

GENÉTICA POPULACIONAL DE BROCA-PEQUENA-DO-TOMATE, *Neoleucinodes elegantalis* (GUENÉE, 1854) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

por

ANDRÉ VICTOR PEREZ MAIA

(Sob Orientação do Professor Cesar Auguste Badji - UFRPE)

RESUMO

O tomate, *Lycopersicon esculentum* Mill., é uma planta cujo ciclo varia de quatro a sete meses, incluindo-se um a três meses de colheita. Os desafios fitossanitários da cultura do tomate incluem insetos fitófagos e agentes fitopatógenos que exigem a adoção de técnicas de manejo para minimizar as perdas de produção e garantir a lucratividade. Considerada principal praga da cultura do tomate, a *Neoleucinodes elegantalis* Guenée, está amplamente distribuída na Região Neotropical. Na América Latina é encontrada principalmente no Brasil, Venezuela e Colômbia. Este inseto é responsável por danos econômicos consideráveis à cultura do tomate, podendo acarretar um prejuízo de 50% a 90% na produção desta hortaliça. O manejo dessa praga é feito quase que exclusivamente por inseticidas sintéticos que são, na maioria das vezes, aplicados de forma indiscriminada, sem seguir os princípios do manejo ecológico de pragas. Este tipo de aplicação pode levar a mudanças específicas no DNA, causando resistência. Variações genéticas podem ser detectadas a nível molecular através mudanças diretas na estrutura do DNA, ou indiretamente nas proteínas codificadas por genes específicos. Assim, o objetivo desse trabalho foi analisar a filogeografia de *N. elegantalis* no Brasil, a fim de compreender a estrutura populacional e padrões demográficos. A extração de DNA, amplificação e sequenciamento do gene mitocondrial citocromo oxidase I (CO1) produziu uma porção 628 pares de bases em 51

indivíduos, além de uma rede de 12 haplótipos e uma diversidade de haplotípica ( $h$ ) de 0,836. A população que apresentou a maior diversidade de haplótipos foi a de Garanhuns-PE com um total de cinco haplótipos, enquanto que a população de Petrolina-PE apresentou apenas um haplótipo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Distribuição geográfica, manejo de pragas, citocromo oxidase I

POPULATION GENETICS IN SMALL TOMATO BORER *Neoleucinodes elegantalis*

(GUENÉE, 1854) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

por

ANDRÉ VICTOR PEREZ MAIA

(Sob Orientação do Professor Cesar Auguste Badji - UFRPE)

ABSTRACT

The tomato, *Lycopersicon esculentum* Mill., is a plant whose cycle varies from four to seven months, including one to three months of harvest. Phytosanitary challenges of tomato cultivation include phytophagous insects and phytopathogens agents that require the adoption of management techniques to minimize production losses and ensure profitability. Considered major pest of tomatoes to *Neoleucinodes elegantalis* Guenée, is widely distributed in the Neotropical Region. In Latin American it is found mainly in Brazil, Venezuela and Colombia. This insect is responsible for considerable economic losses in tomato, which may cause a loss of 50% to 90% in the production of this vegetable and its control is necessary especially by the way of his attack. The management of this pest is done almost exclusively by synthetic insecticides, which are most often applied indiscriminately without following the principles of integrated pest. This indiscriminate application may lead to specific changes in the DNA of the pest, thus increasing the resistance. Besides resistance, other forms of genetic alterations naturally occurring through the speciation process. Genetic variations can be detected at the molecular level through direct changes in the structure of DNA, or indirectly through the proteins they encode specific genes. Thus, the aim of this study was to analyze the phylogeography of *N. elegantalis* in Brazil in order to understand the population structure and demographic patterns. DNA extraction, amplification

and sequencing of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I (CO1) produced a 628 bp portion in 51 individuals, and a network of 12 haplotypes and haplotype diversity (h) of 0.836. The population with the highest haplotype diversity was Garanhuns-PE with a total of five haplotypes, while the population of Petrolina-PE had only one haplotype.

**KEY WORDS:** Geographical distribution, pest management, cytochrome oxidase I

GENÉTICA POPULACIONAL DE BROCA-PEQUENA-DO-TOMATE, *Neoleucinodes  
elegantalis* (GUENÉE, 1854) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

por

ANDRÉ VICTOR PEREZ MAIA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de  
Mestre em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Janeiro – 2014

GENÉTICA POPULACIONAL DE BROCA-PEQUENA-DO-TOMATE, *Neoleucinodes  
elegantalis* (GUENÉE, 1854) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

por

ANDRÉ VICTOR PEREZ MAIA

Comitê de Orientação:

Cesar Auguste Badji – UFRPE/UAG

Kleber Régis Santoro – UFRPE/UAG

GENÉTICA POPULACIONAL DE BROCA-PEQUENA-DO-TOMATE, *Neoleucinodes  
elegantis* (GUENÉE, 1854) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

por

ANDRÉ VICTOR PEREZ MAIA

Orientador: \_\_\_\_\_  
Cesar Auguste Badji – UFRPE/UAG

Examinadores: \_\_\_\_\_  
Kleber Régis Santoro – UFRPE/UAG

\_\_\_\_\_  
ícero Carlos de Souza Almeida – UFAL/Arapiraca

\_\_\_\_\_  
José Vargas de Oliveira – UFRPE

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Francisco Canindé Maia da Silva e Maria de Fátima Perez Maia, por me ajudarem a enfrentar todas as dificuldades para garantir que eu chegasse até aqui. Aos meus irmãos, Ciro Elias Perez Maia e Paulo Victor Perez Maia, pela amizade e incentivo. A minha noiva, Wigna Gabriela Nunes Santos, pelo amor, amizade e compreensão nos momentos mais difíceis, e acima de tudo por todos os momentos felizes que vivenciamos.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente nos momentos mais importantes da minha vida, iluminando-me nas minhas decisões e dando-me forças para completar esse longo caminho.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, pela oportunidade dada à minha formação profissional.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Colégio Sagrado Coração de Maria, especialmente a irmã Zelândia por ser responsável por grande parte da minha educação e formação como ser humano.

A todos os parentes que estiveram presentes em minha vida, especialmente, aos meus avós Maria de Deus Perez, Domício e Maria do Carmo, aos meus tios Marcos, Arlinda, Jairo, Jaira, Denílson Maia, Maria Gorete, Joaquim.

