entre as populações de *B. salubricola* (Tabela 3.5) e *G. molesta* (Tabela 3.6) na concentração diagnóstica dos inseticidas testados. Para a *B. salubricola*, apenas a população B-M/RS3 coletada em Vacaria-RS diferiu da população suscetível de referência quanto à suscetibilidade a novaluron (3,31% de sobrevivência). Para as demais populações, não foram observadas diferenças a chlorantraniliprole, novaluron, phosmet, spinetoram, spinosad e tebufenozide, sendo que todos causaram elevada mortalidade da praga (Tabela 3.5).

Para *G. molesta*, a suscetibilidade variou entre as datas de coleta. Na safra 2010/2011, observou-se diferenças significativas na suscetibilidade da população G-P/SP1 coletada em Paranapanema na cultura do pessegueiro a phosmet, com sobrevivência de 2,50% (Tabela 3.6). Também foi registrada diferença na suscetibilidade da população G-M/SC1, coletada em macieira no município de São Joaquim-SC a tebufenozide, com sobrevivência de 4,56%. Na safra (2011/12), todas as populações avaliadas apresentaram suscetibilidade similar à população SUS (Tabela 3.7).

Para as moléculas inseticidas recentemente introduzidas no mercado (chlorantraniliprole, metaflumizone, pyriproxyfen e spinetoram) não foram observadas diferenças significativas na suscetibilidade para ambas espécies (Tabelas 3.5, 3.6 e 3.7). Verificou-se que as populações coletadas apresentaram elevada suscetibilidade a estes produtos, não havendo sobreviventes às concentrações aplicadas. Provavelmente isso se deve a ausência de uso destas moléculas nos pomares de macieira e pessegueiro, pois são inseticidas ainda em fase de registro (metaflumizone e spinetoram) ou recentemente introduzidos no mercado (chlorantraniliprole). Devido a este fato, a estimativa das linhas-básicas e monitoramento da suscetibilidade de *B. salubricola* e *G. molesta* a estes inseticidas fornecem informações importantes, pois permite estabelecer um programa pró-ativo de manejo da resistência a esses inseticidas.

Mediante a comparação intraespecífica, verificou-se que há diferenças na suscetibilidade entre populações para os inseticidas phosmet e tebufenozide. Apesar da pequena sobrevivência de *G. molesta* a phosmet (2,5 % de sobrevivência) e tebufenozide (4,5 %), foi possível inferir que há indicativos da ocorrência de seleção por estes inseticidas nas populações coletadas em Paranapanema-SP e São Joaquim-SC, respectivamente. Salienta-se

que para a detecção de resistência em frequências fenotípicas baixas, uma grande quantidade de insetos deve ser amostrada (ROUSH; MILLER, 1986) e ainda sim, alguns poucos sobreviverão, pois a frequência inicial é muito baixa. O método de detecção de resistência utilizado no presente estudo utilizou uma única concentração diagnóstica para o monitoramento da resistência, o que é mais eficiente em detectar a resistência do que a comparação da CL_{50} , pois um maior número de indivíduos é amostrado apenas na concentração capaz de informar sobre a suscetibilidade da população (ROUSH; MILLER, 1986).

No Brasil, já foi reportada resistência de *G. molesta* a chlorpyrifos com insetos coletados na região de Vacaria-RS e Lages-SC com razão de resistência de 2,98 e 2,70, respectivamente (SIEGWART et al., 2011). Em outros países, também foram reportados registros de *G. molesta* resistentes a inseticidas em pomares de pessegueiros localizados no distrito de Ontário (Canadá), onde se verificou 45% dos frutos infestados pelo inseto nas safras de 1993 e 1994, mesmo com utilização intensiva de inseticidas (PREE et al., 1998).

Em pomares de macieira em New Jersey (EUA), também foi detectada redução na suscetibilidade de *G. molesta* a azinphosmethyl (USMANI; SHEARER, 2001), fato que tem levado pesquisadores a desenvolver estudos referentes à resistência do inseto a organofosforados, piretroides e carbamatos (KANGA et al., 1999), bem como a elucidação dos mecanismos de resistência envolvidos (KANGA et al., 1997, 2001; DE LAME et al., 2001).

Apesar de apresentar o mecanismo de ação redução de penetração do inseticida (carbamato) pela cutícula, a destoxificação por esterases e a insensibilidade do sítio de ação são os principais mecanismos de resistência de *G. molesta* a organofosforados e carbamatos (KANGA et al., 1997).

Estudos de estabilidade de resistência de *G. molesta* a inseticidas em pessegueiro foram conduzidos por Kanga et al. (2003), estabelecendo-se quatro tratamentos para manejar a resistência. No experimento, as mudanças na suscetibilidade de cada população (tratamento) foram monitoradas entre os anos de 1996-1999, permitindo reduzir a frequência de indivíduos de *G. molesta* resistente a organofosforados, de 55% para 14% e para piretroides, diminuiu de 30% para 10%. Neste caso, foi aplicada uma rotação de inseticidas com endossulfan – piretroides - organofosforado. Os resultados indicaram que a resistência em geral, foi instável, ou seja, houve redução da frequência de resistência na ausência da pressão de seleção com um determinado inseticida. Portanto, verifica-se que a estratégia baseada na rotação de inseticidas

por classe para cada geração de *G. molesta*, garantiu sucesso no manejo de resistência tanto para piretroides quanto para organofosforados.

No contexto do manejo da resistência de *B. salubricola* e *G. molesta*, um aspecto importante é a possibilidade de rotação de grupos químicos em função do aumento no número de moléculas registradas para macieira e pessegueiro. Neste sentido, a utilização de inseticidas reguladores de crescimento ou diamidas podem ser priorizados no início do ciclo da cultura (floração), auxiliando na preservação de inimigos naturais e aproveitando o efeito sobre as diversas fases de desenvolvimento dos tortricídeos (ovos, lagartas e adultos) (SILVA et al., 2011). Já os demais inseticidas (ex.: organofosforados/spinosinas) podem ser empregados em fases de ocorrência conjunta das lagartas com outras pragas destas culturas como *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae).

Apesar dos fruticultores utilizarem uma quantidade significativa de pulverizações para o controle da *G. molesta* (6 a 8 por safra) e não ter sido detectada elevada frequência de indivíduos resistentes no presente trabalho, algumas hipóteses podem ser levantadas. Entre os fatores que podem estar contribuindo para retardar ou evitar a evolução da resistência de *G. molesta* a estes inseticidas, está associada ao parasitismo por himenópteros das famílias Braconidae e Ichneumonidae na cultura do pessegueiro. O parasitismo observado em algumas populações coletadas chegou a 90% em pomares de pessegueiro, o que pode contribuir para a redução de indivíduos resistentes na população (ROUSH, 1989; NAVA, 2008; RODRIGUES et al., 2011; CHAVES, 2013). Também foi observado que em vários pomares, principalmente de macieira, utilizam a técnica da disrupção do acasalamento para o controle de ambas as pragas (PASTORI et al., 2008), além da utilização de inseticidas mais eficientes, como chlorantraniliprole. Outra hipótese é o comportamento de alimentação de *B. salubricola* e *G. molesta* pois propicia um “refúgio natural” onde ficam protegidas no interior da folhagem ou entre frutos (KOVALESKI et al. 1998) ou no interior dos ramos ou frutos (BOTTON et al., 2011). Estes hábitos aumentam a dificuldade de se atingir o inseto durante a pulverização de inseticidas. Por este motivo, muitas vezes estes inseticidas não são capazes de intoxicar o inseto dentro do fruto ou no ponteiro, o que diminui a pressão de seleção para a resistência. Este fato pode ajudar a entender a alta suscetibilidade destas pragas aos inseticidas detectada no presente trabalho. Esta presença de “refúgio natural” é um fator decisivo para a manutenção de indivíduos suscetíveis.

Neste estudo, foi possível definir uma metodologia para o monitoramento da suscetibilidade de *B. salubricola* e *G. molesta* para os inseticidas chlorantraniliprole, metaflumizone, phosmet, pyriproxyfen, spinetoram, spinosad e tebufenozide. Apesar da sobrevivência ainda estar baixa nas concentrações diagnósticas testadas, estratégias de manejo da resistência para estas espécies devem ser implementadas para preservar a vida útil dessas moléculas inseticidas.

Tabela 3.5 - Porcentagem de sobrevivência \pm erro padrão da média de populações de *B. salubricola* coletadas em pomares de macieira com bioensaio de concentração diagnóstica para chlorantranilprole (19 ppm), novaluron (510 ppm), phosmet (72 ppm), spinetoram (4,1 ppm), spinosad (13 ppm) e tebufenozide (110 ppm). Safra 2011/12

Inseticida	Sobrevivência (%) \pm EPM							Laboratório SUS
	Macieira							
	B-M/RS1	B-M/RS2	B-M/RS3	B-M/RS4	B-M/RS5	B-M/RS6	B-M/RS7	
Chlorantranilprole	0,24 \pm 0,5 (424) ¹	0,21 \pm 0,2 (428)	0,43 \pm 0,2 (443)	0,00 \pm 0,0 (426)	0,23 \pm 0,2 (422)	0,22 \pm 0,2 (429)	0,00 \pm 0,0 (418)	0,00 \pm 0,0 ^{ns} (423)
Novaluron	1,20 \pm 0,5b (427)	1,38 \pm 0,3b (430)	3,31 \pm 0,5a (436)	0,46 \pm 0,3b (430)	0,68 \pm 0,3b (426)	0,93 \pm 0,3b (431)	0,46 \pm 0,3b (423)	0,45 \pm 0,3b (428)
Phosmet	0,69 \pm 0,3 (431)	0,72 \pm 0,3 (425)	1,12 \pm 0,3 (444)	0,47 \pm 0,3 (431)	0,45 \pm 0,3 (434)	0,91 \pm 0,3 (427)	0,00 \pm 0,0 (422)	0,00 \pm 0,0 ^{ns} (438)
Spinetoram	0,45 \pm 0,3 (436)	0,87 \pm 0,3 (433)	1,13 \pm 0,3 (439)	0,23 \pm 0,2 (436)	0,47 \pm 0,3 (415)	0,65 \pm 0,3 (436)	0,70 \pm 0,3 (414)	0,00 \pm 0,0 ^{ns} (429)
Spinosad	0,22 \pm 0,2 (425)	0,70 \pm 0,3 (423)	0,49 \pm 0,3 (395)	0,00 \pm 0,0 (429)	0,000 \pm 0,0 (426)	0,21 \pm 0,2 (422)	0,00 \pm 0,0 (430)	0,00 \pm 0,0 ^{ns} (425)
Tebufenozide	0,89 \pm 0,3 (431)	1,60 \pm 0,5 (441)	1,14 \pm 0,3 (432)	0,68 \pm 0,3 (428)	0,90 \pm 0,3 (424)	0,67 \pm 0,3 (430)	0,69 \pm 0,3 (418)	0,22 \pm 0,2 ^{ns} (440)

¹valores entre parênteses expressam o número de observações (n);

Tabela 3.6 - Porcentagem de sobrevivência \pm erro padrão da média de populações de *G. molesta* coletadas em pomares de macieira e pessegueiro com bioensaio de concentração diagnóstica para chlorantraniliprole (5,6 ppm), metaflumizone (5,6 ppm), novaluron (38 ppm), phosmet (38 ppm), pyriproxyfen (2.000 ppm), spinetoram (0,62 ppm) e tebufenozide (20 ppm). Safra 2010/2011

Inseticida	Sobrevivência (%) \pm EPM						
	Pessegueiro	Macieira					Laboratório
	G-P/SP1	G-M/SC1	G-M/SC2	G-M/RS1	G-M/RS2	G-M/RS3	SUS
Chlorantraniliprole	0,00 \pm 0,0 (470) ¹	0,00 \pm 0,0 (455)	0,00 \pm 0,0 (483)	0,00 \pm 0,0 (478)	0,00 \pm 0,0 (482)	0,00 \pm 0,0 (477)	0,00 \pm 0,0 ^{ns} (281)
Metaflumizone	1,38 \pm 0,5 (401)	0,00 \pm 0,0 (477)	1,81 \pm 0,8 (485)	1,60 \pm 0,6 (490)	1,83 \pm 0,7 (485)	2,04 \pm 0,8 (484)	1,51 \pm 0,6 ^{ns} (326)
Novaluron	0,45 \pm 0,2 (462)	0,96 \pm 0,4 (433)	0,23 \pm 0,1 (442)	1,25 \pm 0,3 (440)	0,00 \pm 0,0 (422)	1,09 \pm 0,4 (481)	0,72 \pm 0,0 ^{ns} (256)
Phosmet	2,50 \pm 0,7a (503)	1,41 \pm 0,4ab (472)	0,20 \pm 0,2b (506)	0,19 \pm 0,1b (505)	1,00 \pm 0,4ab (499)	0,40 \pm 0,2b (496)	0,20 \pm 0,2b (487)
Pyriproxyfen	0,00 \pm 0,0 (481)	0,00 \pm 0,0 (476)	0,00 \pm 0,0 (495)	0,00 \pm 0,0 (476)	0,00 \pm 0,0 (481)	0,00 \pm 0,0 (488)	0,00 \pm 0,0 ^{ns} (320)
Spinetoram	3,02 \pm 0,5 (462)	3,22 \pm 0,8 (488)	2,35 \pm 0,9 (491)	0,60 \pm 0,3 (488)	1,89 \pm 0,8 (471)	1,79 \pm 0,7 (488)	1,16 \pm 0,5 ^{ns} (485)
Tebufenozide	3,36 \pm 0,7ab (507)	4,56 \pm 0,7a (500)	0,08 \pm 0,4c (480)	0,80 \pm 0,4c (481)	0,20 \pm 0,2c (473)	0,60 \pm 0,4c (485)	1,08 \pm 0,5bc (280)

¹valores entre parênteses expressam o número de observações (n);

Tabela 3.7 - Porcentagem de sobrevivência \pm erro padrão da média de populações de *Grapholita molesta* coletadas em pomares de macieira e pessegueiro com bioensaio de concentração diagnóstica para chlorantraniliprole (5,6 ppm), metaflumizone (5,6 ppm), novaluron (38 ppm), phosmet (38 ppm), pyriproxyfen (2.000 ppm), spinetoram (0,62 ppm) e tebufenozide (20 ppm). Safra 2011/2012

Inseticida	Sobrevivência (%) \pm EPM							
	Pessegueiro				Macieira			Laboratório
	G-P/RS1	G-P/RS2	G-P/RS3	G-P/SP2	G-M/RS4	G-M/SP1	G-M/RS5	SUS
Chlorantraniliprole	0,00 \pm 0,0 (477) ¹	0,18 \pm 0,1 (508)	0,37 \pm 0,2 (515)	0,37 \pm 0,2 (507)	0,20 \pm 0,2 (467)	0,20 \pm 0,2 (494)	0,40 \pm 0,2 (480)	0,54 \pm 0,3 ^{ns} (361)
Metaflumizone	0,81 \pm 0,4 (481)	0,98 \pm 0,4 (491)	2,37 \pm 0,8 (498)	0,43 \pm 0,2 (482)	1,40 \pm 0,6 (499)	1,56 \pm 0,6 (490)	0,78 \pm 0,3 (488)	0,62 \pm 0,4 ^{ns} (321)
Novaluron	0,89 \pm 0,8 (456)	0,33 \pm 0,6 (482)	0,90 \pm 0,6 (456)	1,22 \pm 0,7 (500)	0,50 \pm 0,3 (498)	0,11 \pm 0,1 (432)	1,23 \pm 0,7 (410)	0,92 \pm 0,4 ^{ns} (406)
Phosmet	2,39 \pm 0,5 (492)	1,16 \pm 0,5 (495)	0,81 \pm 0,3 (487)	2,41 \pm 0,8 (510)	2,62 \pm 0,2 (481)	1,56 \pm 0,5 (492)	1,00 \pm 0,6 (485)	0,81 \pm 0,4 ^{ns} (362)
Pyriproxyfen	0,00 \pm 0,0 (537)	0,00 \pm 0,0 (507)	0,00 \pm 0,0 (504)	0,00 \pm 0,0 (479)	0,00 \pm 0,0 (488)	0,00 \pm 0,0 (485)	0,00 \pm 0,0 (500)	0,00 \pm 0,0 ^{ns} (360)
Spinetoram	1,36 \pm 0,6 (503)	1,00 \pm 0,4 (530)	0,82 \pm 0,6 (490)	0,00 \pm 0,0 (452)	0,37 \pm 0,2 (512)	0,00 \pm 0,0 (478)	0,40 \pm 0,2 (509)	0,34 \pm 0,3 ^{ns} (285)
Tebufenozide	0,41 \pm 0,8 (483)	1,19 \pm 0,3 (491)	1,22 \pm 0,4 (481)	1,36 \pm 0,6 (486)	0,61 \pm 0,3 (477)	0,20 \pm 0,2 (480)	1,21 \pm 0,3 (488)	1,07 \pm 0,5 ^{ns} (320)

¹valores entre parênteses expressam o número de observações (n);

3.4 Conclusões

Baseado nos experimentos conduzidos no presente trabalho, conclui-se que:

- O bioensaio de tratamento superficial da dieta artificial é adequado para a caracterização da suscetibilidade de *B. salubricola* e *G. molesta* aos inseticidas chlorantraniliprole, metaflumizone, novaluron, phosmet, pyriproxyfen, spinetoram, spinosad e tebufenozide;
- *B. salubricola* é mais tolerante que *G. molesta* a novaluron e spinetoram;
- As populações de *B. salubricola* avaliadas apresentam alta suscetibilidade a chlorantraniliprole, phosmet, spinetoram, spinosad e tebufenozide;
- As populações de *G. molesta* avaliadas apresentam alta suscetibilidade a chlorantraniliprole, metaflumizone, novaluron, pyriproxyfen e spinetoram;
- Observaram-se diferenças significativas na sobrevivência de populações de *B. salubricola* ao novaluron em pomares de macieira, e de *G. molesta* aos inseticidas phosmet e tebufenozide em pomares de pessegueiro e macieira, respectivamente.

Referências

ARIOLI, C.J. **Técnica de criação e controle de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) na cultura da macieira.** 2007. 83 p. Tese (Doutorado em Fitossanidade) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

ARIOLI, C.J.; BOTTON, M.; CARVALHO, G.A. Controle químico de *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) na cultura do pessegueiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1695-1700, 2004.

ARIOLI, C.J.; MOLINARI, F.; BOTTON, M.; GARCIA, M.S. **Técnica de criação de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) em laboratório utilizando dieta artificial para produção de insetos visando estudos de comportamento e controle.** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2007. 12 p. (Embrapa Uva e Vinho. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 13).

BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London**, Series A, London, v. 160, p. 268-282, 1937.

BERNARDI, D.; SILVA, O.A.B.N. e; BERNARDI, O.; SILVA, A. da; CUNHA, U.S. da; GARCIA, M.S. Eficiência e efeitos subletais de nim sobre *Bonagota salubricola* (Meyrick) (Lepidoptera: Tortricidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 412-419, 2011.

BOTTON, M.; NAKANO, O.; KOVALESKI, A. Controle químico da lagarta-enroladeira *Bonagota cranaodes* (Meyrick) na cultura da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 11, p. 2139-2144, 2000a.

_____. Efeito do raleio de frutos sobre o dano de *Bonagota cranaodes* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae) em cultivares de macieira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 4, p. 717-719, 2000b.

BOTTON, M.; ARIOLI, C.J.; BAVARESCO, A.; SCOZ, P.L. Principais pragas do pessegueiro. In: GARRIDO, L.C.; BOTTON, M. (Org.). **Sistema de produção de pêsego de mesa na Região da Serra Gaúcha**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p. 1-16. (Embrapa Uva e Vinho. Sistemas de Produção, 3).

BOTTON, M.; ARIOLI, C.J.; RINGENBERG, R.; MORANDI-FILHO, W.J. Controle químico de *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae) em laboratório e pomar de macieira. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 76, n. 2, p. 225-231, 2009.

BOTTON, M.; KULCHESKI, F.; COLLETTA, V.D.; ARIOLI, C.J.; PASTORI, P.L. Avaliação do uso do feromônio de confundimento no controle de *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) em pomares de pessegueiro. **Idesia**, Arica, v. 23, n. 1, p. 43-50, 2005.

BOTTON, M.; NAVA, D.E.; ARIOLI, C.J.; GRUTZMACHER, A.D.; GARCIA, M.S. **Bioecologia, monitoramento e controle da mariposa-oriental na cultura do pessegueiro no Rio Grande do Sul**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2011. 11 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 86).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT 2013**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 03 fev. 2013.

CHAVES, C.C. **Comportamento de oviposição e penetração, efeito de inseticidas e inventário de espécies de parasitoides associados à *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) em macieira e pessegueiro**. 2013. 69 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

CIVIDANES, F.J.; MARTINS, I.C.F. Flutuação populacional e previsão de gerações de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) em pessegueiro, *Prunus persica* (Linnaeus) Batsch. **Acta Scientiarum Agronomy**, Londrina, v.28, n.3, p.399-405, 2006.

DE LAME, F.M.; HONG, J.J.; SHEARER, P. W.; BRATTSTEN, L.B. Sex-related differences in the tolerance of Oriental fruit moth (*Grapholita molesta*) to organophosphate insecticide. **Pest Management Science**, Sussex, v. 57, n. 9, p. 827-832, 2001.

GEORGHIOU, G.P. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIOU, G.P.; SAITO, T. (Ed.). **Pest resistance to pesticides**. New York: Plenum, 1983. p. 769-792.

GRÜTZMACHER, A.D.; LOECK, A.E.; FACHINELLO, J.C.; GRÜTZMACHER, D.D.; GARCIA, M.S. Eficiência dos inseticidas fisiológicos Mimic 240 SC (Tebufenozide) e Intrepid 240 SC (Metoxifenozone) no controle da mariposa oriental *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) na cultura da pereira. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 5, n. 3, p. 211-215, 1999.

HARTLEY, H.O. The use of range in analysis of variance. **Biometrika**, London, v. 37, p. 271-280, 1950.

JONES, M.M. **Susceptibility of oriental fruit moth (*Grapholita molesta* (Busck)) to selected insecticides and mixtures**. 2010. 124 p. Thesis (Ph.D. in Entomology) - University of Illinois at Urbana, Champaign, 2010.

KANGA, L.H.B.; PREE, D.J.; PLAPP JR., F.W.; VAN LIER, J.L. Sex-Linked altered acetylcholinesterase resistance to carbamate insecticides in adults of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Guelph, v. 71, n. 1, p. 29-39, 2001.

KANGA, L.H.B.; PREE, D.J.; VAN LIER, J.L.; WALKER, G.M. Management of insecticide resistance in Oriental fruit moth (*Grapholita molesta*; Lepidoptera: Tortricidae) populations from Ontario. **Pest Management Science**, Sussex, v. 59, n. 8, p. 921-927, 2003.

KANGA, L.H.B.; PREE, D.J.; VAN LIER, J.L.; WALKER, G.M. Monitoring for resistance to organophosphorous, carbamate, and pyrethroid insecticides in the oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae). **The Canadian Entomologist**, New York, v. 131, n. 4, p. 441-450, 1999.

KANGA, L.H.B.; PREE, D.J.; VAN LIER, J.L.; WHITTY, K.J. Mechanisms of resistance to organophosphorus and carbamate insecticides in Oriental fruit moth populations *Grapholita molesta* (Busck). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Guelph, v. 59, n. 1, p. 11-23, 1997.

KOVALESKI, A. Pragas. In: _____. (Ed.). **Maçã: fitossanidade**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 10-33. (Frutas do Brasil, 38).

KOVALESKI, A.; RIBEIRO, L.G. **Manejo de pragas na produção integrada de maçãs**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2002. 8 p. (Circular Técnica, 34).

KOVALESKI, A.; BOTTON, M.; EIRAS, A.E.; VILELA, E. **Lagarta-enroladeira da macieira *Bonagota cranaodes* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae):** bioecologia, monitoramento e controle. Bento Gonçalves: EMBRAPA, CNPQV, 1998. 16 p. (Embrapa Uva e Vinho. Circular Técnica, 24).

MAGALHÃES, L.C. **Managing insects and insect resistance: from apple orchards to transcriptomics.** 2011. 108 p. Thesis (Ph.D. in Entomology) - North Carolina State University, Raleigh, 2011.

MEYRICK, E. *Phtheochroa cranaodes*. **Exotic Microlepidoptera**, London, v.5, p. 149-150, 1937.

MONTEIRO, L.B.; HICKEL, E. Pragas de importância econômica em fruteiras de caroço. In: MONTEIRO, L.B.; MAY DE MIO, L.L.; MONTE SERRAT, B.; MOTTA, A.C.V.; CUQUEL, F.L. (Org.). **Fruteiras de caroço: uma visão ecológica.** Curitiba: UFPR, 2004. p. 223-264.

MONTEIRO, L.B.; SOUZA, A. de; BELLI, L. Confusão sexual para o controle de *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae), em pomares de macieira, em Fraiburgo (SC), Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 191-196, 2008.

MYERS, C.T.; HULL, L.A.; KRAWCZYK, G. Comparative survival rates of oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) larvae on shoots and fruit of apple and peach. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, n. 4, p. 1299-1309, 2006a.

_____. Seasonal and cultivar-associated variation in the oviposition preference of oriental fruit moth, (Lepidoptera: Tortricidae) adults and feeding behavior of neonate larvae in apples. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, n. 2, p. 349-358, 2006b.

NAVA, D.E. **Controle biológico de insetos-praga em frutíferas de clima temperado: uma opção viável, mas desafiadora.** Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 20 p. (Documentos, 2008).

PARRA, J.R.P.; EIRAS, A.E.; HADDAD, M.L.; VILELA, E.F.; KOVALESKI, A. Técnica de criação de *Phtheochroa cranaodes* Meyrick (Lepidoptera: Tortricidae) em dieta artificial. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 4, p. 537-543, 1995.

PASTORI, P.; ARIOLI, C.; BOTTON, M.; MONTEIRO, L.B.; MAFRA-NETO, A. Avaliação da técnica de interrupção sexual utilizando emissores SPLAT[®] visando ao controle de *Bonagota salubricola* (Meyrick) e *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) na pré-colheita de maçãs da cultivar 'fuji'. **Bioassay**, Piracicaba, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2008.

PASTORI, P.L.; ARIOLI, C.J.; BOTTON, M.; MONTEIRO, L.B.; STOLTMAN, L.; MAFRA NETO, A. Integrated control of two tortricid (Lepidoptera) pests in apple orchards with sex pheromones and insecticides. **Revista Colombiana de Entomologia**, Bogotá, v. 38, p. 224-230, 2012.

PEREIRA, J. **Eficácia de *Bacillus thuringiensis* no controle de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) e *Bonagota salubricola* (Meyrick, 1937) (Lepidoptera: Tortricidae) e identificação de biótipos por meio de bioensaios e infravermelho próximo.** 2012. 61 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

PREE, D.J.; WHITTY, K.J.; Van DRIEL, L.; WALKER, G.M. Resistance to insecticides in oriental fruit moth populations (*Grapholita molesta*) from the Niagara peninsula of Ontario. **The Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 130, n. 3, p. 245-256, 1998.

RODRIGUES, M.L.; GARCIA, M.S.; NAVA, D.E.; BOTTON, M.; PARRA, J.R.P.; GUERRERO, M. Selection of *Trichogramma pretiosum* lineages for control of *Grapholita molesta* in peach. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 94, n. 3, p. 398-403, 2011.

ROUSH, R.T. Designing resistance management programs: How can you choose? **Pesticide Science**, Oxford, v. 26, n. 4, p. 423-441, 1989.

ROUSH, R.T.; MCKENZIE, J.A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 32, p. 361-380, 1987.

ROUSH, R.T.; MILLER, G.L. Considerations for design of insecticide resistance monitoring programs. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 79, n. 2, p. 293-298, 1986.

SALLES, L.A.B. Mariposa-oriental, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). In: VILELA, E.F.; ZUCCHI, R.A.; CANTOR, F. (Ed.). **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 42-45.

SAS INSTITUTE. **Statistical analysis system: getting started with the SAS learning**. Cary, 2000. 81 p.

SHAPIRO S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, Oxford, v. 52, n. 3/4, p. 591-611, 1965.

SIEGWART, M.; MONTEIRO, L.B.; MAUGIN, S.; OLIVARES, J.; MALFITANO-CARVALHO, S.; SAUPHANOR, B. Tools for resistance monitoring in oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) and first assessment in Brazilian populations. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 104, n. 2, p. 636-645, 2011.

SILVA, O.A.B.N. e; BOTTON, M.; GARCIA, M.S.; SILVA, A. da. Efeito de inseticidas reguladores de crescimento sobre ovos, lagartas e adultos de *Grapholita molesta* (BUSCK) (LEP.: Tortricidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n.2, p. 420-428, 2011.

SILVA, O.A.B.N. e; BOTTON, M.; GARCIA, M.S.; BISOGNIN, A.Z.; NAVA, D.E. Desenvolvimento e reprodução da mariposa oriental em macieira e pessegueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 10, p. 1082-1088, 2010.

SIQUEIRA, P.R.E.; GRÜTZMACHER, A.D. Avaliação de inseticidas para controle da *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) em pomares de pessegueiro sob produção integrada na região da campanha do RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 11, n. 2, p. 185-191, 2005.

USMANI, K.A.; SHEARER, P.W. Susceptibility of male oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) populations from New Jersey apple orchards to azinphosmethyl. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 94, n. 1, p. 233-239, 2001.

4 VARIABILIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE *Grapholita molesta* (LEPIDOPTERA: TORTRICIDAE) PROVENIENTES DE POMARES DE MAÇÃ E PÊSSEGO NO SUL DO BRASIL

Resumo

Grapholita molesta (Busck, 1916) é uma importante praga que ataca macieira e pessegueiro. Nas condições brasileiras, em regiões onde os pomares de macieira e pessegueiro são plantados próximos, acredita-se que *G. molesta* disperse para a cultura da maçã após a colheita do pêssigo, dependendo da proximidade espacial e temporal dos pomares. Neste cenário, para aprimorar estratégias de manejo para esta praga o objetivo deste trabalho foi analisar a estrutura genética e o fluxo gênico entre populações de *G. molesta* provenientes de pomares de maçã e pêssigo dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, com o uso de marcadores moleculares mitocondriais (*COI* e *nad6*) e microssatélites. Foi detectada estruturação genética significativa entre as populações de *G. molesta* que infestam as culturas da macieira e pessegueiro, com indicação de estruturação em função de hospedeiros ($\Phi_{ST} = 0,198$; $P < 0,05$) e também da distância geográfica ($r=0,545$; valor de $p<0,001$). Em geral, a variabilidade genética de *G. molesta* foi bem distribuída nas regiões produtoras de maçã e pêssigo. As barreiras geográficas, as condições edafoclimáticas e o manejo da praga parecem estar limitando o acasalamento, entre os indivíduos das populações distintas avaliadas. Portanto, devido ao baixo fluxo gênico entre as populações de *G. molesta*, as estratégias de manejo da resistência podem ser implementadas no âmbito local. Algumas hipóteses são discutidas no presente trabalho na tentativa de explicar melhor o padrão de estrutura genética observada, assim como suas implicações para o manejo da praga.

Palavras-chave: Análise de variância molecular; Mariposa oriental; Fluxo gênico

Abstract

Grapholita molesta (Busck, 1916) is an important pest that attacks apple and peach. In Brazilian conditions, where apple and peach orchards are planted close, it is believed that *G. molesta* disperse to apple orchards after harvesting peaches, depending on the spatial and temporal proximity of orchards. In this scenario, to improve management strategies for this pest, the main objective of this study was to analyze the genetic structure and gene flow among *G. molesta* populations from apple and peach orchards from Rio Grande do Sul and Santa Catarina states, based on mitochondrial markers (*COI* e *nad6*) and microsatellites. Significant genetic structure among *G. molesta* populations was detected with indication of structure based on host plant ($\Phi_{ST} = 0,198$; $P < 0,05$) and also the geographic distance ($r=0,545$; valor de $p<0,001$). In general, the genetic variability of *G. molesta* is well distributed in the producing regions of apple and peach. The geographic barriers, soil and climatic conditions and pest management can be limiting the mating among individuals from distinct populations evaluated in this study. Therefore, due to low gene flow among *G.*

molesta populations resistance management strategies can be implemented at local level. Some hypotheses are discussed in this study to better explain the observed pattern of genetic structure as well as its implications for managing this pest.