Aos Professores Dr. Cesar Auguste Badji, Dr. Kleber Régis Santoro, Dr. Cícero Carlos de Souza Almeida e Dr. Claudio Galvão de Souza Júnior pela orientação, amizade, confiança e incentivo.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio Filgueira, por despertar o desejo de aprender mais sobre a entomologia.

Aos amigos de pós-graduação, Douglas Barbosa, Vaneska Barbosa, Cecília Sanguinetti, Abraão Cícero e André Gomes e Geovanny Barroso pela amizade e ajuda ao longo dessa árdua caminhada que é a pós-graduação.

Aos meus estimados amigos de laboratório pela ajuda e agradável companhia em todos os momentos, aos que já passaram e aos que ali estão: Carlos Henrique, Luan Ítalo, Ewerton

Marinho, Joseph Jonathan, Carlos Eduardo, Karla Sombra, Juliana Ribeiro, Marcos Ribamar, Paolo Augusto, Wigna Gabriela, Isadora Marcolina, Kamyla Tavares, Dijalma, Ivan e demais.

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido por proporcionar a minha formação como engenheiro agrônomo

A todos da turma de 2011.1 por tudo que vivenciamos e pelas experiências adquiridas, e especialmente aos amigos e companheiros do nosso grupo de estudo, Geovânio Barros, Állisson Rafael, Igor Julyetson, Mairla Germana, Wallace Edelky, Maria Lucilania, Francisco Ronaldo, Osvaldo Nogueira, Jonatas Rafael, Marcos Campos e Marcio Matoso.

Enfim, a todas as pessoas que, de uma maneira geral me ajudaram nesta caminhada.

## SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS .....	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO .....	01
LITERATURA CITADA.....	9
2 <b>AJUSTAR O TÍTULO AQUI</b>	
GENÉTICA POPULACIONAL DE BROCA-PEQUENA-DO-TOMATE, <i>Neoleucinodes</i> <i>elegantalis</i> GUENÉE, 1854 (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) .....	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
INTRODUÇÃO .....	17
MATERIAL E MÉTODOS .....	18
RESULTADOS.....	19
DISCUSSÃO .....	20
AGRADECIMENTOS .....	22
LITERATURA CITADA .....	22

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

*Lycopersicon esculentum* Mill., cujo ciclo varia de quatro a sete meses, incluindo-se um a três meses de colheita. (Fontes & Silva 2002). O Brasil é o nono maior produtor mundial de tomate (FAO 2010). Em 2011, o país produziu 3,7 milhões de toneladas em 60 mil hectares (IBGE 2011). Todas as regiões brasileiras cultivam essa hortaliça, com destaque para Sudeste e Centro-Oeste, as quais apresentam respectivamente, 35,79% e 34,33% da produção; seguidas pelas regiões Nordeste, Sul e Norte, com respectivamente 14,69%, 14,66% e 0,53% (IBGE 2011). A maior parte da colheita se destina ao mercado *in natura*, porém a produção de tomates para as indústrias vem crescendo nos últimos anos (Melo & Vilela 2005). No Nordeste brasileiro, Pernambuco destaca-se ocupando o segundo lugar com produção de 135.508 toneladas, sendo plantado principalmente nos municípios de Camocim de São Félix, Lagoa Grande, Ibimirim e Garanhuns (IBGE 2011).

Os desafios fitossanitários da cultura do tomate incluem insetos fitófagos e agentes fitopatógenos que exigem a adoção de técnicas de manejo para minimizar as perdas de produção, garantir a lucratividade em função da sazonalidade de preços, e para reduzir o impacto no ambiente e na saúde humana (Silva & Carvalho 2004).

Entre os muitos problemas de ordem fitossanitária que ocorrem ao longo do seu cultivo estão, vários patógenos causadores de doenças (fungos e bactérias) e uma grande diversidade de artrópodes-praga como: Traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* Meyric; Mosca-branca *Bemisia tabaci* Gennadius; Ácaros *Aculops lycopersici* Masee; *Tetranychus urticae* Koch e *Polyphagotarsonemus latus* Banks; Mosca-minadora *Liriomyza* sp.; Tripes *Frankliniella*

*schultzei* Trybom e *Thrips palmi* Karny; Pulgões *Myzus persicae* Sulzer e *Macrosiphum euphorbiae* Thomas; Lagarta-rosca *Agrotis ipsilon* Hufnagel; Broca-grande-do-fruto *Helicoverpa zea* Boddie; Lagarta-militar *Spodoptera frugiperda* Smith e *Spodoptera littoralis* Boisduval e Broca-pequena-do-tomate (BPT) *Neoleucinodes elegantalis* Guenée (Gallo *et al.* 2002).

Considerada principal praga do tomateiro, a BPT está amplamente distribuída na Região Neotropical (Leiderman & Sauer 1953, Zucchi *et al.* 1993). Na América Latina, é encontrada principalmente no Brasil, na Venezuela e na Colômbia (Salas *et al.* 1991, Miranda 1997). No Brasil esta praga foi constatada por Costa Lima pela primeira vez em 1922 (Toledo 1948), no Ceará e desde então se tornou importante em quase todas as regiões produtoras de do país (Carneiro *et al.* 1998). A praga pode ser também encontrada em quase todas as zonas de vida Holdridge (0-2.600 m acima do nível do mar), demonstrando a capacidade deste inseto para se adaptar ao frio, climas temperados e quentes (Díaz *et al.* 2011).

O inseto-praga *N. elegantalis* é responsável por danos econômicos consideráveis à cultura do tomate e seu controle se torna necessário principalmente pela forma do seu ataque, esses danos podem acarretar um prejuízo de 50% a 90% na produção (Nunes & Leal 2001, Gallo *et al.* 2002, Gravena & Benvenga 2003, Badji *et al.* 2003, Miranda *et al.* 2005).

Em geral o adulto é pequeno, medindo aproximadamente 25 mm de envergadura, as asas são brancas e ligeiramente transparentes, sendo que as anteriores apresentam, na parte média, três manchas irregulares escuras, e no ápice, uma de cor avermelhada, e as posteriores são ornadas com alguns pontos escuros, mostrando no ápice uma mancha de cor menos intensa. O corpo e as antenas são de cor parda esbranquiçada (Toledo 1948).

Os adultos de *N. elegantalis* apresentam dimorfismo sexual, sendo as fêmeas de maior peso ( $20,2 \pm 3,9$  g) em relação aos machos ( $12,2 \pm 2,6$  g). As dimensões das fêmeas também superam às verificadas para os machos, quanto ao comprimento do corpo ( $11,1 \pm 0,7$  e  $9,8 \pm 0,8$

mm), comprimento da antena ( $9,4 \pm 0,6$  e  $7,7 \pm 0,8$  mm), comprimento da asa ( $11,3 \pm 0,9$  e  $8,1 \pm 0,7$  mm) e largura da asa ( $4,6 \pm 0,4$  e  $3,2 \pm 0,4$  mm) (Jaffe *et al.* 2007).

A fêmea adulta acasalada deposita os ovos preferencialmente próximos ao cálice ou sob as pétalas de frutos verdes pequenos ( $23,1 \pm 8,9$  mm) (Blackmer *et al.* 2001, Sandre Júnior *et al.* 1992), os ovos têm formato achatado e são depositados isolados ou agrupados no pecíolo (Carneiro *et al.* 1998). São elípticos e apresentam largura e comprimento médio de 0,46 e 0,69 milímetros, respectivamente (Muñoz *et al.* 1991), de coloração branca quando recém depositados (Muñoz *et al.* 1991, Gallo *et al.* 2002) e tornando-se avermelhados quando se aproximam da eclosão da lagarta (Carneiro *et al.* 1998).

A lagarta é do tipo polipoda, subtipo eruciforme, com três segmentos torácicos e 10 abdominais e cabeça bastante quitinizada (Muñoz *et al.* 1991). O desenvolvimento larval encerra-se com cinco ínstars, apresentando no primeiro coloração amarelada (Muñoz *et al.* 1991), enquanto que no quinto, assumem coloração rosada uniforme e com tamanho de 11 a 13 mm de comprimento; nesta fase o primeiro segmento torácico é amarelado (Carneiro *et al.* 1998; Gallo *et al.* 2002). A larva eclode entre o quinto e o décimo dia após a postura e penetra no fruto, nos quais deixam um orifício quase imperceptível, ocorrendo perfeita cicatrização (Sandre Júnior *et al.* 1992, Eiras & Blackmer 2003). A eclosão das larvas obedece a uma periodicidade, ocorrendo entre a primeira e a segunda hora da fotofase. O tempo gasto para a lagarta penetrar totalmente no fruto é de, aproximadamente, 74,4 min, alimentando-se da polpa no interior do fruto por aproximadamente 30 dias e o abandona, deixando um furo que muitas vezes apodrece, após completar o seu desenvolvimento, quando mede em média 12 mm de comprimento (Eiras & Blackmer 2003).

Após sair fruto a lagarta passa para a fase de pré-pupa e, finalmente, a pupa (Carneiro *et al.* 1998, Gallo *et al.* 2002). Na fase de pré-pupa a lagarta não se alimenta, reduz o tamanho e

assume coloração esbranquiçada. Torna-se pouco móvel e inicia a confecção da câmara pupal. A pupa é do tipo obtecta, com coloração variável de amarelo claro à marrom escuro, de acordo com o período de duração. No quinto dia é verificado dimorfismo sexual das fêmeas, as quais apresentam abertura genital no início do oitavo segmento abdominal em relação aos machos, que aparece na parte mediana do nono segmento abdominal. O comprimento médio das pupas das fêmeas e dos machos foi de 11,05 e 10,33 mm, respectivamente (Muñoz *et al.* 1991).

O controle da *N. elegantalis* é difícil em virtude do seu comportamento ecológico e de suas larvas desenvolverem-se dentro do fruto (Badji *et al.* 2003). Em função do seu modo de desenvolvimento, a BPT fica protegida durante a maior parte do seu ciclo contra os inseticidas. É por isso que, para aumentar as chances de sucesso no seu controle, os produtores fazem preventivamente pulverizações desde o início do florescimento. No Agreste Meridional pernambucano os produtores usam de forma sistemática inseticidas de diversos grupos químicos, pulverizando as lavouras até seis vezes por semana durante quase todo o ciclo da cultura, independentemente da presença ou não da praga. Essa prática de controle preventivo além de aumentar os custos de produção, pode levar à intoxicação humana (produtores e consumidores), eliminação de insetos benéficos e deterioração do ambiente entre outros (Guedes & Fragoso 1999).

Por ser uma praga amplamente difundida na região Neotropical e estar presente em quase todas as áreas de cultivo de tomate do Brasil (Leiderman & Sauer 1953, Zucchi *et al.* 1993, Carneiro *et al.* 1998), é relevante investigar as possíveis diferenças genéticas entre populações com o objetivo de permitir uma melhor escolha de estratégias e táticas de controle.

Kirk *et al.* (2013) mostraram que as pressões de seleção existentes nos diversos agroecossistemas (métodos de controle, cultivos da região, variedades utilizadas entre outros) podem influenciar na genética das populações.

Em relação à plasticidade fenotípica, pode existir uma ampla gama dentro de uma espécie influenciada por condições ambientais locais com repercussão no comportamento das populações e na preferência de hospedeiros (Simpson *et al.* 2011). Em alguns casos, a plasticidade pode limitar a distribuição da praga (Kirk *et al.* 2013). No caso da BPT, o manejo é feito quase que exclusivamente por inseticidas sintéticos (Reis & Souza 1996, Lyra Neto *et al.* 1998, Lima *et al.* 2001, Martinelli *et al.* 2003), que são, na maioria das vezes, aplicados de forma indiscriminada, sem seguir os princípios do manejo ecológico de pragas. Essa aplicação indiscriminada pode levar a mudanças específicas no DNA que podem causar mudanças no comportamento das pragas e selecionar indivíduos com determinado perfil genético. Esta situação pode levar a falhas no controle e ao aparecimento de populações resistentes. Estudos mostram que a resistência pode ocorrer por uma mudança genética em apenas um *locus* genético, seja por amplificação do gene ou por substituição alélica (Roush & Daly 1990). Outras formas de alterações genéticas ocorrem naturalmente através do processo de especiação.