Keywords: Analysis of molecular variance; Oriental Fruit Moth; Insecticides resistance; Gene flow

4.1 Introdução

Grapholita molesta (Busck, 1916) é uma espécie restrita a poucas plantas hospedeiras da família Rosaceae, incluindo o pessegueiro, a macieira, a pereira e o marmeleiro. Contudo, o hospedeiro principal deste inseto-praga é o pessegueiro (SALLES, 2001; BOTTON et al., 2003; MONTEIRO; HICKEL, 2004; MYERS, HULL; KRAWCZYK., 2006a, 2006b; MYERS; HULL; KRAWCZYK, 2007; ARIOLI, 2007).

No Brasil, o cultivo da macieira e do pessegueiro vai desde o sudeste do país (São Paulo e Minas Gerais) até a região Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), em locais com diferentes condições climáticas e características de relevo. Estes habitats diversificados podem fornecer oportunidades para as subdivisões de população de *G. molesta* que podem estar adaptadas localmente. Portanto, em regiões onde os pomares de macieira e pessegueiro são plantados próximos, acredita-se que *G. molesta* disperse para a cultura da maçã após a colheita do pêssego, dependendo da proximidade espacial e temporal dos pomares (POLTRONIERI et al., 2008), com implicações diretas no manejo dessa praga. Contudo, ainda não há estudos sobre estruturação genética em populações de *G. molesta* no Brasil.

São muitos os fatores que influenciam na estruturação genética, podendo ser citados a distância geográfica (FUENTES-CONTRERAS et al., 2008) e inclusive a utilização de inseticidas (FRANCK et al., 2007; FRANCK; TIMM, 2009). No Brasil, os pólos produtores de maçã e pêssego estão localizados distantes um do outro (PROTAS; MADAIL, 2003; BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL - BRDE, 2011). O maior município produtor de pêssego no Brasil (Pelotas-RS) está localizado aproximadamente a 490 Km do maior município produtor de maçã (Vacaria-RS), e esta distância pode contribuir para a estruturação das populações, principalmente devido à baixa capacidade de voo da mariposa oriental (YETTER; STEINER, 1932; GONZALEZ, 2003).

Outro importante fator de estruturação genética das populações de praga tem sido o manejo adotado no pomar. Para *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) foi detectada estruturação das populações de acordo com o histórico de aplicações de inseticidas (FRANCK et al., 2007). Diante destas observações, pode-se esperar que ocorra estruturação da espécie *G. molesta* no Brasil devido à fragmentação dos maiores polos de produção de maçã e pêsego e também devido a diferentes práticas de manejo adotadas em cada propriedade.

O entendimento da estrutura populacional e do fluxo gênico entre as populações permitem estimar o grau de isolamento ao longo do tempo, permitindo identificar subpopulações que podem estar associadas a seus hospedeiros preferenciais (MARTEL et al., 2003). Essas informações são essenciais para o delineamento e refinamento de práticas de manejo (CAPRIO; TABASHNIK, 1992; ALSTAD; ANDOW, 1995), principalmente no tocante ao manejo de resistência a inseticidas (GEORGHIOU; TAYLOR, 1977a, b). Sendo assim, este trabalho teve por objetivos analisar a estrutura genética e o fluxo gênico entre populações de *G. molesta* em macieira e pessegueiro, com o uso de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites em populações coletadas nas principais regiões produtoras de maçã e pêsego na região Sul do Brasil.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Coleta dos insetos e extração do DNA genômico

As coletas de insetos foram realizadas em pomares de pessegueiro e macieira nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, cultivados no sistema convencional (Tabela 4.1). Para as coletas foram instaladas 10 armadilhas do tipo Delta branca (10 cm de altura × 19,5 cm de largura × 28,4 cm de comprimento) e com área de fundo adesivo igual a 385,3 cm², disposta na parte externa da copa a 1,70m de altura (HICKEL; VILELA; SOUZA, 2003), com feromônio sexual sintético em cada área amostrada. Os adultos capturados foram retirados diariamente, no intervalo de uma semana, com auxílio de uma pinça e posteriormente foram acondicionados em tubos tipo Eppendorf (1,5 mL) contendo álcool 92°GL. Estas amostras foram devidamente identificadas e mantidas no freezer a -20°C até o momento da extração do DNA.

O DNA genômico total foi extraído do inseto adulto inteiro, utilizando o kit DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen AG, Hombrechtikon, Switzerland), conforme instruções do fabricante. O DNA foi eluído em tampão AE e a concentração de DNA de cada amostra foi estimada por espectrofotômetro. A partir das concentrações estimadas, foi feita a diluição das amostras em água ultrapura milliQ, padronizando-se as concentrações das amostras em 5ng de DNA total/ μ L. Todas as amostras foram armazenadas a -20°C .

Tabela 4.1 - Identificação das amostras de *G. molesta*, com código da população, planta hospedeira, localidade, referências geográficas, data de coleta e número de espécimes sequenciados e genotipados. Safra 2011/12

Código	Hospedeiro	Município	Longitude	Latitude	Data de coleta	Número de espécimes		
						sequenciados		genotipados
						<i>COI</i>	<i>nad6</i>	microssatélites
RSBG_Pêssego1	Pêssego	Bento Gonçalves, RS	51° 24.4'	29° 08.1'	Jan/2012	10	8	24
RSBG_Maçã1	Maçã	Bento Gonçalves, RS	50° 55.7'	29° 09.3'	Fev/2012	9	8	24
RSBG_Maçã2	Maçã	Bento Gonçalves, RS	51° 31.1'	29° 10.0'	Fev/2012	9	8	24
RSPEL_Pêssego1	Pêssego	Pelotas, RS	52° 26.0	31° 40.0'	Fev/2012	9	8	24
RSPEL_Pêssego2	Pêssego	Pelotas, RS	52° 32.8'	31° 25.7'	Fev/2012	10	8	24
RSBG_Maçã3	Maçã	Bento Gonçalves, RS	51° 24.9'	29° 07.5'	Fev/2012	9	8	24
RSBG_Pêssego2	Pêssego	Bento Gonçalves, RS	51°24.9'	29° 07.6'	Jan/2012	10	8	24
SCVID_Pêssego	Pêssego	Videira, SC	51° 9.0'	27° 1.00'	Abr/2012	9	8	24
SCVID_Maçã	Maçã	Videira, SC	51° 0.7'	26° 58.0'	Abr/2012	9	8	24

4.2.2 Amplificação e sequenciamento do mtDNA

A subunidade I do gene mitocondrial citocromo oxidase (*COI*) e a subunidade 6 da NADH desidrogenase (*nad6*) foram escolhidas para as análises populacionais desses indivíduos. Os iniciadores (*primers*) utilizados para amplificar cada uma das regiões propostas juntamente com os respectivos programas de amplificação específicos para cada uma das regiões estão apresentados no Quadro 5.1.

As reações de PCR foram feitas para um volume final de 20 μ L, contendo 2 μ L de DNA (5ng/ μ L); 0,4 μ L de dNTP (40,0 μ M); 2 μ L de tampão para *Taq* polimerase (1x); 2,0 μ L de dimetilsulfoxi (DMSO 5%); 3 μ L de MgCl₂ (2,0 mM); 9,60 μ L de água Milli-Q; 0,2 μ L de *Taq* polimerase (1,0 u) e 0,4 μ L de cada iniciador direto e reverso (2,0 mM).

Os produtos da amplificação foram avaliados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,0% contendo 0,5 μ g/mL de brometo de etídio, em tampão 1x TAE (40mM Tris-acetato e 1mM EDTA) em voltagem constante (100V) e visualizados em transluminador UV.

Os amplicons foram purificados enzimaticamente utilizando o kit ExoSAP (Amersham Biosciences), que degrada iniciadores e dNTPs não incorporados durante as reações de amplificação. As reações com ExoSAP foram feitas usando 0,33 μ L de EXO I, 0,33 μ L de SAP, 0,34 μ L água Milli-Q e um volume 6-8 μ L de PCR. Estas reações foram incubadas em um termociclador Veriti 96 well modelo 9902 (Applied Biosystems) programado para um ciclo a 37°C por 30 min e um ciclo a 80°C por 15 minutos. Após purificação, a concentração de DNA de cada amostra foi estimada pela intensidade de fluorescência emitida pelo corante brometo de etídio sob UV em géis de agarose a 1,0%. Essa intensidade foi comparada a de padrões com pesos moleculares e concentrações específicas do marcador "*Low DNA Mass Ladder*" (Invitrogen).

Após a amplificação e purificação de cada região, 1 μ L de cada amostra + 1 μ L de cada iniciador direto foram acondicionados em células de microplacas de 96 células e vedadas com filme adesivo em polipropileno cyclerseal (Axygen) para evitar evaporação e colocadas no interior de caixas de isopor contendo gelo em gel e encaminhadas ao Laboratório de Biotecnologia do Centro de Citricultura Sylvio Moreira, em Cordeirópolis-SP, para sequenciamento no sequenciador automático ABI (modelo 3700) (Applied Biosystems), utilizando BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits.

As regiões sequenciadas foram analisadas no programa FinchTV v. 1.4.0 (Geospiza Inc.) e alinhadas com auxílio da ferramenta ClustalW no programa Mega 5 (TAMURA et al., 2011).

Gene	Iniciador (F/R)	Sequência (5'-3')	Programas
<i>COI-5'</i>	LCO ¹ (F)	GGT CAACAA ATC ATA AAG ATA TTG G	1 ciclo: 95°C - 5 mim, 35 ciclos: 94°C - 30 s, 47°C - 30 s e 72°C - 1 min e 30 s, 1 ciclo: 72°C - 10 min.
	Nancy ² (R)	CCT GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC	
<i>nad6</i>	tPro-J10090 ³ (F)	ATC WAT AAT CTC CAA AAT TAT	1 ciclo: 94°C - 5 mim, 35 ciclos: 94°C - 45 seg. 45°C - 45 s e 72°C - 1 min e 30 s, 1 ciclo 72°C - 5 min.
	<i>nad6</i> -N10624 (R)	GGN CCA TAA AAA ATA TTW GT	

¹FOLMER et al., 1994; ²CATERINO; SPERLING, 1999; ³SILVA-BRANDÃO et al., 2011.

Quadro 4.1 – Iniciadores utilizados para o sequenciamento de espécimes de *G. molesta* e seus respectivos programas de amplificação

4.2.3 Amplificação e genotipagem dos marcadores microssatélites

Foram testados oito pares de iniciadores (Tabela 4.2) para amplificação e genotipagem dos locos microssatélites. Estes iniciadores foram desenvolvidos, testados e utilizados por Torriani et al. (2010) para amostras de *G. molesta* da Itália. Todos os iniciadores diretos utilizados possuíam em sua extremidade 5' uma sequência de 18 nucleotídeos (iniciador universal M13: (5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3')), formando uma "cauda de M13". Nos primeiros ciclos, os quais foram realizados com a temperatura de anelamento específica para o iniciador direto com "cauda M13", ocorreu a incorporação deste iniciador aos produtos de PCR. Posteriormente, em função de sua concentração inferior, ocorreu o esgotamento do iniciador direto com "cauda M13". A partir desse momento, alterou-se também a temperatura de anelamento da reação de PCR para 53°C, permitindo o anelamento do iniciador direto M13 (marcado com fluoróforo) sobre os amplicons previamente formados nos primeiros ciclos da reação, gerando produtos de PCR marcados com substâncias fluorescentes (SCHUELKE, 2000). Deste modo, os locos microssatélites ficaram marcados com fluorescência específicas

do FAM, HEX e NED, permitindo que a genotipagem seja feita de forma multiplex em sequenciador automático (MISSIAGGIA; GRATTAPAGLIA, 2006), ou seja, para que os três locos diferentes pudessem ser genotipados em uma mesma corrida.

As reações de amplificação foram realizadas com um volume de 20 μL , contendo: 2 μL de DNA (5ng/ μL); 0,05 μL (0,5mM) de fluoróforo (FAM, HEX ou NED); 0,4 μL de dNTP (40,0 μM); 2 μL de tampão para *Taq* polimerase 1X; 2,0 μL de dimetilsulfoxi (DMSO 5%); 3 μL de MgCl_2 (2,0 mM); 9,55 μL de água Milli-Q; 0,2 μL de *Taq* polimerase (1,0 u) e 0,4 μL de cada iniciador direto e reverso (2,0 mM). As reações foram incubadas em um termociclador Veriti 96 well modelo 9902 (Applied Biosystems) programado para realizar uma desnaturação inicial a 95°C por 15 min., 30 ciclos compostos por 30 s. de desnaturação a 95°C, 45 s. com temperatura de anelamento dependendo do iniciador (50°C ou 58°C), 45 s. a 72° C para ação da *Taq* polimerase seguido de 8 ciclos compostos por 30 s. de desnaturação a 95°C, 53° C por 45 s. com temperatura de anelamento para os fluoróforos e 45 s. a 72° C para sua ação, finalizando com 30 min. para extensão das fitas de DNA a 72° C (SCHUELKE, 2000; TORRIANI et al., 2010). Para a padronização das reações de PCR foram testadas três amostras, variando as temperaturas de anelamento dos iniciadores (50, 52, 54, 58 e 60°C) e as concentrações de DNA e MgCl_2 . Os produtos da amplificação foram realizados por meio de eletroforese em gel de agarose a 2,0% contendo 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídio, em tampão 1x TAE (40mM Tris-acetato e 1mM EDTA) em voltagem constante (100V) e visualizados em transluminador UV.

Os produtos das PCRs foram diluídos na proporção de 1:10 com água deionizada para uma solução final de 30 μL contendo: 3 μL do produto de PCR marcado com HEX + 3 μL do produto de PCR marcado com NED + 2 μL do produto de PCR marcado com FAM + 22 μL de água ultrapura. Para a corrida no sequenciador automático foi feita uma solução em microplacas (MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate) (Life Technologies, Carlsbad, California) para um volume final de 8,0 μL contendo 2,0 μL do produto da diluição das PCRs (dos três fluoróforos juntos), 7,75 μL de Formamida Hi-Di (Life Technologies), usado para ressuspender as amostras de DNA antes da análise em sequenciador automático, e 0,25 μL de ROX (Life Technologies), um marcador de peso molecular de 35 a 500 pb marcado com fluoróforo vermelho e usado para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA. As microplacas foram vedadas com filme adesivo em polipropileno cyclorseal (Axygen) para evitar evaporação, e envoltas por papel alumínio para proteger da luz (os fluoróforos são sensíveis à luz, podendo perder a eficiência de fluorescência, comprometendo sua detecção no sistema de

laser no sequenciador). As placas foram acondicionadas em caixas de isopor contendo gelo em gel e encaminhadas ao Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH) – USP – São Paulo. Os produtos da amplificação foram genotipados na matriz DS-30 em sequenciador automático (ABI, modelo 3730) por cerca de duas horas e trinta minutos a 70 watts de potência, de acordo com a metodologia de Schuelke (2000).

Tabela 4.2 - Marcadores microssatélites utilizados (locos), número de acesso no GenBank, F-*primer forward* e R-*primer reverse*, sequência dos primers (5' – 3'), motivo, tamanho esperado (pb) e temperatura de anelamento (T_a °C) (modificado de TORRIANI et al., 2010)

Locos	Número GenBank	Sequências do Primer (5'–3')	Motivo	Tamanho esperado(bp)	T_a (°C)
<i>Gm01</i>	HM177459	F: TGCGGTAGGCTCTCAGTTATC R: ATGCTACATACGCCCAAACC	(AC) ₁₄	161-205	50
<i>Gm02</i>	HM177460	F: CTCAGACCTGAGGGAACGAC R: CAACACACAGTAAGTTGAGTTTTGTC	(GA) ₂₂	74-100	50
<i>Gm03</i>	HM177461	F: TCCTCAGCAGTGAAGTACCG R: TTGAGTTCGGGAATTGAACC	(AG) ₂₀ (CA) ₂ (GA) ₁₁	140-230	58
<i>Gm04</i>	HM177462	F: GGATGACTAAGTAAGCGGATTTC R: CTTTTGGTAAGGCACCCATC	(TC) ₁₀ (CC)(TC) ₃ (TG) ₁₂	136-200	50
<i>Gm06</i>	HM177464	F: CCTATGTCACCAGCCTGAGC R: TGTAATACCAGTATCCAATAGTACGAC	(GT) ₄ (ATGA)(TA) ₃ (TG) ₂ (AGTTA)(GT) ₁₂	98-123	50
<i>Gm07</i>	HM177465	F: GCAGGAAGCGATACTGCAAC R: GAAGCATCGAACCTTGTCG	(TGTA) ₆	92-234	50
<i>Gm08</i>	HM177466	F: CCTACCCCTCTGGGAAACAG R: CTGGGCATCCTTCCGTTAG	(GTAT) ₆	106-122	50
<i>Gm10</i>	HM177468	F: GTAGCGTTGACAGGCGTTG R: TGCGTTTACTTAGAGTATCTGTGC	(CA) ₁₇	168-220	50

4.2.4 Estimativas de variabilidade genética com marcadores mitocondriais

As estatísticas gerais das sequências dos genes mitocondriais e as distâncias genéticas foram estimadas no programa Mega v. 4.0 (TAMURA et al., 2007). A diversidade nucleotídica (π) e diversidade de haplótipos (\hat{H}) foram estimadas no programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

Os dendrogramas das relações fenéticas entre os indivíduos amostrados foram obtidos usando-se o conjunto de dados combinados (*COI* e *nad6*), empregando-se o programa Mega v. 4.0 (TAMURA et al., 2007) e o critério de agrupamento Neighbor-Joining (NJ) e distância-*p*; o teste não-paramétrico de “bootstrap” foi aplicado para estimar a confiabilidade dos ramos, com 1.000 replicações.