Por especiação, entende-se o processo de geração de novas espécies, que é aleatório na natureza. Vários fatores contribuem para a especiação, entre eles o isolamento espacial (micro ou macrogeográfico) que acontece quando duas ou mais populações de uma espécie são separadas por uma barreira geográfica, a qual pode ser uma montanha, um deserto ou floresta, causando uma separação espacial (alopatria) (Alexander & Bigelow 1960).

Existe também outra forma de especiação chamada simpátrica, quando diferentes espécies surgem de uma população ancestral no mesmo espaço onde coabitam através do processo de acasalamento seletivo. Apesar do fluxo genético entre os indivíduos da população ser total, as interações ecológicas levam a essa forma de especiação. Ela pode ser definida como a emergência de novas espécies a partir de uma população onde o acasalamento é aleatório com respeito à posição geográfica dos indivíduos envolvidos. É importante ressaltar que essa definição não



impede que o acasalamento seja não-aleatório em relação ao genótipo ou fenótipo. Embora seja um conceito bem estabelecido, especiação simpátrica tem sido difícil de quantificar empiricamente. Existem evidências dessa forma de especiação em insetos, peixes, aves e outros (Gavrilets 2004).

É de grande importância compreender a variabilidade genética em populações de insetos para a elaboração de programas de controle. Para um controle eficaz é necessário o conhecimento dos padrões de dispersão e de sua diversidade genética, uma vez que a habilidade de adaptação de um organismo depende da sua variabilidade genética (Yan *et al.* 1998, Hiragi *et al.* 2009).

Variações genéticas entre populações podem ser detectadas a nível molecular através mudanças diretas na estrutura do DNA, ou indiretamente nas proteínas codificadas por genes específicos. Para quantificar a variação genética dentro das populações, os dados moleculares são utilizados para determinar a média de heterozigosidade (H), a proporção de *loci* polimórficos (P) e o total (n) ou a média (ne) do número de alelos por *locus*. É importante lembrar que distintos métodos utilizados para detectar variação genética derivam em diferentes tipos de informação dependendo da unidade de variação em que se baseiam. Por exemplo, o DNA, as proteínas, a forma dos cromossomos ou a morfologia externa. Isso também faz com que cada método tenha certas limitações e vantagens e que os protocolos de amostragem para cada método sejam diferentes (Mallet 1996, Martínez *et al.* 1997).

A identidade dos seres vivos é determinada pela composição e sequência do seu material genético. As técnicas moleculares, a partir da análise de DNA, apresentam vantagem de serem rápidas e muito sensíveis, não estando sujeitas a variações fenotípicas, à ação do ambiente, ao estágio de desenvolvimento e a outros fatores que possam alterar a morfologia do organismo (Martin 2007). O estudo de determinados genes pode fornecer importantes informações para diferenciar espécies, genótipos ou ainda estabelecer relações filogenéticas entre espécies de um

mesmo gênero e de gêneros diferentes. Possivelmente, os genes mais estudados para este fim em insetos são genes mitocondriais (Meyer 1994).

Mitocôndrias são organelas de dupla membrana responsáveis pela maior parte da produção energética celular, além de exercer outras importantes funções participando do processo de homeostase iônica, metabolismo intermediário e apoptose (Burger *et al.* 2003, Shutt & Gray 2006). As mitocôndrias possuem sistema genético próprio, um genoma vestigial proveniente de um antepassado  $\alpha$ -proteobacterial endossimbiótico (Gray 1987, Margulis 1996, Gray *et al.* 2001, Burger *et al.* 2003, Shutt & Gray 2006). Informações obtidas de estudos moleculares muitas vezes possibilitam elucidar as relações filogenéticas em situações em que a morfologia não pode resolver (Lovato 2006). O DNA mitocondrial (mtDNA) proveu os primeiros dados extensos e de fácil acesso disponíveis para os evolucionistas de forma adequada para realizarem fortes inferências genealógicas no nível intraespecífico. Nas últimas décadas, tem sido uma importante ferramenta para muitos estudos envolvendo estrutura populacional, relações filogenéticas e a compreensão de vários aspectos biológicos e evolutivos de uma grande variedade de organismos (Awise *et al.* 1987, Arias *et al.* 2003). Genoma mitocondrial dos animais é o melhor alvo para realizar análises do que o genoma nuclear devido sua falta de íntrons, a sua exposição limitada à recombinação e o seu modo de hereditariedade haplóide, ou seja, a herança é citoplasmática de origem materna (Saccone *et al.* 1999, Hebert *et al.* 2003, Torres *et al.* 2010).

Outra vantagem importante é que a taxa evolutiva do mtDNA é de 5 a 10 vezes mais rápida do que o genoma nuclear, dessa maneira, o mtDNA tem um nível elevado de transições e transversões, assim como uma alta ocorrência de mutações de pequenos comprimentos de pares de bases (Brown *et al.* 1979, Castro *et al.* 1998). O mtDNA ( figura 1) detém genes codificadores para duas subunidades ribossômicas (12S e 16S), 22 RNAt, três subunidades da enzima citocromo C oxidase (*COI*, *COII* e *COIII*), citocromo B (*cytB*), subunidades 6 e 8 de ATP F0 sintase (*ATP6*

e *ATP8*) e sete subunidades da NADH desidrogenase (*ND1-ND6* e *ND4L*). Além de todos esses genes, há uma região rica em A+T, não-codificadora e que parece conter o controle da replicação e transcrição de mtDNA (Pereira 2000, Kvist 2000, Arias *et al.* 2003, Lovato 2006). O tamanho dessa região exibe grande variação entre os organismos, ao contrário dos genes, que se apresentam similares em tamanho em uma ampla gama de espécies, entre invertebrados e vertebrados sendo detectado por vezes polimorfismo de tamanho a nível interespecífico (Brown 1979, Avise *et al.* 1987, Arias *et al.* 2003, Lovato 2006).

Os 13 genes codificadores de proteínas no genoma mitocondrial animal são alvos melhores para estudos filogenéticos, entretanto, o gene citocromo C oxidase subunidade I (COI) tem duas vantagens importantes: uma delas é que os iniciadores universais para este gene são muito robustos, permitindo a recuperação da sua extremidade 5' a partir de representantes da maioria, se não todos, os filos animais. Em segundo lugar, COI parece possuir uma maior amplitude de sinal filogenético do que qualquer outro gene mitocondrial (Avise *et al.* 1987, Folmer *et al.* 1994, Hebert *et al.* 2003). O DNAm<sub>t</sub> pode ser considerado como um haplótipo simples, podendo ser encontrado em todas as células animais (Attardi 1995), e diferenças no tamanho e número dos haplótipos podem ser usadas para estimativa de quantidade e variação gênica existente entre populações (Nei 1987).

As observações de que os haplótipos de DNAm<sub>t</sub> de populações de muitas espécies apresentam-se localizados geograficamente introduziu uma dimensão filogenética nas discussões sobre estrutura de populações, levando à proposição do termo “filogeografia” (Avise *et al.* 1987). Desse modo, com base na distribuição geográfica dos haplótipos de DNAm<sub>t</sub> e no grau de divergência de suas sequências, Avise (2000) propõe e discute categorias filogeográficas que podem caracterizar áreas de ocupação, distribuição de populações, existência de barreiras ao fluxo

gênico ou extinção de genótipos intermediários, ocorrência de zonas híbridas, taxas de migração e inferências cladísticas.

Ferramentas moleculares são, portanto importantes para o manejo de pragas pois permitem um maior entendimento dos mecanismos de resistência a agrotóxicos (fisiológica, bioquímica e comportamental) nas populações, e também permitem a melhor escolha de estratégias de controle. Ademais, a biologia molecular permite reconstruir o histórico as etapas e a origem da população praga. Permite entender os processos demográficos e os padrões de dispersão associados a invasão e surtos de pragas (Kirk *et al.* 2013).

### Literatura Citada

- Alexander, R.D. & R.S. Bigelow. 1960.** Allochronic speciation in field crickets, and a new species, *Acheta veletis*. *Evolution*. 14: 334-346.
- Arias, M.C., F.O. Francisco & D. Silvestre. 2003.** O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. *Apoidea Neotropica: Homenagem aos 90 Anos de Jesus Santiago Moure*. Criciúma: Editora UNESC. 305-309
- Attardi, G. 1995.** Animal mitochondrial DNA: An extreme example of genetic economy. *Intern. Rev. Citol.*, 93: 93-143.
- Avise J.C. 2000.** *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge: Harvard University Press. 447p
- Avise, J.C. 1987.** Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. rev. ecol. evol.* 18: 489-522.
- Badji, C.A., A.E. Eiras, A. Cabrera & K. Jaffe. 2003.** Avaliação do feromônio sexual de *Neoleucinodes elegantalis* Guenée (Lepidoptera: Crambidae). *Neotrop. Entomol.* 32: 221-229.
- Blackmer, J.L., A.E. Eiras & C.L.M. Souza. 2001.** Oviposition preference of *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae) and rates of parasitism by *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae) on *Lycopersicon esculentum* in São José de Ubá, RJ, Brazil. *Neotrop. Entomol.* 30: 89-95.
- Brown, W.M., M. GEORGE, & A.C. Wilson. 1979.** Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *PNAS*, 76:1967–1971

- Burger, G., M.W. Gray & B.F. Lang. 2003.** Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends genet.* 19:709-716.
- Carneiro, J.S., F.N.P. Haji & F.A.M. Santos. 1998.** Bioecologia e controle da broca-pequena do tomateiro *Neoleucinodes elegantalis*. Teresina, Embrapa Meio-Norte, 14 p. (Circular Técnica 26).
- Castro, J.A., A.Picornell & R. Ramon. 1998.** Mitochondrial DNA: a tool for populational genetics studies. *Int. Microbiol.*, 1:327–332.
- Díaz, A.E., M.A. Solis & H. Brochero. 2011.** Distribucion geografica de *Neoleucinodes elegantalis* (Lepidoptera: Crambidae) en Colombia. *Rev. Colomb. Entomol.* 37: 71-76.
- Eiras, A.E. & J.L. Blackmer. 2003.** Eclosion time and larval behaviour of the tomato fruit borer, *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée) (Lepidoptera: Crambidae). *Sci. Agric.* 60: 195–197.
- FAO. 2010.** Disponível em <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>> Acesso em 23 nov. 2013.
- Filgueira, F.A.R. 2000.** Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças. Viçosa, UFV. 421p
- Folmer, O. 1994.** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3:294–299.
- Fontes, P.C.R. & D.J.H Silva, 2002.** Doenças e pragas: é seguro comer tomate?, p.97-129. In: Produção de Tomate de Mesa. 196p.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. Baptista, E.B. Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramim, L.C. Marchini, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002.** Entomologia Agrícola. Piracicaba, FEALQ, 920p.
- Gavrilets, S. 2004.** Fitness Landscapes and the Origin of Species. Princeton University Press. 496p
- Gray, M.W. 1987.** A origem evolutiva das organelas. *Trends genet.* 5: 294-299.
- Gray, M.W., G. Burger & B.F. Lang. 2001.** The origin and early evolution of mitochondria. *Genome biol.* 2: 1018-1018.5.
- Gravena S. & S.R. Benvenega. 2003.** Manual prático para manejo de pragas do tomate. Jaboticabal: Gravena Ltda. 144 p.