A análise molecular de variância (AMOVA) foi realizada para a avaliação da estrutura genética entre as populações de *G. molesta* no programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Foram conduzidos dois tipos de análises para testar a existência de variação molecular atribuída à presença de estrutura genética: (a) entre indivíduos em todas as populações e (b) entre indivíduos dentro dos grupos macieira \times pessegueiro. A estruturação entre os locais amostrados foi interpretada pelos índices ϕ associados aos diferentes níveis hierárquicos em que se distribui a variação (ϕ_{CT} = diferenciação entre grupos; ϕ_{SC} = diferenciação entre locais dentro dos grupos e ϕ_{ST} = diferenciação entre locais entre grupos). Além disso, também foi estimada uma matriz de distâncias linearizadas par-a-par de Slatkin (SLATKIN, 1995) no programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

A hipótese de isolamento genético causado pela distância geográfica foi avaliada pelo teste de Mantel (MANTEL, 1967) que relaciona o logaritmo das distâncias genéticas e geográfica, usando-se o programa Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), e 10.000 permutações.

4.2.5 Análise da genotipagem e estimativas de variabilidade genética com marcadores microssatélites

Os dados oriundos da genotipagem no sequenciador automático foram analisados utilizando-se o programa GeneMarker® v. 1.91 demo (SoftGenetics LLC®), onde foi possível observar o tamanho e a frequência dos alelos para cada indivíduo comparado ao padrão ROX 500.

O programa MICRO-CHEKER (VAN OOSTERHOUT et al., 2004) foi utilizado para verificar a presença de alelos que não são amplificados (alelos nulos), a dominância de alelos e a presença de “*stutters*” (bandas duplicadas). A presença de alelos nulos nos locos induz ao erro de genotipagem, podendo resultar no déficit de heterozigotos observados, causando desvios nas proporções do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). As frequências alélicas e genotípicas dos locos foram submetidas a um teste de aderência (teste exato de Fisher) para o cálculo das proporções de EHW, utilizando o programa Genalex v. 6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

Para estimar a variabilidade genética intrapopulacional foram estimados o número médio de alelos por população (n_A), número médio de alelos por loco (A), heterozigozidade observada (H_o) e esperada (H_E) por loco e as heterozigozidades observadas (H_o) e esperadas (H_E) médias por população, assim como o índice de fixação intrapopulacional médio por loco e por população, utilizando o programa Genalex v. 6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006).

Para o estudo da variabilidade interpopulacional e estruturação genética de *G. molesta*, foi feita a avaliação das estimativas F de Wright (1951), a partir de uma base não viesada, obtida por meio do estimador de Weir e Cockerham (1984) no programa FSTAT (GOUDET, 2001). Estas estimativas são análogas ao modelo de Nei (1978) ($f = F_{IS}$; $F = F_{IT}$ e $\theta = F_{ST}$). O f é o coeficiente de endogamia, calculado como a média de todos os indivíduos de todos os fragmentos populacionais; o F é a endogamia total da população e o θ é o efeito da endogamia devido a subdivisão populacional. Caso uma população apresente altas taxas de fluxo gênico entre os fragmentos, o θ é baixo; no entanto, se as taxas de fluxo gênico são baixas, as populações divergem e tornam-se endogâmicas, e o valor de θ aumenta.

Com o auxílio do programa Genalex v. 6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006), foi desenvolvida uma análise de isolamento por distância pelo teste de Mantel (MANTEL, 1967) a partir de uma matriz composta pela distância geográfica e pela distância genética (R_{ST})

linearizada entre as populações, verificando assim a possível ocorrência de estruturação genética devido à distância geográfica entre as populações em estudo.

Foi realizada uma análise para estimar as taxas de migração recente entre as populações, por meio do programa BayesAss v. 1.3 (Bayesian Inference of Recent Migration Using Multilocus Genotypes) (WILSON; RANNALA, 2003). Com isso, foi possível verificar a porcentagem de migrantes com a qual cada população contribuiu e assim inferir uma possível rota de migração para as populações de *G. molesta* na sua área de ocorrência no Brasil.

Para visualizar o padrão de estruturação populacional de *G. molesta*, foi utilizado o programa Genalex v. 6.4 (PEAKALL; SMOUSE, 2006) para desenvolver uma análise multivariada de coordenadas principais (PCoA, “Principal Coordinate Analysis”) a partir dos valores de R_{ST} par-a-par.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Medidas de variabilidade genética com marcadores mitocondriais

Foram analisadas 84 sequências nucleotídicas das regiões *COI* (442 pb) e *nad6* (446 pb), totalizando 887 pb de mtDNA. O gene *nad6* foi o que apresentou menor número médio de diferenças nucleotídicas (k) (Tabela 4.3). A composição nucleotídica média dos 84 indivíduos foi de 44,2% de Timina; 11,5% para Citosina; 33,9% para Adenina e de 10,4% para Guanina.

O menor número de sítios polimórficos foi encontrado para a região *COI*. A análise dos dados agrupados revelou oito haplótipos diferentes nas 84 sequências (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Resumo das estatísticas das sequências nucleotídicas

	<i>COI</i>	<i>nad6</i>	<i>COI+nad6</i>
Total pares de bases (pb)	442	446	887
Nº de sequências	84	72	84
Sítios variáveis (% de variação)	2 (0,4%)	3(0.6%)	5(0,5%)
Nº de sítios polimórficos	2	3	2
Nº de haplótipos	3	4	8
Diversidade de haplótipos (\hat{H})	0,421	0,421	0,412
π (Jukes-Cantor)	0,00156	0,00104	0,00156
Nº médio de diferenças nucleotídicas (k)	0,688	0,462	0,688
Frequências nucleotídicas (%)			
T/C	39,1/14,9	50,9/7,2	44,24/11,5
A/G	31,9/14,0	36,5/5,4	33,9/10,4

A diversidade haplotípica (\hat{H}), que é a probabilidade de duas sequências escolhidas ao acaso serem diferentes em uma população, que foi detectada no presente trabalho variou de 0,0 a 0,7. Este maior valor foi obtido para os indivíduos amostrados em pessegueiro na população coletada no município de Pelotas-RS. A diversidade nucleotídica (π), que representa o número de nucleotídeos diferentes por sítio entre as sequências escolhidas ao acaso, variou de 0 - 0,002 (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Distribuição de haplótipos e índices de variabilidade genética para *G. molesta* com os dados combinados (*COI* + *nad6*)

Código	Locais de coleta	N ⁽¹⁾	Nh ⁽²⁾	Haplótipo (N° de indivíduo)	\hat{H} (s.d.) ⁽³⁾	π (s.d.) ⁽⁴⁾
RSBG_Pêssego1	Bento Gonçalves, RS	10	3	h1(6), h2(3), h3(1)	0,2 ± 0,15	0,000
RSBG_Maçã1	Bento Gonçalves, RS	9	3	h1(7), h2(1), h3(1)	0,2 ± 0,16	0,000
RSBG_Maçã2	Bento Gonçalves, RS	10	4	h1(7), h3(1), h4(1) h5(1)	0,5 ± 0,16	0,001 ±0,001
RSPEL_Pêssego1	Pelotas, RS	9	6	h1(1), h2(1), h3(3), h4(1), h6(1), h7(2)	0,7 ± 0,09	0,002 ±0,001
RSPEL_Pêssego2	Pelotas, RS	11	6	h1(1), h2(3), h3(3), h4(1), h7(1) h8(2)	0,6 ± 0,08	0,002 ±0,001
RSBG_Maçã3	Bento Gonçalves, RS	9	3	h1(7), h2(1), h3(1)	0,2 ± 0,16	0,000
RSBG_Pêssego2	Bento Gonçalves, RS	10	2	h1(6), h2(4)	0,0 ± 0,00	0,000
SCVID_Pêssego	Videira, SC	10	3	h1(8), h2(1), h8(1)	0,2 ± 0,15	0,000
SCVID_Maçã	Videira, SC	6	3	h1(3), h2(2), h3(1)	0,3 ± 0,21	0,001 ±0,001
Total		84	33	-	-	-
Média		9,3	3.6	-	0.52	-

⁽¹⁾ Número de indivíduos analisados; ⁽²⁾ Número de haplótipos encontrados em cada localidade; ⁽³⁾ Diversidade haplotípica (\pm desvio padrão); ⁽⁴⁾ Diversidade nucleotídica (\pm desvio padrão)

Foi constatada uma baixa diferenciação entre as populações de *G. molesta*, conforme os resultados obtidos nas análises de distância do mtDNA (Figura 4.1). O dendrograma obtido não foi capaz de separar as populações de *G. molesta* em grupos distintos associados à cultura de macieira ou pessegueiro. Portanto, a resolução da árvore não permitiu a detecção da escolha preferencial pela praga por um determinado hospedeiro. Por outro lado, foram detectados dois grupos bem distintos formados principalmente pelas populações coletadas em Pelotas-RS e Bento Gonçalves-RS, indicando um componente geográfico para esta diferenciação.

Utilizando a técnica de AFLP para populações de tortricídeos da África do Sul, Timm; Geertsema e Warnich (2008), estudaram a variabilidade genética de seis espécies (*C. pomonella*, *T. leucotreta*, *T. batrachopa*, *Cr. Peltastica*, *E. acerbella* e *G. molesta*) e não detectaram evidências de desenvolvimento de raças associadas a hospedeiros para estes insetos. Segundo os autores, fatores como a capacidade de dispersão e as práticas agrícolas têm efeitos mais importantes sobre a estruturação genética das populações de Tortricídeos da África do Sul do que o isolamento geográfico ou a utilização de hospedeiros.

COI + nad6

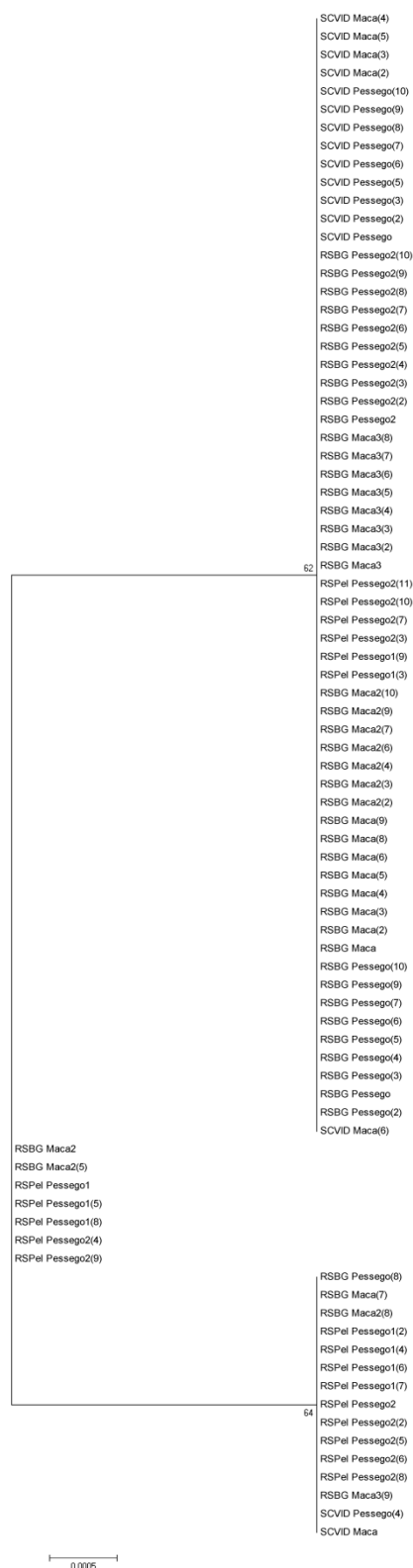


Figura 4.1 - Árvore usando critério de Neighbor-Joining obtida com o modelo distância- p para populações de *G. molesta*. Números nos ramos indicam os valores de 1.000

A análise molecular de variância (AMOVA) revelou que há estruturação genética entre as populações estudadas em função dos hospedeiros macieira e pessegueiro ($p < 0,05$). As estimativas indicaram que grande parte da variação genética fica retida dentro das populações (aproximadamente 80%), enquanto que a variância que ocorre entre as populações não passou de 22,5 % (Tabela 4.5). Resultados semelhantes foram encontrados por Torriani et al. (2010), com marcadores microsatélites, os quais analisaram a estrutura genética de populações de *G. molesta* no norte da Itália. Apesar da diferenciação genética de *G. molesta* ter sido considerada de baixa a moderada no estudo de Torriani et al. (2010), os autores salientam que esta diferenciação não foi desprezível. Eles ainda sugerem que devido ao elevado potencial de adaptação a diferentes condições ambientais e altas taxas reprodutivas permitem que *G. molesta* forme populações localmente diferenciadas. Vários estudos com marcadores moleculares para outras espécies de lepidópteros-praga também demonstram que em muitos casos a variabilidade dentro das populações é alta e entre populações é baixa (MARTINELLI et al., 2006; PAVINATO, 2010; KHAGHANINIA et al., 2011; ALBERNAZ et al., 2012; DOMINGUES et al., 2012).

Os índices de fixação resumem a estrutura de uma população natural com mensuração de suas frequências alélicas. Neste trabalho, embora o ϕ_{ST} encontrado para as populações possa ser considerado alto, este não foi significativo ($\phi_{ST} = 0,208$; $P = 0,25$) entre populações, mas apresentou significância quando analisado entre culturas ($\phi_{ST} = 0,198$; $P < 0,05$).

A falta de estruturação genética entre populações pode ser reflexo da origem deste inseto. Por ser uma praga recentemente introduzida no País (algumas dezenas de anos), provavelmente ainda não teve tempo suficiente para acumular mutações no mtDNA suficientes para diferenciá-las. Entretanto, as poucas diferenças presentes entre as sequências permitiram a detecção de estruturação da espécie em função de hospedeiros. Este resultado é conflitante com os obtidos por Timm; Geertsema e Warnich, (2008), para tortricídeos (*C. pomonella*, *C. peltastica*, *E. acerbella*, *G. molesta*, *T. batrachopa* e *T. leucotreta*), na África do Sul, local onde de acordo com os autores, o hospedeiro desempenha um papel relativamente pequeno na determinação da estrutura genética das populações estudadas. Os resultados encontrados no presente trabalho com sequências de mtDNA indicam pela primeira vez estruturação genética devido ao uso de hospedeiros em *G. molesta*, e esta diferenciação merece ser acompanhada no futuro para se determinar a possibilidade de raças associadas a diferentes hospedeiros, assim como sugerida para *Spodoptera frugiperda* com os biótipos milho e arroz (BUSATO et al., 2004). Vale ressaltar que foi

comprovada a diferença no desenvolvimento e reprodução de *G. molesta* em macieira e pessegueiro (MYERS; HULL; KRAWCZYK, 2006a; 2007), sendo o hospedeiro primário, o pessegueiro, que permite o melhor desenvolvimento da praga (SILVA, et al., 2011).