- Guedes, R.N.C. & D.B. Fragoso. 1999.** Resistência a inseticidas: Bases gerais, situação e reflexões sobre o fenômeno em insetos-praga do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. I Encontro sobre produção de café com qualidade. Viçosa, UFV, p.99-120.
- Hebert, P.D.N. 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. Lond. B, 270: 313–321.
- Hiragi, C.K., E. Simões, E. Martins, P. Queiroz, L. Lima & R. Monnerat. 2009.** Variabilidade Genética em Populações de *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) Utilizando Marcadores de RAPD. Neotrop. Entomol. 38: 542-547.
- IBGE. 2011.** Levantamento sistemático da produção agrícola, tomate: produção e área. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em 04 de nov. 2013.
- Jaffe, K., B. Mirás & A. Cabrera. 2007.** Mate selection in the moth *Neoleucinodes elegantalis*: evidence for a supernormal chemical stimulus in sexual attraction. Anim. Behav. 73: 727-734
- Kirk, H., S. Dorn & D. Mazzi. 2013.** Molecular genetics and genomics generate new insights into invertebrate pest invasions. Evolution. App. 6: 842-856
- Kvist, L. 2000.** Phylogeny and phylogeography of European Parids. Oulu: University of Oulu, Acta Universitatis Ouluensis, Oulun Yliopisto, 51p.
- Leiderman, L. & H.F.G. SAUER. 1953.** A broca-pequena do fruto do tomateiro *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée, 1854). O Biológico. 19: 182-186.
- Lima, M.F., A.L. Boiça Jr. & R.S. Souza. 2001.** Efeito de inseticidas no controle da broca pequena *Neoleucinodes elegantalis* na cultura do tomateiro. Rev. Ecosistema 26: 54-57.
- Lovato, L. 2006.** Estudos morfológicos e análises de seqüências do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) em populações de *Atta cephalotes* L. 1758. Tese de Doutorado, UFPR, Curitiba, 41p.
- Lyra Neto, A.M.C. & A.A.F. Lima. 1998.** Infestação de cultivares de tomateiro por *Neoleucinodes elegantalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Pesqui. Agropec. Bras. 33: 221-223.
- Mallet, J. 1996.** The genetics of biological diversity: from varieties to species, p. 41-57. In: Biodiversity: a biology of numbers and difference, K. J. Gaston (Ed) Oxford University Press, Oxford. 480p.
- Margulis, L. 1996.** Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: Phylogenetic classification of life. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 1071–1076.
- Martinelli, S., M.A. Montagna, N.C. Picinato, F.M.A. Silva & O.A. Fernandes. 2003.** Eficácia do endoxacarb para o controle de pragas em hortaliças. Hortic. Bras. 21: 501-505.

- Martinez-Torres, D., F. Chandre, M.S. Williamson & F. Darriet. 1997.** Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* 7: 179-184.
- Martin, K.J. 2007.** Introduction to molecular analysis of ectomycorrhizal communities. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71: 601-610.
- Masaki, S. 1967.** Geographic variation and climate adaptation in the field cricket (Orthoptera: Gryllidae). *Evolution* 21: 725-741.
- Melo, P.C.T. & Vilela, N. J. 2005.** Desafios e perspectivas para a cadeia brasileira do tomate para processamento industrial. *Hortic. Bras.* 23: 154-157.
- Meyer, A. 1994.** Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular marker. *Trends in Ecology Evolution.* 9: 278-280.
- Miranda, M.M.M., M.C. Picanço, J.C. Zanuncio, L. Bacci & E.M., Silva. 2005.** Impact of integrated pest management on the population of leafminers, fruit borers, and natural enemies in tomato. *Ciência Rural* 35: 204-208.
- Miranda, M.M.M. 1997.** Impacto do manejo integrado na predação e no parasitismo das pragas do tomateiro. Dissertação de Mestrado, UFV, Viçosa, 105p.
- Muñoz, E., A. Serrano, J.I. Pulido & J. De La Cruz. 1991.** Ciclo de vida, hábitos y enemigos naturales de *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée, 1854), (Lepidoptera: Pyralidae), passador del fruto del lulo *Solanum quitoense* Lam. en el valle del cauca. *Acta. Agronomica.* 41: 99-104.
- Nei, M. 1987.** *Molecular evolutionary genetics.* New York, Columbia. 512p.
- Nunes, M.U.C. & M.L.S. Leal. 2001.** Efeito da aplicação de biofertilizante e outros produtos químicos e biológicos, no controle da broca-pequena do fruto e na produção do tomateiro tutorado em duas épocas de cultivo e dois sistemas de irrigação. *Hortic. Bras.* 19: 53-59.
- Pereira, S.L. 2000.** Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. *Genet. Mol. Biol.* 23:97-104.
- Reis, P.R. & J.C. Souza. 1996.** Controle da broca-pequena, *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae), com inseticidas fisiológicos, em tomateiro estaqueado. *An. Soc. Entomol. Brasil.* 25: 65-69.
- Roush, R.T. & J.C. Daly. 1990.** the role of population genetics in resistance research and management. in: roush, r. t.; tabashnik, b. e. (ed.). *pesticide resistance in arthropods.* new york: chapman and hall, 97-152.
- Saccone, C. 1999.** Evolutionary genomics in the Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene.* 238: 195-210.

- Salas, J., A. Cabrera & A. Parra. 1991.** Contribución al conocimiento de la ecología del perforador del fruto del tomate *Neoleucinodes elegantalis* Guenée (Lepidoptera: Pyrastidae). Agron. Trop. 41: 275-283.
- Sandre Jr., P., A.L. Silva, V.E.D. Alcantara & T.A. Farias. 1992.** Ensaio para o controle químico da broca pequena *Neoleucinodes elegantalis* (GUENÉE, 1854) (Lepidoptera - Pyralidae) do tomateiro. Na. Esc. Agron. Vet. 1: 127-131.
- Shutt, T.E. & M.W. Gray. 2006.** Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins. Trends. genet. 22: 90-95.
- Silva, A.C. & G.A. Carvalho. 2004.** Manejo Integrado de Pragas, p. 309-366. In: Alvarenga, M.A.R. (eds.), Tomate: produção em campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia. Lavras, Editora UFLA, 442p.
- Simpson, S.J., G.A. Sword & N. Lo. 2011.** Polyphenism in insects. Cur. Biol. 21: 738-749.
- Toledo, A.A. 1948.** Contribuição para o estudo da *Neoleucinodes elegantalis* (Guenée, 1854), praga do tomate. Biológico 14: 103-108.
- Torres, I.C., C. Kosmann & L.C. Arantes. 2010.** O futuro da entomologia forense: aliança entre taxonomia e biologia molecular. V Mostra de Produção Científica da Pós-graduação Lato Sensu da PUC Goiás, 20p
- Yan, G., D. Chadee & D. Severson. 1998.** Evidence for genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. *Genetics* 148: 793-800.
- Zucchi, R.A., S. Silveira Neto & O. NAKANO.1993.** Guia de identificação de pragas agrícolas. Piracicaba: FEALQ. 139p.