Tabela 4.5 - Análise molecular de variância (AMOVA) para amostras de *G. molesta* baseada na análise combinada dos genes *COI+nad6*

Fonte de variação	GL ⁽¹⁾	SQ ⁽²⁾	Porcentagem de variação	Índices de fixação
(a) Entre populações	8	7,68	20,85	
Dentro das populações	75	20,87	79,15	ϕ_{ST} : 0,208; $p = 0,25$
Total	83	28,56		
(b) Entre culturas	1	0,62	0,00	ϕ_{ST} : 0,198 $P < 0,05$
Entre populações	7	7,05	22,56	ϕ_{SC} : 0,219; $p < 0,001$
Dentro populações	75	20,87	80,12	ϕ_{CT} : 0,000; Ns
Total	83	28,56		

⁽¹⁾ Grau de liberdade

⁽²⁾ Soma dos quadrados

Ns : não significativo

Valor zero de F_{ST} indica que toda a diversidade genética é compartilhada igualmente dentro de uma espécie e não há diferenças genéticas entre populações, enquanto que valor 1 indica que toda a diversidade gênica dentro de uma espécie é encontrada como diferença entre populações e sem diversidade gênica dentro das populações. Os valores obtidos de F_{ST} de Slatkin par-a-par entre as populações estudadas variaram de 0 a 0,629 (Tabela 4.6). Populações separadas por mais de 400 Km de distância, como as populações coletadas em pessegueiro nos municípios de Pelotas-RS (RSPel_Pêssego1) e Bento Gonçalves-RS (RSBG_Pêssego2), apresentaram distância genética de 0,629 enquanto que populações separadas por aproximadamente algumas centenas de metros (RSBG_Maçã3 e RSBG_Pêssego2) apresentaram um índice de F_{ST} de 0,000. Por outro lado detectou-se um F_{ST} de 0,000 entre as populações RSPel_Pêssego2 e SCVID_Maçã que estão distanciadas mais de 550 Km. Fato semelhante foi observado em populações de *G. molesta* da África do Sul (TIMM; GEERTSEMA; WARNICH, 2008) e para *C. pomonella* em

pomares de maçã do Chile (FUENTES-CONTRERAS et al., 2008). Em ambos os estudos os autores encontraram pouca diferenciação genética em distâncias geográficas maiores do que 100 km entre alguns dos pomares amostrados e associaram o acontecido devido ao transporte acidental da praga pelo homem. Em função da distância entre estas populações no presente trabalho, fica evidente a ação do homem no transporte acidental de pragas.

Tabela 4.6 - F_{ST} par a par para amostras de *G. molesta* de cada região, baseada na análise combinada dos genes *COI* + *nad6*, valores em negrito significativo ($p = 0,05$)

	RSBG_ Maçã2	RSBG_P êssego1	RSBG_ Maçã1	RSPEL_ Pêssego1	RSBG_ Maçã3	RSBG_ Pêssego2	RSPEL_ Pêssego2	SCVID_ Pêssego	SCVID _Maçã
RSBG_Maçã2									
RSBG_Pêssego1	0,000								
RSBG_Maçã1	0,000	0,000							
RSPEL_Pêssego1	0,000	0,436	0,407						
RSBG_Maçã3	0,000	0,000	0,000	0,407					
RSBG_Pêssego2	0,000	0,000	0,000	0,629	0,000				
RSPEL_Pêssego2	0,000	0,314	0,000	0,000	0,286	0,501			
SCVID_Pêssego	0,000	0,000	0,000	0,436	0,000	0,000	0,314		
SCVID_Maçã	0,000	0,000	0,000	0,285	0,000	0,000	0,000	0,000	

O teste de Mantel utilizado para avaliar a relação entre as distâncias genética e geográfica, para as nove localidades apresentou correlação positiva entre esses parâmetros ($r=0,545$; valor de $p<0,001$) (Figura 4.2), indicando que há diferenças genéticas em função da distância geográfica. Esta divergência associada à distribuição geográfica pode ser devida à capacidade de voo da mariposa oriental que é pequena, em média de 141 m para machos e de 160 m para fêmeas (YETTER; STEINER, 1932), mas de acordo com Gonzalez (2003) pode chegar a 1-2 km, permitindo a ocorrência de dispersão entre pomares (HUGHES; DORN, 2002; HUGHES et al., 2004; POLTRONIERI et al., 2008c).

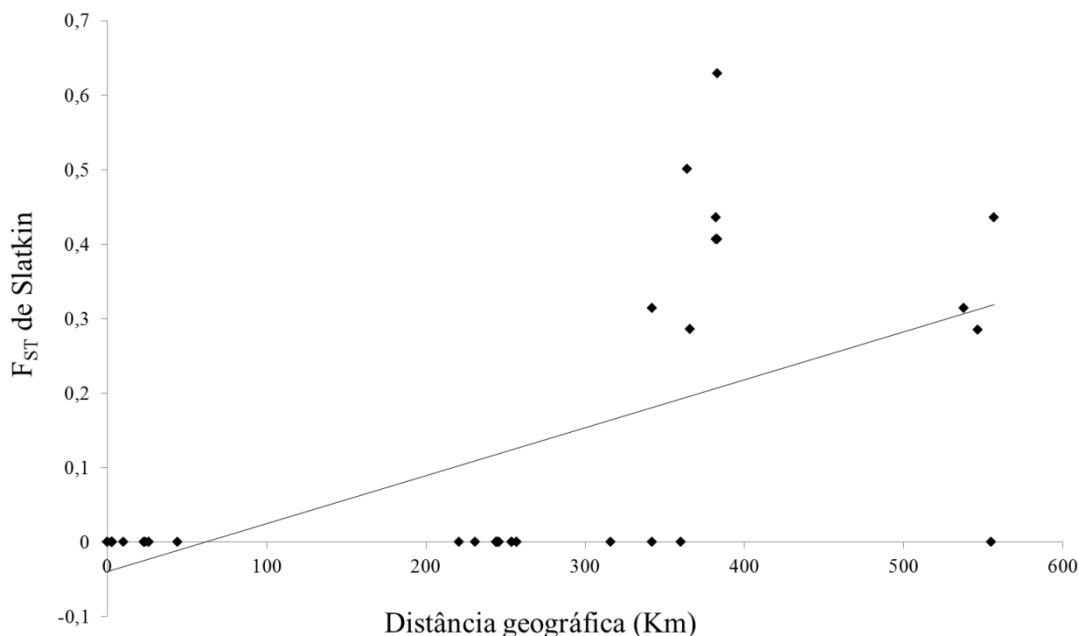


Figura 4.2 - Relação entre as distâncias genéticas e geográficas inferida pela análise de isolamento por distância (MANTEL, 1967)

4.3.2 Medidas de variabilidade genética com marcadores microssatélites

No total foram encontrados 56 alelos distribuídos entre os oito locos testados nas nove populações. Seis dos oito locos apresentaram alto grau de polimorfismo, possuindo cada um deles de cinco a doze alelos (locos Gm01, Gm03, Gm04, Gm06, Gm07, Gm10), sendo que os locos Gm04 e Gm10 apresentaram doze alelos cada. Os demais locos (Gm02, Gm08) apresentaram grau de polimorfismo intermediário com três alelos cada. Foram encontrados

em média sete alelos por loco, valor próximo ao encontrado por Chen e Dorn (2010) em populações da praga na Itália (6,6), Estados Unidos (5,5) e China (6,1).

A heterozigotidade observada (H_O) média entre os locos foi de 0,193, variando de 0,005 (Gm02) a 0,515 (Gm03). A heterozigotidade esperada (H_E) média foi de 0,327, variando de 0,023 a 0,629, com o menor valor atribuído ao loco Gm02 e o maior valor atribuído ao loco Gm03. Estes valores também são próximos aos obtidos por Chen e Dorn (2010) para a mesma espécie com populações da Itália, Estados Unidos e China.

Os resultados de H_O e H_E obtidos com os locos de marcadores microssatélites aplicados nesse estudo foram similares aos obtidos por Torriani et al. (2010), os quais caracterizaram 10 locos microssatélites em oito populações de *G. molesta* da Itália, utilizando os mesmos iniciadores. Destes dez locos, oito foram utilizados no presente trabalho (Tabela 4.7), e assim como observado por estes autores, consideramos que todos os locos microssatélites analisados neste estudo foram polimórficos para as nove populações de *G. molesta* no Brasil. Os dois iniciadores microssatélites (Gm05 e Gm09) foram excluídos do presente estudo devido a dificuldades na amplificação dos mesmos em várias amostras. Como as sequências foram provenientes de amostras de outro país (Itália) é de se esperar divergências destas sequências em relação às sequências homólogas brasileiras, afetando a amplificação do loco microssatélite.

A heterozigotidade esperada (H_E) média foi maior do que a heterozigotidade observada (H_O) para todos os locos e populações. Possivelmente essa deficiência de heterozigotos se deve ao fato da fêmea não evitar o acasalamento com machos aparentados e ser fecundada pelo esperma de poucos machos. Mesmo sendo uma espécie cuja fêmea apresenta comportamento poligâmico (MORAIS et al., 2011), esse comportamento parece não ter refletido na diminuição da endogamia. De acordo com Moraes et al. (2011), a fecundidade das fêmeas de *G. molesta* não se altera quando estas copulam uma ou várias vezes ao longo da vida, provavelmente porque a quantidade de espermátófos transferidos de um único macho na primeira cópula seja suficiente para fecundar todos os ovos.

Outra hipótese para explicar a deficiência de heterozigotos seria em razão da dinâmica populacional da espécie. *G. molesta* entra em diapausa durante a fase larval (DICKSON, 1949; SILVA, 2010) e neste processo, até que haja a emergência do adulto pós-diapausa, 58% dos insetos morrem (SILVA, 2010). Esta redução populacional pode formar pequenos grupos de adultos pós-diapausa, podendo favorecer o acasalamento entre indivíduos próximos, muitas vezes aparentados, afetando a frequência de heterozigotos na população.

Com relação às estimativas de variabilidade genética obtidas para cada população, o número médio de alelos encontrados foi de 22,5 variando de 19 (população SCVID_Pêssego) a 26 (RSPEL_Pêssego2). Este número fornece uma idéia da diversidade de alelos encontrados nas populações avaliadas, refletindo numa alta diversidade genética da espécie.

Tabela 4.7 – Estimativas do número total de alelos (A), heterozigosidade observada ($H_O \pm SD$) e heterozigosidade esperada ($H_E \pm SD$) para os locos microssatélites utilizados

Loco	A	H_O	H_E
<i>Gm01</i>	6	0,038 ± 0,020	0,057 ± 0,024
<i>Gm02</i>	3	0,005 ± 0,005	0,023 ± 0,016
<i>Gm03</i>	7	0,515 ± 0,045	0,629 ± 0,026
<i>Gm04</i>	12	0,174 ± 0,052	0,438 ± 0,080
<i>Gm06</i>	5	0,061 ± 0,041	0,268 ± 0,077
<i>Gm07</i>	8	0,125 ± 0,054	0,217 ± 0,073
<i>Gm08</i>	3	0,390 ± 0,074	0,424 ± 0,045
<i>Gm10</i>	12	0,239 ± 0,061	0,560 ± 0,042
Média	7	0,193 ± 0,026	0,327 ± 0,031

Tabela 4.8 – Estimativas do número total de alelos (N), média de alelos por população por loco (n), médias das heterozigosidades observada ($H_O \pm SD$) e esperada ($H_E \pm SD$) para as nove populações de *G. molesta*

População	N ¹	N ²	H _O	H _E
RSBG_Pêssego1	24	3	0,124 ± 0,064	0,329 ± 0,104
RSBG_Maçã1	23	2,87	0,161 ± 0,076	0,288 ± 0,106
RSBG_Maçã2	21	2,62	0,197 ± 0,088	0,317 ± 0,110
RSPEL_Pêssego1	24	3	0,170 ± 0,070	0,331 ± 0,091
RSPEL_Pêssego2	26	3,25	0,229 ± 0,091	0,384 ± 0,091
RSBG_Maçã3	22	2,75	0,249 ± 0,085	0,377 ± 0,090
RSBG_Pêssego2	21	2,62	0,205 ± 0,084	0,291 ± 0,087
SCVID_Pêssego	19	2,37	0,109 ± 0,070	0,282 ± 0,085
SCVID_Maçã	23	2,87	0,296 ± 0,083	0,345 ± 0,103
Média	22,5	2,81	0,193 ± 0,026	0,327 ± 0,031

¹ Número total de alelos por população.

² Número médio de alelos por população por loco.

As distribuições das frequências alélicas para cada loco microssatélite estão apresentadas na Tabela 4.9 e Figuras 4.3 e 4.4. Todas as populações possuem pelo menos um alelo em comum em todos os locos. Algumas populações foram quase 100% homocigotas para os locos Gm01 e Gm02 (Figura 4.3), ou seja, os alelos encontrados em cada um desses locos estão fixados na população.

Dos 56 alelos encontrados nas nove populações, 24 são alelos privados, o que representa 42,85% do total de alelos encontrados (Tabela 4.9). Este resultado indica indiretamente, baixo fluxo gênico entre as populações estudadas. O loco Gm06 foi o que apresentou o menor número de alelos privados (um); em contraposição, o loco Gm10 apresentou sete alelos privados. A população RSPEL_Pêssego2 foi a população que mais apresentou alelos privados (7), indicando que esta população troca menos alelos do que as demais. A população RSBG_Maçã3 não apresentou nenhum alelo privado. A ocorrência de alelos privados em populações naturais pode ser resultado da retenção de polimorfismo ancestral, da ocorrência de mutação ou meramente uma questão amostral.

Tabela 4.9 - Frequências alélicas e alelos privados nos doze locos microssatélite para as populações de *G. molesta*

(continua)									
Populações									
Gm01	RSBG_	RSBG	RSBG_	RSPEL_	RSPEL_	RSBG_	RSBG_	SCVID_	SCVID_
Alelos	Pêssego1	_Maçã1	Maçã2	Pêssego1	Pêssego2	Maçã3	Pêssego2	Pêssego	Maçã
161	-	-	-	0.053	-	-	-	-	-
188	-	-	-	-	0.024	-	-	0.053	-
190	-	-	-	0.026	-	-	-	-	-
198	-	-	-	-	0.048	-	-	-	0.045
201	1.000	1.000	1.000	0.921	0.905	1.000	1.000	0.947	0.955
205	-	-	-	-	0.024	-	-	-	-
Gm02	RSBG_	RSBG	RSBG_Maç	RSPEL_	RSPEL_	RSBG_	RSBG_	SCVID_	SCVID_
Alelos	Pêssego1	_Maçã1	ã2	Pêssego1	Pêssego2	Maçã3	Pêssego2	Pêssego	Maçã
74	-	-	-	0.045	-	-	-	-	-
96	0.935	1.000	1.000	0.955	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
100	0.065	-	-	-	-	-	-	-	-
Gm03	RSBG_	RSBG	RSBG_Maç	RSPEL_	RSPEL_	RSBG_	RSBG_	SCVID_	SCVID_
Alelos	Pêssego1	_Maçã1	ã2	Pêssego1	Pêssego2	Maçã3	Pêssego2	Pêssego	Maçã
140	-	0.023	-	-	-	-	-	-	-
219	-	-	-	-	-	-	0.045	-	-
222	-	0.023	-	0.028	0.500	0.105	0.500	0.342	0.200
224	0.250	0.295	0.364	0.556	0.500	0.263	0.318	0.605	0.375
226	0.273	0.250	0.250	0.250	-	0.184	0.023	-	0.275
228	0.023	-	0.023	-	-	0.447	0.114	0.053	0.150
230	0.455	0.409	0.364	0.167	-	-	-	-	-
Gm04	RSBG_	RSBG	RSBG_Maç	RSPEL_	RSPEL_	RSBG_	RSBG_	SCVID_	SCVID_
Alelos	Pêssego1	_Maçã1	ã2	Pêssego1	Pêssego2	Maçã3	Pêssego2	Pêssego	Maçã
136	-	-	-	-	0.091	0.114	0.021	0.023	-
160	-	-	-	-	0.045	-	-	-	-
162	0.045	0.075	-	-	-	0.136	-	-	-
168	-	-	-	-	-	-	-	-	0.024
170	-	-	-	-	-	-	-	-	0.262
174	-	-	-	-	-	-	-	-	0.643
178	0.136	0.100	0.370	0.471	0.455	0.705	0.979	0.977	-
180	0.477	0.750	0.478	0.529	0.364	0.045	-	-	-
183	0.045	-	-	-	-	-	-	-	0.071
190	-	-	-	-	0.045	-	-	-	-
198	0.068	0.025	-	-	-	-	-	-	-
200	0.227	0.050	0.152	-	-	-	-	-	-