## CAPÍTULO 2

### GENÉTICA POPULACIONAL DE BROCA-PEQUENA-DO-TOMATE, *Neoleucinodes elegantalis* (GUENÉE, 1854) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

ANDRÉ V.P. MAIA<sup>1</sup>, CÍCERO C.S. ALMEIDA<sup>3</sup>, KLEBER R. SANTORO<sup>2</sup>, JOSÉ V.  
OLIVEIRA<sup>1</sup> E CESAR A. BADJI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manuel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 51171-900, Recife, PE

<sup>2</sup>Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Bom Pastor, s/n, Boa Vista, 55292-270, Garanhuns, PE

<sup>3</sup>Campus Arapiraca, Universidade Federal Rural de Alagoas, Av. Manoel Severino Barbosa, s/n, Bom Sucesso, 57309-005, Arapiraca, AL

---

<sup>1</sup>Maia, A.V.P., C.C.S. Almeida, K.R. Santoro, J.V. Oliveira & C.A. Badji. Diversidade genética entre populações de broca-pequena-do-tomate, *Neoleucinodes elegantalis* Guenée, 1854 (Lepidoptera: Crambidae). A ser submetido.

RESUMO - *Neoleucinodes elegantalis* Guenée, é uma importante praga da cultura do tomate no Brasil e está distribuída em quase todo o território brasileiro. Essa praga tem gerado prejuízos econômicos e, em função do modo de desenvolvimento, essa praga fica dentro do fruto durante parte do seu ciclo, permitindo maior resistência aos inseticidas e dificultando seu controle. O objetivo desse trabalho foi analisar a filogeografia de *N. elegantalis* no Brasil, a fim de compreender a estrutura populacional e padrões demográficos. Foram coletados larvas do inseto em oito localidades ao longo do território brasileiro e analisadas as sequências do gene mitocondrial cytochrome oxidase subunit 1 (CO1). Foi analisada uma região de 628 pb em 51 indivíduos, mostrando 12 haplótipos e uma diversidade de haplotípica (h) de 0,836. A análise espacial mostrou dois grupos bem definidos, indicando alta estruturação populacional e relação filogeográfica.

PALAVRAS-CHAVE: Filogeografia, inseto-praga, crop

POPULATION GENETICS IN SMALL TOMATO BORER *Neoleucinodes elegantalis*

(GUENÉE, 1854) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

**ABSTRACT** – *Neoleucinodes elegantalis* Guenée, is an important pest of tomato crop in Brazil and is distributed almost throughout the Brazilian territory. This pest has generated economic losses and, depending on the mode of development, this pest is inside the fruit during part of their cycle, allowing greater resistance to insecticides and difficulty in the control. The aim of this study was to analyze the phylogeography of *N. elegantalis* in Brazil in order to understand the population structure and demographic patterns. The larvae were collected in eight localities along the Brazilian territory and analyzed the sequences of the cytochrome oxidase subunit 1 (CO1) mitochondrial gene. A region of 628 bp in 51 individuals was analyzed, showing 12 haplotypes, with haplotype diversity (h) of 0.836. Spatial analysis showed two well defined groups, indicating high structure population and phylogeographic relationship.

**KEY WORDS:** Phylogeography, insect pest, crop

## Introdução

Dentre as pragas que infestam o tomateiro, a broca-pequena-do-tomate (BPT), *Neoleucinodes elegantalis* (Guen.) (Lepidoptera: Cambridae), é considerada uma das mais importantes no Brasil, Venezuela e Colômbia (Salas *et al.* 1991, Badji *et al.* 2003, Morais *et al.* 2007, Picanço *et al.* 2007). Em condições favoráveis ao crescimento populacional, infesta severamente os frutos, tornando-os impróprios para consumo e para o processamento industrial (Badji *et al.* 2003, Gravena & Benvenga 2003, Morais *et al.* 2007, Picanço *et al.* 2007), causando danos econômicos consideráveis à cultura do tomate e seu controle se torna necessário principalmente pela forma do seu ataque (Badji *et al.* 2003), a qual provoca injúrias nos frutos, provocando prejuízos de 50 a 90% na produção (Nunes & Leal 2001, Gallo *et al.* 2002, Gravena & Benvenga 2003, Miranda *et al.* 2005).

Eventos biogeográficos como oscilação no clima e mudança em habitats tem sido fator importante para explicação da distribuição geográfica de muitas espécies, principalmente os eventos ocorridos no pleistoceno com os ciclos glaciais. Essas condições podem promover uma distribuição espacial de demográfica para *N. elegantalis*. De fato, Díaz-Montilla *et al.* (2013) mostram distribuição espacial diferenciada para populações de *N. elegantalis* na Colômbia. Entretanto, a distribuição espacial dos insetos é influenciada não apenas por eventos biogeográficos, mas também por atividades do homem, principalmente com insetos pragas de plantas cultivadas, as quais são relacionadas com o movimento de populações humanas (Liebhold & Tobim 2008).

*Neoleucinodes elegantalis* no Brasil, pode está associada com a movimentação humana nas regiões de produção de tomate. Essas regiões se estendem desde as regiões mais frias do Sul do Brasil até as regiões mais quentes e secas do Nordeste, principalmente em áreas de floresta secas (Caatinga) e, apresentam diferenças quanto ao clima, relevo, composição fitosociológica,

histórias demográficas e estratégias de controle da praga. Nessas condições, é necessário conhecimento para diferenciar eventos biogeográficos de atividades humanas recentes.

O objetivo desse trabalho foi analisar a filogeografia de *N. elegantalis* no Brasil, a fim de compreender a estrutura populacional e padrões demográficos.

## Material e Métodos

**Local do experimento.** Os experimentos foram realizados na Central de Laboratório da Unidade Acadêmica de Garanhuns (CENLAG) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE / UAG) e no laboratório de Recursos Genéticos da Universidade Federal de Alagoas Campus Arapiraca (UFAL).

**Amostra populacional e extração do DNA.** Larvas do inseto foram coletadas em oito populações (51 indivíduos), distribuídas desde o Sudeste até o Nordeste do Brasil (Tabela 1 e Figura 1A), e mantidas em etanol 70%. Duas populações são da região Sudeste do Brasil, nos Estados de São Paulo e Minas Gerais e seis populações são de origem do Nordeste do Brasil, no Estado de Pernambuco em áreas de floresta seca (ver mapa na Figura 1A). A extração do DNA foi realizada usando protocolo com CTAB (Doyle & Doyle 1987), quantificado usando espectrofotômetro e a qualidade analisada em gel de agarose 1%.