Tabela 4.9 - Frequências alélicas e alelos privados nos doze locos microssatélite para as populações de *G. molesta*

(conclusão)									
Gm06	RSBG_ Pêssego1	RSBG _Maçã1	RSBG_ Maçã2	RSPEL_ Pêssego1	RSPEL_ Pêssego2	RSBG_ Maçã3	RSBG_ Pêssego2	SCVID_ Pêssego	SCVID_ Maçã
Alelos									
98	-	-	-	-	-	-	-	0.048	-
104	0.045	-	0.021	-	-	0.065	0.087	0.048	-
106	-	-	0.021	-	-	0.022	0.087	-	-
108	0.955	1.000	0.958	1.000	0.667	0.522	0.783	0.571	0.813
123	-	-	-	-	0.333	0.391	0.043	0.333	0.188
Gm07	RSBG_ Pêssego1	RSBG _Maçã1	RSBG_ Maçã2	RSPEL_ Pêssego1	RSPEL_ Pêssego2	RSBG_ Maçã3	RSBG_ Pêssego2	SCVID_ Pêssego	SCVID_ Maçã
Alelos									
92	-	-	-	-	0.132	0.261	0.119	-	-
97	-	-	-	-	0.211	0.087	0.095	0.056	-
100	0.978	0.958	0.979	0.875	0.579	0.652	0.786	0.944	1.000
110	-	-	-	0.042	-	-	-	-	-
112	0.022	0.042	0.021	0.042	-	-	-	-	-
136	-	-	-	-	0.026	-	-	-	-
140	-	-	-	-	0.053	-	-	-	-
234	-	-	-	0.042	-	-	-	-	-
Gm08	RSBG_ Pêssego1	RSBG _Maçã1	RSBG_ Maçã2	RSPEL_ Pêssego1	RSPEL_ Pêssego2	RSBG_ Maçã3	RSBG_P êssego2	SCVID_ Pêssego	SCVID_ Maçã
Alelos									
106	0.568	0.396	0.609	0.775	0.952	0.625	0.587	0.711	0.674
114	0.364	0.604	0.348	0.075	0.048	0.375	0.413	0.289	0.283
122	0.068	-	0.043	0.150	-	-	-	-	0.043
Gm10	RSBG_Pê ssego1	RSBG _Maçã1	RSBG_ Maçã2	RSPEL_P êssego1	RSPEL_P êssego2	RSBG_ Maçã3	RSBG_P êssego2	SCVID_P êssego	SCVID_ Maçã
Alelos									
168	-	-	-	-	-	-	-	-	0.091
178	-	-	-	-	-	-	-	-	0.114
180	0.217	0.174	0.250	0.421	0.227	0.143	0.196	0.045	-
186	-	-	-	0.026	-	-	-	-	-
188	-	-	-	-	-	-	-	-	0.045
190	0.087	0.109	0.104	0.158	0.045	-	0.087	0.386	0.523
192	0.674	0.543	0.542	0.263	0.568	0.810	0.717	0.568	0.159
195	-	0.043	-	-	-	0.048	-	-	0.068
198	-	-	-	-	0.114	-	-	-	-
206	-	-	-	-	0.045	-	-	-	-
214	0.022	0.109	0.104	0.132	-	-	-	-	-
220	-	0.022	-	-	-	-	-	-	-

Em negrito: Alelos privados

As frequências genótípicas observadas foram comparadas com as frequências esperadas sob o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Pela aplicação do teste exato de Fischer foi possível verificar quais populações não se ajustam as proporções do EHW para cada loco estudado. Analisando-se os dados, pôde-se constatar um considerável desvio do EHW ($p < 0,001$) em todas as populações para quase todos loci (Tabela 4.10). No entanto, as análises subsequentes foram desenvolvidas com todos os locos genotipados porque nenhum deles desviou significativamente do EHW para todas as populações.

Em todos os locos genotipados nas nove populações a heterozigosidade observada (H_O) foi inferior à heterozigosidade esperada (H_E). Diversos fatores podem reduzir a heterozigosidade, como por exemplo: o acasalamento não aleatório (cruzamento entre parentes ou preferências no acasalamento), pequeno tamanho da população, seleção, mutação e migração. Outro fator que pode ocasionar um déficit heterozigótico aparente é a presença de alelos nulos. De acordo com Dakin e Avise (2004), alelos nulos ocorrem quando a região que flanqueia os microssatélites sofre mutação na porção de anelamento do iniciador, impedindo uma ligação correta, o que impede a amplificação do segmento que contém o microssatélite. Em vários estudos de microssatélites em espécies de lepidópteros-praga de macieira (*G. molesta*, *G. lobarzewskii* e *G. funebrana*), o desvio significativo no EHW (deficiência de heterozigotos) foi atribuído à presença de alelos nulos (CHEN; DORN, 2010), cuja frequência parece ser comum em Lepidoptera (ENDERSBY et al., 2006;. ORSINI et al., 2009; DOMINGUES et al., 2012). Contudo, a presença de alelos nulos não foi significativa no presente estudo.

Tabela 4.10 – Probabilidade para aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) de acordo com o Teste Exato de Fisher

População	Gm01	Gm02	Gm03	Gm04	Gm06	Gm07	Gm08	Gm10
RSBG_Pêssego1	*	0,002	0,000	0,000	0,000	0,915	0,000	0,000
RSBG_Maçã1	*	*	0,000	0,000	*	0,831	0,290	0,000
RSBG_Maçã2	*	*	0,000	0,000	0,000	0,917	0,437	0,000
RSPeL_Pêssego1	0,987	0,000	0,001	0,000	*	0,000	0,677	0,000
RSPeL_Pêssego2	0,002	*	0,046	0,000	0,000	0,000	0,819	0,403
RSBG_Maçã3	*	*	0,000	0,000	0,000	0,000	0,084	0,000
RSBG_Pêssego2	*	*	0,000	0,917	0,000	0,000	0,098	0,047
SCVID_Pêssego	0,000	*	0,000	0,913	0,000	0,000	0,007	0,000
SCVID_Maçã	0,823	*	0,009	0,128	0,258	*	0,000	0,614

Em negrito: locos que não se ajustam às proporções do EHW; $\alpha = 0,001$. * = loco monomórfico

4.3.3 Diversidade genética interpopulacional

O coeficiente de endogamia da espécie (f) estimado foi 0,420 (IC 95% 0,246 a 0,621). A estimativa de f diferiu de zero, mostrando a presença de certo grau de endogamia intrapopulacional, ou seja, há ocorrência de acasalamento entre indivíduos aparentados.

Quanto à taxa de migração entre as populações, o valor do parâmetro $N_e m$ obtido com base na estimativa de θ foi de 1,13 indivíduos adultos migrantes em condições de se acasalar por geração.

Já o F_{ST} estimado a partir do parâmetro theta (θ) (WEIR; COCKERHAM, 1984) foi de 0,181 com IC 95% de 0,106 a 0,275. A estimativa θ indica elevada estruturação genética de *G. molesta* no Brasil. Segundo Hartl (2008), valores de F_{ST} entre 0 e 0,05 indicam baixa estruturação genética; valores entre 0,05 e 0,15 indicam estruturação genética moderada; valores entre 0,15 e 0,25 estão relacionados a estruturação alta e quando acima de 0,25 indicam forte estruturação genética. Torriani et al. (2010) detectaram diferenciação genética baixa a moderada em amostras de *G. molesta* da Itália.

Tabela 4.11 – Estimativa dos índices de estruturação baseados em Weir e Cockerham (1984) (f , F , θ) e número de migrantes por geração ($N_e m$) em nove populações naturais de *G. molesta*

	f	F	θ	$N_e m^a$
Estimativa	0,420	0,527	0,181	1,131
Limite superior (IC 95%)	0,246	0,343	0,106	
Limite inferior (IC 95%)	0,621	0,708	0,275	

^a Número de migrantes calculado com base da estimativa de θ .

A análise molecular de variância (AMOVA), utilizando marcadores microssatélites revelou que há estruturação genética entre as populações estudadas em função dos hospedeiros macieira e pessegueiro. Apesar de apresentar baixo valor de F_{ST} baseado em Nei (1978), o mesmo foi significativo ($F_{ST} = 0,028$; $p < 0,001$), o mostra que há pequena divergência entre as populações coletadas nestes hospedeiros. Esta análise demonstrou também que grande parte da variação genética fica retida entre os indivíduos (aproximadamente 62,4%), enquanto que a variância que ocorre entre hospedeiros não passou de 2,8%.

Os índices de fixação (F_{IS} e F_{IT}), encontrados foram altos e são significativos (F_{IS} : 0,643 $p < 0,001$; F_{IT} : 0,653 $p < 0,001$). Estes índices resumem a estrutura genética das populações estudadas com marcadores microssatélites. Os valores encontrados são superiores aos reportados por Torriani et al. (2010), utilizando os mesmos marcadores microssatélites para a mesma espécie de inseto. Os autores detectaram um F_{IS} que variou de 0,07 a 0,32. O F_{IS} detectado no presente trabalho pode ter sido inflado em função do cruzamento preferencial, endogamia, fatores estes que afetam a heterozigosidade e que já foram anteriormente comentados.

Para testar se existe algum grau de estruturação genética relacionado com a distância geográfica foi feito o teste de Mantel entre as nove localidades. Diferente dos resultados encontrados com marcadores mitocondriais, o teste demonstrou que não há uma correlação positiva entre as distâncias genéticas e geográficas ($r = 0,08$; $p > 0,05$), utilizando os marcadores microssatélites. A teoria do isolamento genético por distância (WRIGHT, 1943; SLATKIN, 1993) prevê que o fluxo gênico é maior em curtas distâncias e menor com o aumento de distância geográfica. Torriani et al. (2010) também não detectaram isolamento genético em função da distância para *G. molesta* na Itália utilizando os mesmos marcadores

microssatélites. Para a espécie *C. pomonella*, Fuentes-Contreras et. al (2008), utilizando marcadores microssatélites, comprovaram o isolamento genético de populações chilenas em função da distância geográfica.

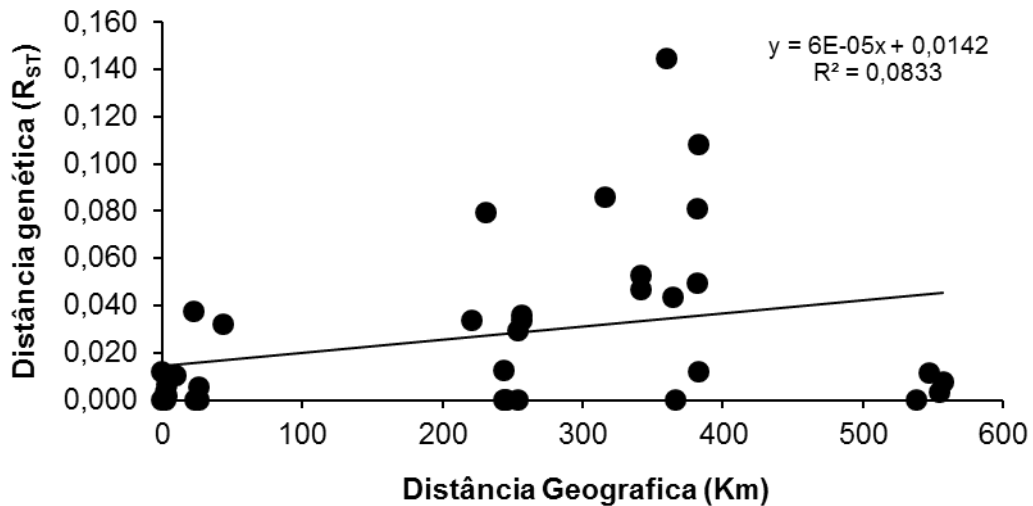


Figura 4.5 – Análise de correlação entre as distâncias genéticas (R_{ST}) linearizada e geográficas inferida pelo teste de Mantel (1967)

Os resultados da taxa de migrantes entre as populações coletadas indicaram que há diferenças na taxa de migração entre as populações. Verificou-se que as populações RSBG_Maçã1, SCVID_Pêssego e SCVID_Maçã pouco contribuem com a taxa de migração, já que aproximadamente 98,6% dos indivíduos dessas regiões são considerados residentes. As populações de RSBG_Maçã3 e RSBG_Pêssego2, separadas por aproximadamente 250 Km da região de SCVID_Pêssego apresentaram elevadas taxas de migração de 28,59 e 28,57%, respectivamente.

Tabela 4.13 – Porcentagem de migrantes das populações de *G. molesta* coletas em 2012. Em negrito, valores significativos para taxas de indivíduos residentes e migrantes

	RSBG_Pêssego1	RSBG_Maçã1	RSBG_Maçã2	RSPEL_Pêssego1	RSPEL_Pêssego2	RSBG_Maçã3	RSBG_Pêssego2	SCVID_Pêssego	SCVID_Maçã
RSBG_Pêssego1	68,28%	28,04%	0,51%	0,57%	0,55%	0,47%	0,58%	0,49%	0,51%
RSBG_Maçã1	0,16%	98,69%	0,16%	0,17%	0,15%	0,16%	0,18%	0,16%	0,17%
RSBG_Maçã2	0,52%	28,19%	67,98%	0,52%	0,53%	0,52%	0,46%	0,83%	0,45%
RSPEL_Pêssego1	0,62%	25,49%	0,80%	69,44%	0,66%	0,70%	0,71%	0,94%	0,64%
RSPEL_Pêssego2	0,58%	1,21%	0,70%	0,54%	68,52%	0,66%	0,70%	26,64%	0,46%
RSBG_Maçã3	0,47%	0,63%	0,44%	0,48%	0,47%	67,96%	0,46%	28,59%	0,51%
RSBG_Pêssego2	0,52%	0,61%	0,50%	0,50%	0,45%	0,48%	67,89%	28,57%	0,47%
SCVID_Pêssego	0,18%	0,18%	0,17%	0,15%	0,15%	0,17%	0,15%	98,67%	0,17%
SCVID_Maçã	0,17%	0,18%	0,15%	0,17%	0,17%	0,19%	0,16%	0,17%	98,65%

Nota: A taxa de migrantes com a qual cada população contribui está no sentido linha-coluna. Os valores nas células da população com ela mesma são de indivíduos residentes.

A distribuição das populações nos eixos X e Y, da representação gráfica da análise de coordenadas principais (PCoA) para as nove populações de *G. molesta* revelou agrupamentos separados pelos componentes X que explica a maior variabilidade nos dados (79,75%) e Y (que explica 16,9% da variação) (Figura 4.6). Não há agrupamento pelo hospedeiro, mas parece haver agrupamento por região geográfica. As populações amostradas no mesmo município (Bento Gonçalves-RS - RSBG) foram agrupadas pelo eixo X, com exceção de RSBG_Maçã3. Isto reforça alguns dados já discutidos, demonstrando compatibilidade com o resultado obtido da árvore de NJ para os marcadores mitocondriais.

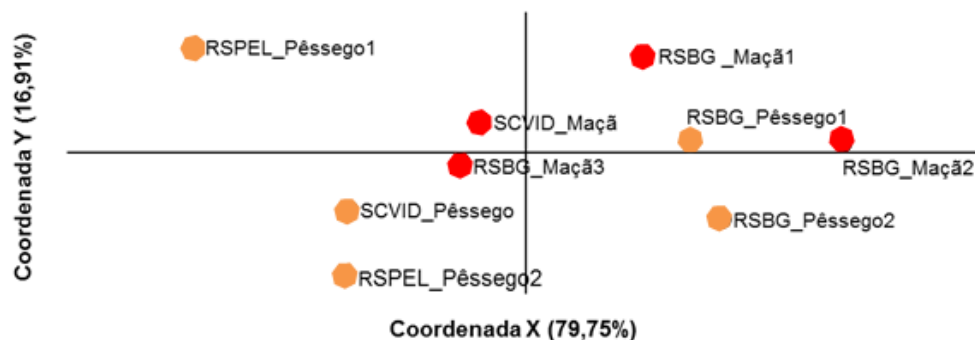


Figura 4.6 – Análise de Coordenadas Principais (PCoA) das populações de *G. molesta* baseada nos valores de distância R_{ST} par a par.

4.3.4 Considerações da variabilidade genética de *G. molesta* com base nos marcadores mitocondriais e microssatélites

O estudo da variabilidade genética de populações de *G. molesta* coletadas em macieira e pessegueiro nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul apresentam baixa variabilidade genética quando avaliados com marcadores mitocondriais (*COI* e *nad6*), enquanto que com a utilização de marcadores microssatélites, observou-se grande diversidade genética da espécie, como indicado pelo número de alelos por população e a média do número de alelos por loco, sendo os valores próximos aos encontrados por outros autores para a mesma espécie em outros países (CHEN; DORN, 2010). Esta discrepância quanto à variabilidade genética pode estar na forma de herança desses dois marcadores moleculares:

mtDNA tem herança exclusivamente materna, enquanto que a herança dos microssatélites é biparental (PRUGNOLLE; MEEUS, 2002). Ou seja, em populações próximas, se houver uma migração de machos e eles tiverem sucesso no acasalamento, o DNA que eles carregam não irá contribuir para o “pool” genético daquela população, devido à herança. No entanto, tratando-se de marcador microssatélite (DNA nuclear), quando ocorre a imigração de machos, os alelos que eles carregam são passados adiante. Ademais, é conhecido que marcadores microssatélites são mais variáveis do que marcadores mitocondriais (SUNNUCKS, 2000; HAASL; PAYSEUR, 2013).

A heterozigotidade esperada (H_E) média foi maior do que a heterozigotidade observada (H_O) para todos os locos e populações. Estas estimativas de heterozigotidades são muito influenciadas pelo sistema reprodutivo da espécie. Possivelmente essa deficiência de heterozigotos se deve ao fato da fêmea não evitar o acasalamento com machos aparentados (MORAIS et al., 2011), estando então relacionado à endogamia. Observação esta, condizente com o coeficiente de endogamia da espécie (f) estimado em 0,420 (IC 95% 0,246 a 0,621), mostrando haver alto grau de endogamia intrapopulacional. E esse cruzamento entre indivíduos aparentados está desviando as proporções do EHW pela redução na heterozigotidade, conforme observado no presente estudo.

A presença do alto número de alelos privados (24) detectados pode contribuir para a diversidade e estruturação genética da espécie. A presença de alelos privados em populações naturais pode ser reflexo de fluxo gênico restrito, o que pode levar ao aumento da divergência genética entre populações (SEOANE; KAGEYAMA; SEBBEN, 2000).

A AMOVA (*COI* e *nad6*) e estatísticas F_{ST} (marcadores microssatélites), detectaram estruturação genética em algumas populações que infestam as culturas da macieira e pessegueiro no Brasil. A análise molecular de variância (AMOVA), com os dados de sequências de *COI* e *nad6* combinados, revelou ainda que há estruturação genética entre as populações em função do hospedeiro (macieira e pessegueiro) e demonstrou que grande parte da variação genética fica retida dentro das populações (aproximadamente 80%), enquanto que a variância que ocorre entre as populações não passou de 22,5%. Os dados com marcadores microssatélites confirmaram a estruturação genética observada com os marcadores mitocondriais, pois o F_{ST} estimado a partir do parâmetro theta (θ) (WEIR; COCKERHAM, 1984) foi de 0,181 com IC 95% de 0,106 a 0,275, um valor considerado como alta estruturação genética (HARTL, 2008). O valor de F_{ST} baseado em Nei (1978), também demonstra haver uma pequena divergência entre as populações coletadas nestes hospedeiros

($F_{ST} = 0,028$; $p < 0,001$). Esta é uma questão muito importante a ser discutida, que é a possibilidade de existirem linhagens genéticas de *G. molesta* ligadas ao hospedeiro. Tim et al. (2010), estudando seis espécies de tortricídeos na África do Sul, incluindo *G. molesta*, reforçaram que nenhuma das seis espécies estudadas mostrou evidências de desenvolvimento de raças associadas ao hospedeiro.

A diferenciação por hospedeiro detectada no presente trabalho deve ser interpretada com cautela, haja vista que as populações parecem mais específicas às regiões do que aos hospedeiros. Pode ser que a distribuição espacial destas culturas (macieira e pessegueiro) no Sul do país pode ter interferido nas análises, já que os polos produtores são distanciados entre si. Há dois polos principais produtores de maçãs em Santa Catarina, um localizado em Fraiburgo e o outro na região de São Joaquim (BRDE, 2011). No Rio Grande do Sul, a produção está situada predominantemente nos municípios de Vacaria e Caxias do Sul (BRDE, 2011). Quanto à cultura do pessegueiro, no Rio Grande do Sul, a produção comercial concentra-se em três polos, sendo o mais importante localizado na "Metade Sul" do estado, na região de Pelotas-RS (PROTAS; MADAIL, 2003). Portanto, esta distância geográfica, diferenças agro-ecológicas e edafoclimáticas entre os polos produtores dessas frutas podem ter ajudado a moldar a estrutura genética de *G. molesta*, influenciando nas análises quanto à diferenciação genética por hospedeiro.

Foi detectada correlação significativa entre as distâncias genética e geográfica entre as localidades pelo teste de Mantel (MANTEL, 1967) usando as sequências de DNA mitocondrial (citocromo oxidase subunidades I – *COI* e desidrogenase dinucleotídica da adenina nicotinamida – *nad6*), enquanto que esta correlação não foi obtida com marcadores microssatélites. Estas observações corroboram o estudo de Torriani et al. (2010), os quais também não detectaram isolamento genético de *G. molesta* em função da distância utilizando os mesmos marcadores microssatélites em populações coletadas na Itália. É possível que esta discrepância de resultados esteja associada aos modos de herança distintos desses dois marcadores moleculares: mtDNA tem herança exclusivamente materna, enquanto que a herança dos microssatélites é biparental (PRUGNOLLE; MEEUS, 2002), conforme salientado anteriormente. Ademais, marcadores mitocondriais são menos sensíveis a variações recentes do que os marcadores microssatélites e evidenciam, principalmente aspectos que esclarecem a variabilidade genética histórica.

A ausência de hospedeiros silvestres e a entrada em diapausa provavelmente explicam melhor o padrão de estrutura genética observada no presente trabalho. O primeiro fator a ser considerado é que no Brasil não há disponibilidade de alimento o ano todo para *G. molesta*,

pois as frutíferas de clima temperado, com destaque para macieira e o pessegueiro, apresentam um período de repouso vegetativo (dormência) onde o crescimento é limitado (CAMELATO, 1990). Nesta fase, estes hospedeiros não apresentam brotações ou frutos para a alimentação do inseto. Embora *G. molesta* possa realizar voos para dispersão (HUGHES; DORN, 2002; GONZALEZ, 2003; HUGHES; HERN; DORN, 2004), acredita-se que a maioria dos insetos permanece no pomar nesta época, até mesmo porque não se tem conhecimento de nenhum hospedeiro alternativo nas matas adjacentes aos pomares (POLTRONIERI et al., 2008). Neste período (maio-agosto), sem a disponibilidade de alimento, *G. molesta* utiliza a diapausa como estratégia de sobrevivência (REIS FILHO; NORA; MELZER, 1988; ARIOLI; CARVALHO; BOTTON, 2005; CIVIDANES; MARTINS, 2006; POLTRONIERI et al., 2008). A diapausa é induzida principalmente pelo fotoperíodo curto (12 horas) associado a baixas temperaturas e manifestando-se durante o 5º ínstar (DICKSON, 1949). Este processo auxilia o inseto a sincronizar a sua biologia com a disponibilidade de recursos para alimentação e reprodução. Portanto, os insetos que entraram em diapausa no pomar de pessegueiro ou macieira podem permanecer no pomar até que a planta saia do período de dormência. Após este período, a planta emite brotos que servem de substrato de alimentação para o desenvolvimento da praga, contribuindo para a especialização das populações em seus respectivos hospedeiros. Para os Tortricídeos de grande importância econômica no Sul da África, incluindo *G. molesta*, a estruturação genética em função da distância geográfica foi mais importante do que a utilização de hospedeiros (TIMM; GEERTSEMA; WARNICH, 2008).

Para determinar os efeitos da capacidade de dispersão na estrutura genética de populações de insetos fitófagos, Peterson e Denno (1998) revisaram a literatura e estimaram o isolamento genético por distância geográfica em 43 espécies de insetos fitófagos. Os autores concluíram que em 45% dos casos há o declínio do fluxo gênico com o aumento da distância geográfica. Eles afirmam que em espécies sedentárias, o limitado fluxo gênico permite a divergência entre as populações.

A existência de muitos alelos privados nas populações avaliadas, o elevado coeficiente de endogamia da espécie (f) e a estruturação por hospedeiro e distância geográfica indicam, de forma indireta, baixo fluxo gênico entre as populações de *G. molesta* no Brasil. O fluxo gênico é a transferência de genes de uma população para outra (GRIFFITHS, 1996). Portanto, as populações podem estar isoladas ou geneticamente relacionadas pelo fluxo gênico (FUTUYMA, 1992). A intensidade do fluxo gênico entre populações de insetos é afetada

diretamente pela capacidade de dispersão (distância e tendência). Nesse caso, essas informações ratificam os dados da literatura de que a capacidade de voo de *G. molesta* é reduzida (YETTER; STEINER, 1932; GONZALEZ, 2003) e que o inseto é tradicionalmente considerado residente no pomar, fato comprovado para algumas populações no presente estudo (RSBG_Maçã1, SCVID_Pêssego e SCVID_Maçã).

Entretanto, é possível a ocorrência de deslocamento entre pomares (HUGHES; DORN, 2002; HUGHES; HERN; DORN, 2004), como afirmado por Poltronieri et al. (2008). Isso deve ocorrer porque embora ocorra a diapausa de *G. molesta*, a mesma não é total na população, visto que são capturados adultos nos pomares durante o período de entressafra (HICKEL; VILELA; SOUZA, 2003). Neste evento biológico, deve ocorrer uma queda acentuada no número de indivíduos de sua população (SILVA, 2010), portanto, espera-se que a variabilidade genética da praga seja alterada por efeito de deriva genética resultante da entrada em diapausa e a redução do tamanho da população. Na primavera, em hipótese, os adultos provenientes das lagartas que passaram o inverno em diapausa darão origem à primeira geração que se desenvolverá sobre as culturas de pessegueiro (HICKEL; VILELA; SOUZA, 2003; ARIOLI; CARVALHO; BOTTON, 2005) que apresenta estruturas para a alimentação do inseto antes que a cultura da macieira. Nesse momento, pode ocorrer o encontro das populações que outrora estavam isoladas em seus respectivos hospedeiros, ocasionando uma diminuição da diferenciação genética entre as populações que estavam isoladas.

A análise conjunta destes resultados traz a possibilidade de se conhecer a eficiência relativa de cada marcador, bem como reforçar os resultados. De maneira geral pode-se afirmar que a variabilidade genética de *G. molesta* está bem distribuída nas regiões produtoras de maçã e pêssego, e que as barreiras geográficas e as condições edafoclimáticas e manejo da praga parecem estar limitando o acasalamento e portanto, o fluxo gênico entre as populações estudadas. Além da distância geográfica, o hospedeiro causou estruturação genética da espécie, podendo inclusive, estar relacionada à presença de espécies crípticas, assim como sugerida para *Spodoptera frugiperda* com os biótipos milho e arroz (BUSATO et al., 2004). Vale ressaltar que foi comprovada a diferença no desenvolvimento e reprodução de *G. molesta* em macieira e pessegueiro (MYERS; HULL; KRAWCZYK, 2006a, 2006b, 2007), sendo o hospedeiro primário, o pessegueiro, o que permite o melhor desenvolvimento da praga (SILVA et al., 2011).

No tocante ao manejo da resistência a inseticidas, caracterizar a estrutura genética e fluxo gênico de uma espécie e entender como as populações estão conectadas ajudam na definição da escala do manejo a ser adotado (SCOTT et al., 2005).

As estratégias para o manejo da resistência a inseticidas têm sido divididas em três grupos principais: manejo por moderação, por saturação e ataque múltiplo (GEORGHIOU, 1983). Considerando estas estratégias, a rotação e a mistura de produtos químicos têm sido muito exploradas para *G. molesta* (KANGA et al., 2003). Com base nos resultados apresentados, pode-se afirmar que práticas de manejo da resistência de *G. molesta* podem ser decididas localmente ou regionalmente, uma vez que há estruturação genética da espécie em função de hospedeiro e por distância geográfica. *G. molesta* apresentou um elevado F_{ST} , conseqüentemente não apresenta um elevado fluxo gênico a grandes distâncias. Dessa maneira, o aparecimento e a dispersão de um eventual alelo resistente pode não ocorrer tão rapidamente. Isto implica que se detectada resistência de *G. molesta* em pessegueiro, o mesmo inseticida poderá ser utilizado sem restrição na cultura da macieira e vice-versa, desde que os pomares sejam distanciados um do outro.

Por outro lado, deve-se atentar para a questão do fluxo gênico apresentado pela praga, pois da mesma forma que o fluxo gênico pode retardar a evolução da resistência pela introdução de alelos da suscetibilidade, em pequena escala, o baixo fluxo gênico pode concentrar os alelos que conferem a resistência, aumentando mais rapidamente a frequência dos mesmos devido à baixa introdução de alelos da suscetibilidade (CAPRIO; TABASHNIK, 1992). Portanto, a utilização de inseticidas em pomares de macieira e pessegueiro deve ser feita de maneira cautelosa, haja vista que as moléculas inseticidas disponíveis aos fruticultores são praticamente as mesmas para as duas culturas. Considerando-se estes dois aspectos, reforça-se a importância de dar continuidade aos estudos de monitoramento da suscetibilidade desta praga a inseticidas nas culturas da macieira e pessegueiro, no intuito de detectar com antecedência e retardar a evolução da resistência a inseticidas.

Os resultados deste trabalho permitiram inferir um primeiro panorama sobre a variabilidade genética da espécie no Brasil, sendo analisadas populações de *G. molesta* dos dois maiores estados produtores de maçã do País, que juntos representam 96% de toda a área plantada (BRDE, 2011). Estas estimativas de variabilidade genética da praga são muito importantes para inferir a história evolutiva, parentesco e relações filogenéticas entre as populações. No caso específico de *G. molesta*, o conhecimento da variabilidade genética deste inseto ainda é muito importante para compreender a relação desta praga com seus

hospedeiros. As informações obtidas podem contribuir para o melhor conhecimento da estrutura genética de *G. molesta* no Brasil, podendo futuramente serem utilizadas para o refinamento de táticas do controle do inseto.

4.4 Conclusões

Com base nos marcadores de mtDNA avaliados, pode-se concluir que:

- As populações de *G. molesta* nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul coletados em macieira e pessegueiro apresentam moderada variabilidade genética;
- Há estruturação genética entre as populações de *G. molesta* em função do hospedeiro e da distância geográfica;

Com base nos marcadores microssatélites, pode-se concluir que:

- Os locos microssatélites analisados apresentam grande potencial informativo e foram eficientes para detectar variabilidade genética dentro e entre as populações de *G. molesta*;
- Existe estruturação da variabilidade genética entre as populações, porém não foi detectada em função de distância geográfica;
- Ocorre baixa taxa de migração (fluxo gênico) entre populações de *G. molesta* avaliadas.

Referências

ALBERNAZ, K.C.; SILVA-BRANDÃO, K.L.; FRESIA, P.; CÔNSOLI, F.L.; OMOTO, C. Genetic variability and demographic history of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Brazil inferred by mtDNA sequences. **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 102, n. 3, p. 333-343, 2012.

ALSTAD, D.N.; ANDOW, D.A. Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. **Science**, Washington, v. 268, p. 1894-1896, 1995.

ARIOLI, C.J. **Técnica de criação e controle de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) na cultura da macieira.** 2007. 83 p. Tese (Doutorado em Fitossanidade) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

ARIOLI, C.J.; CARVALHO, G.A.; BOTTON, M. Flutuação populacional de *Grapholita molesta* (Busck) com feromônio sexual na cultura do pessegueiro em Bento Gonçalves, RS, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p. 1-5, 2005.

BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL. Superintendência de Planejamento. **Cadeia produtiva da maçã no Brasil:** limitações e potencialidades. Porto Alegre, 2011. 44 p.

BOTTON, M.; ARIOLI, C.J.; BAVARESCO, A.; SCOZ, P.L. Principais pragas do pessegueiro. In: GARRIDO, L.C.; BOTTON, M. (Org.). **Sistema de produção de pêssego de mesa na Região da Serra Gaúcha.** Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. p. 1-16. (Embrapa Uva e Vinho. Sistemas de Produção, 3).

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

CAMELATTO, D. Dormência em fruteiras de clima temperado. **Horti Sul**, Pelotas, v. 1, n. 3, p. 12-17, 1990.

CAPRIO, M.A.; TABASHNIK, B.E. Gene flow accelerates local adaptation among finite populations: simulating the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 85, p. 611-620, 1992.

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

CIVIDANES, F.J.; MARTINS, I.C.F. Flutuação populacional e previsão de gerações de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) em pessegueiro, *Prunus persica* (Linnaeus) Batsch. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 28, n. 3, p. 399-405, 2006.

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

DAKIN, E.E.; AVISE, J.C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, London, v. 93, p. 504-509, 2004.

DICKSON, R.C. Factors governing the induction of diapause in the oriental fruit moth. **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 42, p. 511-537, 1949.

- DOMINGUES, F.A.; SILVA-BRANDÃO, K.L.; ABREU, A.G.; PERERA, O.P.; BLANCO, C.A; CÔNSOLI, F.L.; OMOTO, C. Genetic structure and gene flow among Brazilian populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 105, n. 6, p. 2136-2146, 2012.
- ENDERSBY, N.M.; McKECHINIE, S.W., RIDLAND, P.M.; WEEKS, A.R. Microsatellites reveal a lack of structure in Australian populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 107–118, 2006.
- EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 10, p. 564-567, 2010.
- FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, Chicago, v. 3, n. 5, p. 294-299, 1994.
- FRANCK, P.; TIMM, A.E. Population genetic structure of *Cydia pomonella*: a review and case study comparing spatiotemporal variation. **Journal of Applied Entomology**, Hamburg, v. 134, n. 3, p. 191-200, 2010.
- FRANCK, P.; REYES, M.; OLIVARES, J.; SAUPHANOR, B. Genetic architecture in codling moth populations: comparison between microsatellite and insecticide resistance markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, p. 3554-3564, 2007.
- FUENTES-CONTRERAS, E.; ESPINOZA, J.L.; LAVANDERO, B.; RAMIREZ, C.C. Population genetic structure of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from apple orchards in central Chile. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 101, p. 190-198, 2008.
- FUTUYMA, D.J. **Biologia evolutiva**. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 1992. 631 p.
- GEORGHIOU, G.P. Management of resistance in arthropods. In: GEORGHIOU, G.P.; SAITO, T. (Ed.). **Pest resistance to pesticides**. New York: Plenum, 1983. p. 769-792.
- GEORGHIOU, G.P.; TAYLOR, C.E. Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, p. 319-323, 1977a.
- _____. Operational influences in the evolution of insecticide resistance. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 70, p. 653-658, 1977b.
- GONZALEZ, H.R. **Las polillas de la fruta en Chile (Lepidoptera: Tortricidae; Pyralidade)**. Santiago: Universidade de Chile, 2003. 188 p. (Série Ciências Agrônômicas, 9).
- GOUDET, J. **FSTAT 2.9.3**: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices 2001. Disponível em: <<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>>. Acesso em: 15 mar. 2009.
- GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. **Introdução a genética**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856 p.

- HAASL, R.J.; PAYSEUR, B.A. Microsatellites as targets of natural selection. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 30, n. 2, p. 285-298, 2013.
- HARTL, D.L. **Princípios de genéticas de população**. Trad. de I.F. Afonso. 3. ed. Riberão Preto: FUNPEC, 2008. 1 v.
- HICKEL, E.R.; VILELA, E.; DE SOUZA, O.F.F. Previsão da atividade de vôo de *Grapholita molesta* (Busk) em pomares de pessegueiro e ameixeira, através do ajuste entre captura de adultos em armadilhas de feromônio e acumulação de calor. **Revista Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 2, n. 1, p. 30-41, 2003.
- HUGHES, J.; DORN, S. Sexual differences in the flight performance of the oriental fruit moth, *Cydia molesta*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 103, p. 171-182, 2002.
- HUGHES, J.; HERN, A.; DORN, S. Preimaginal environment influences adult flight in *Cydia molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 33, n. 5, p. 1155-1162, 2004.
- KANGA, L.H.B.; PREE, D.J.; VAN LIER, J.L.; WALKER, G.M. Management of insecticide resistance in Oriental fruit moth (*Grapholita molesta*; Lepidoptera: Tortricidae) populations from Ontario. **Pest Management Science**, Sussex, v. 59, n. 8, p. 921-927, 2003.
- KHAGHANINIA, S.; MOHAMMADI, S.A.; SARAFRAZ, A.M.; NEJAD, K.H.I. Population variation of codling moth *Cydia pomonella* (Lep.; Tortricidae) based on molecular data from northwestern Iran. **Turkish Journal of Zoology**, Ankara, v. 35, n. 4, p. 571-578, 2011.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research**, Baltimore, v. 27, p. 209-220, 1967.
- MARTEL, C.; RÉJASSE, A.; ROUSSET, F.; BETHENOD, M.T.; BOURGUET, D. Host-plant-associated genetic differentiation in Northern French populations of the European corn borer. **Heredity**, London, v. 90, p. 141-149, 2003.
- MARTINELLI, S.; BARATA, R.M.; ZUCCHI, M.I.; SILVA-FILHO M.C.; OMOTO, C. Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, p. 519-526, 2006.
- MARTINELLI, S.; CLARK, P.L.; ZUCHI, M.I.; SILVA-FILHO, M.C.; FOSTER, J.E.; OMOTO, C. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 97, p. 225-231, 2007.
- MISSIAGLIA, A.; GRATAPAGLIA, D. Plant microsatellite genotyping with 4-color fluorescent detection using multiple-tailed primers. **Genetics and Molecular Research**, Warren, v. 5, p. 72-78, 2006.
- MONTEIRO, L.B.; HICKEL, E. Pragas de importância econômica em fruteiras de caroço. In: MONTEIRO, L.B.; MAY DE MIO, L.L.; MONTE SERRAT, B.; MOTTA, A.C.V.;

CUQUEL, F.L. (Org.). **Fruteiras de caroço: uma visão ecológica**. Curitiba: UFPR, 2004. p. 223-264.

MORAIS, R.M.; SANT'ANA, J.; REDAELLI, L.R.; LORSCHHEITER, R. Effects of aging and polygamy on the reproductive performance of *Grapholita molesta* (Lepidoptera, Tortricidae). **Revista Colombiana de Entomología**, Bogotá, v. 37, n. 1, p. 67-70, 2011.

MYERS, C.T.; HULL, L.A.; KRAWCZYK, G. Comparative survival rates of oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) larvae on shoots and fruit of apple and peach. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, n. 4, p. 1299-1309, 2006a.

_____. Seasonal and cultivar-associated variation in the oviposition preference of oriental fruit moth, (Lepidoptera: Tortricidae) adults and feeding behavior of neonate larvae in apples. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 99, n. 2, p. 349-358, 2006b.

_____. Effects of orchard host plants (apple and peach) on development of oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 100, n. 2, p. 421-430, 2007.

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

ORSINI, L.; WHEAT, C.W.; HAAG, C.R.; KVIST, J.; FRILANDER, M.J.; HANSKI, I. Fitness differences associates with *Pgi* SNP genotypes in the Glanville fritillary butterfly (*Melitaea cinxia*). **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 22, n. 2, p. 367-375, 2009.

PAVINATO, V.C. **Variabilidade e estrutura genética de populações de *Alabamaargillacea* (Hüb.) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil: subsídios para o manejo da resistência à toxina Cry1Ac em algodão geneticamente modificado**. 2010. 121 p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PEAKALL, R.; SMOUSE P. GENALEX 6: genetic analylis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v.6, p. 288-295, 2006.

PETERSON, M.A.; DENNO, R.F. The influence of dispersal and diet breadth on patterns of genetic isolation by distance in phytophagous insects. **American Naturalist**, Chicago, v. 152, 428-446. 1998.

POLTRONIERI, A.S.; MONTEIRO, L.B.; SCHUBER, J.M.; CARDOSO, N.A. Conexidade populacional de *Grapholita molesta* (Busck, 1916) (Lepidoptera: Tortricidae) entre pomares de pessegueiro e macieira. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 3, p. 339-347, 2008.

PROTAS, J.F.S.; MADAIL, J.C.M. Características econômicas e sociais da produção de pêssego no Rio Grande do Sul. In: GARRIDO, L.C.; BOTTON, M. (Org.). **Sistema de produção de pêssego de mesa na Região da Serra Gaúcha Sistema de Produção**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. n. 1, p. 1-16.

PRUGNOLLE, F.; MEEUS, T. Inferring sex-biased dispersal from population genetic tools: a review. **Heredity**, London, v. 88, n. 5, p. 161-165, 2002.

- REIS FILHO, W.; NORA, I.; MELZER, R. Population dynamics of *Grapholita molesta* (Busck, 1916) and its adaptation on apple in South Brazil. **Acta Horticulturae**, Korbeek-Lo, v. 1, n. 232, p. 204-208, 1988. Apresentado no INTERNATIONAL WORKSHOP ON APPLE CULTURE IN THE TROPICS AND SUBTROPICS, 1988, Florianópolis.
- SALLES, L.A.B. Mariposa-oriental, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). In: VILELA, E.F.; ZUCCHI, R.A.; CANTOR, F. (Ed.) **Histórico e impacto das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 42-45.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, Berlin, v. 18, p. 233-234, 2000.
- SCOTT; K.D.; LAWRENCE, N.; LANGE, C.L.; SCOTT, L.J.; WILKINSON, K.S.; MERRIT, M.A.; MILES, M.; MURRAY, D.; GRAHAM, G.A. 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**, Lanham, v. 98, n.6, p. 2210-2219, 2005.
- SEOANE, C.E.S.; KAGEYAMA, P.Y. SEBBEN, A.M. Efeitos da fragmentação florestal na estrutura genética de populações de *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Guarantã). **Scientia Florestalis**, Piracicaba, v. 57, p. 123-139, 2000.
- SILVA, O.A.B.N. e; BOTTON, M.; GARCIA, M. S.; SILVA, A. da. Efeito de inseticidas reguladores de crescimento sobre ovos, lagartas e adultos de *Grapholita molesta* (BUSCK) (LEP.: Tortricidae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n.2, p. 420-428, 2011.
- SILVA, O.A.B.N. e.; BOTTON, M.; GARCIA, M.S.; BISOGNIN, A.Z.; NAVA, D.E. Desenvolvimento e reprodução da mariposa oriental em macieira e pessegueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 45, n. 10, p. 1082-1088, 2010.
- SILVA-BRANDÃO, K.L.; LYRA, M.L.; SANTOS, T. V.; SERAPHIM, N.; ALBERNAZ, K.C.; PAVINATO, V.A.C.; MARTINELLI, S.; CÔNSOLI, F.L.; OMOTO, C. Exploitation of mitochondrial *nad6* as a complementary marker to study population variability in Lepidoptera. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 719-725, 2011.
- SLATKIN, M.A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, Pittsburgh, v. 130, p. 457-462, 1995.
- SOUZA, N.M. de. **Monitoramento da praga quarentenária *Cydia pomonella* (L., 1758) (Lepid.: Tortricidae) nos pomicultores do município de Palmas - PR**. 2011. 68 p. Monografia (Graduação em Gestão de Defesa Agropecuária) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 15, n. 5, p. 199-203, 2000.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TEMPLETON A.R.; CRANDALL K.A.; SING, C.A. Cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, Pittsburgh, v. 132, p. 619-633, 1992.

TIMM, A.E.; GEERTSEMA H, WARNICH, L. Population genetic structure of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in South Africa. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 101, n. 1, p. 197-203, 2008.

_____. Population genetic structure of economically important Tortricidae (Lepidoptera) in South Africa: a comparative analysis. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 100, p. 21-431, 2010.

TORRIANI, M.V.G.; MAZZI, D.; HEIN, S.; DORN, S. Structured populations of the oriental fruit moth in an agricultural ecosystem. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, p. 2651-2660, 2010.

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

WEIR, B.S.; COCKERHAM, S.S. Estimating F-statistics for the analyses of population structure. **Evolution**, Lawrence, v. 38, p. 1358-1370, 1984.

WILSON, G.A.; RANNALA, B. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. **Genetics**, Pittsburgh, v. 163, p. 1177-1191, 2003.

WRIGHT S. The genetic structure of populations. **Annals Eugenics**, New York, v. 1, p. 323-334, 1951.

YETTER, W.P.; STEINER, L.F. Efficiency of bait traps for the oriental fruit moth as indicated by the release and capture of marked adults. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 25, n. 1, p. 106-116, 1932.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de historicamente o manejo de *B. salubricola* e *G. molesta* ter sido realizado principalmente com inseticidas organofosforados, não foi detectada resistência destas pragas aos inseticidas testados. Isto pode ter ocorrido devido à utilização mais recente de novas moléculas inseticidas (chlorantraniliprole, lufenuron, novaluron), além do expressivo uso da técnica de interrupção do acasalamento com feromônios sexuais na cultura da macieira. Empregadas de forma associada, estas ferramentas devem estar contribuindo para a redução da pressão de seleção e consequentemente, colaborando para manter a suscetibilidade a inseticidas nestas espécies.

Outra hipótese é o comportamento de alimentação de *B. salubricola* e *G. molesta* pois este propicia um “refúgio natural” onde ficam protegidas no interior da folhagem ou entre frutos (KOVALESKI et al. 1998) ou no interior dos ramos ou frutos (BOTTON et al., 2011). Estes hábitos aumentam a dificuldade de se atingir o inseto durante a pulverização de inseticidas. Por este motivo, muitas vezes estes inseticidas não são capazes de intoxicar o inseto dentro do fruto ou no ponteiro, o que diminui a pressão de seleção para a resistência sendo um fator decisivo para a manutenção de indivíduos suscetíveis.

Mesmo sem a detecção de uma alta frequência de indivíduos resistentes de *B. salubricola* e *G. molesta* a inseticidas, a utilização de inseticidas em pomares de macieira e pessegueiro deve ser feita de maneira cautelosa, visto que as moléculas inseticidas disponíveis aos fruticultores são praticamente as mesmas para as duas culturas. No caso de *G. molesta* isto aumenta a pressão de seleção e o risco para evolução da resistência, pois esta espécie estará sujeita aos mesmos tratamentos nas duas culturas. Considerando estes aspectos, reforça-se a importância de dar continuidade aos estudos de monitoramento da suscetibilidade destas pragas a inseticidas nas culturas da macieira e pessegueiro, no intuito de detectar com antecedência e retardar a evolução da resistência.

Um ponto importante do trabalho é a caracterização da suscetibilidade destas espécies juntamente com a definição de concentrações diagnósticas antes do início da comercialização de alguns inseticidas, permitindo o monitoramento da suscetibilidade destas pragas ao longo

dos anos. Este fato permitirá a identificação de pequenas alterações na suscetibilidade devido à evolução da resistência antes que falhas no controle sejam observadas no campo.

O estudo da estrutura genética das populações de *G. molesta* demonstraram um baixo fluxo gênico e estruturação da espécie em função do hospedeiro. Estas informações, além de auxiliar na compreensão de como estes fatores bioecológicos influenciam na adaptação desta praga no agroecossistema, devem ser exploradas na definição das estratégias de manejo da resistência para esta espécie. No caso de *G. molesta*, as práticas de manejo da resistência podem ser decididas regionalmente e não nacionalmente. Isto implica que se detectada resistência de *G. molesta* em pessegueiro, o mesmo inseticida poderá ser utilizado sem restrição na cultura da macieira e vice-versa, desde que os pomares sejam distanciados um do outro. Apesar de esta característica biológica ser importante em termos de facilidade no manejo da resistência, deve-se atentar, pois ao mesmo tempo em que o aparecimento e a dispersão de um eventual alelo resistente pode não ocorrer tão rapidamente para *G. molesta*, por outro lado, este baixo fluxo gênico pode concentrar os alelos que conferem a resistência, aumentando mais rapidamente a frequência dos mesmos devido à baixa introdução de alelos da suscetibilidade, resultante da pequena capacidade de dispersão do inseto.

As informações disponíveis no trabalho permitem definir estratégias nos programas de manejo da resistência de *B. salubricola* e *G. molesta* a inseticidas em macieira e pessegueiro.