**Amplificação e sequenciamento.** Foi amplificada a região do gene mitochondrial cytochrome oxidase subunit 1 (CO1) por PCR usando os primers CO1F 5'-ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG-3' e Cox1R 5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAATCA-3'. As reações foram feitas com um volume de 50 µl, contendo 5 µl tampão de reação; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM dNTP; 1,25 U Taq DNA polimerase, 0,5 µM de cada primer e 100 a 150 ng do DNA. A amplificação foi realizada em 94 °C por 4 min, seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 40 s, 55 °C por 35 s e 72 °C por 1 min e uma

extensão final a 74 °C por 4 min. Os produtos de PCR foram sequenciados usando BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®) com eletroforese em um 3500 Genetic Analyzers (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA).

O melhor modelo de substituição foi obtido usando o jModelTest 2.1.4 (Darriba *et al.* 2012) e o modelo HKY foi utilizado para posterior inferência filogenética usando análise baysiana. Análise baysiana foi realizada usando Beast v1.8.0 (Drummond & Rambaut 2007) com MCMC para 50 milhões de gerações e analisada a convergência usando Tracer v1.5. O tempo de divergência entre os clados foi estimado usando abordagem baysiana, implementado em Beast v.1.8.0, com uma corrida de 50 milhões de gerações e uncorrelated lognormal clock model and a constante tamanho populacional, utilizando os parâmetros de Papadopoulou *et al.* (2010) para o CO1.

Análise de estruturação populacional foi realizado usando SAMOVA A (Spatial Analyses of Molecular Variance) implementada no Arlequin v3.5.1.2, usando  $k$  grupos que maximize as variações entre os grupos, utilizando 1000 interações.

## Resultados

**Distribuição e diversidade de haplótipos.** Foi seqüenciada a região do gene CO1 de 51 indivíduos (oito populações) de *N. elegantalis*. A distribuição e a frequências são mostradas na Figura 1A e na Tabela 1. Haplótipos H6 e H10 ocorreram apenas nas populações do Sudeste do Brasil e os demais haplótipos foram encontrados apenas na região Nordeste do Brasil. Os haplótipos H1 e H5 ocorreram em alta frequência e os haplótipos H3, H2, H9 e H12 mostraram-se em baixa frequência nas populações do Nordeste do Brasil (Figura 1A). Diversidade haplótipo total ( $h$ ) foi de 0,4 na população de CO e 0,8 na população GA. A diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) variou de 0,0016 (população SJ) para 0,0435 (população ES) (Tabela 1).

**Relações filogenéticas e diferenças regionais.** As relações filogenéticas entre os haplótipos foram revelados na Estatística Bayesiana e a rede haplotípica foi obtida a partir da árvore de máxima verossimilhança. Os haplótipos H6 e/ou H10 foram os tipos basais (Figura 1B e 1C) e, a árvore Bayesiana (Figura 1B) mostrou a definição de dois grupos, correspondendo a populações do sudeste e populações do nordeste brasileiro. A rede de haplótipos mostrou o haplótipo H10 com nucleotídeos lager de substituição (Figura 1C), quando comparado com os outros. Os resultados da SAMOVA revelaram significância estatística ( $F_{CT} = 0.77$  e  $F_{ST} = 0,78$ ) (Tabela 2). As simulações para grupos  $k$  mostraram mais diferenças entre os grupos (77,12%), do que dentro dos grupos (Tabela 2).

### Discussão

*Neoleucinodes elegantalis* tem sido uma praga de grande importância para a cultura do tomate no Brasil. Este inseto é encontrado em todo o território nacional, se estendendo do Sul ao Norte do Brasil, apresentando uma ampla adaptação aos variados ambientes, habitando regiões frias da floresta atlântica do Sul até as regiões quentes e secas das florestas secas do Nordeste do Brasil (Carneiro *et al.* 1998). Neste trabalho, nós sequenciamos e analisamos a região do gene mitocondrial CO1 em diferentes populações de *N. elegantalis* distribuídas ao longo do território brasileiro. Nosso objetivo foi verificar o nível de diferenciação populacional e os padrões demográficos da espécie. Os resultados revelaram uma elevada estruturação populacional entre as populações oriundos da região Sudeste e Nordeste do Brasil. Os haplótipos encontrados em duas populações do Sudeste não foram observados na região Nordeste, da mesma forma que os haplótipos do Nordeste não foram encontrados nas populações do Sudeste. Este resultado mostra que não houve fluxo gênico entre as populações. Mesmo se tratando de uma praga que ataca frutos de tomate, essa condição parece não está associada com recente expansão da espécie.

Possivelmente, a larva do inseto não sobrevive às condições de transporte e armazenamento dos frutos entre as regiões, permitindo fluxo gênico.

Os dados de divergência entre os dois haplótipos do Sudeste e os 10 haplótipos do Nordeste do Brasil datam de 0.2 e 0.54 Mya (million of years ago). A estimativa de tempo de divergência usando os dados moleculares foram baseados nas taxas de mutações para o gene CO1 descrito por Papadopoulou *et al.* (2010). Em teoria, as flutuações climáticas do pleistoceno poderia ter causado fragmentação no habitat, criando fragmentos isolados e refúgios para muitas espécies. Recentes estudos têm mostrado uma divisão Norte-Sul da Floresta atlântica, indicando um cenário para estruturação geográfica de populações (Martins *et al.* 2011). Nossos resultados de tempo de divergência mostram que os clados do Sudeste e Nordeste foram separados na época do Pleistoceno, sugerindo que os padrões filogeográficos estão associados com refúgios ocorridos nessa época. Essa conclusão corrobora com estudos de Martins *et al.* (2011) em vertebrados, o qual mostra que os clados entre populações do Norte e Sul da floresta atlântica apresentam divergência entre 400-500 mil anos. Centro de endemismo de borboletas mostrou quatro regiões, das quais duas se encontram na região Sudeste e uma centro de endemismo em Pernambuco (Carnaval & Moritz 2008), apresentando corroboração com os resultados para *N. elegantalis*. Estudos com *N. elegantalis* na Colômbia mostraram uma diferenciação genética associada com montanhas andinas, que atuam como barreiras ao fluxo gênico (Díaz-Montilla *et al.* 2013), semelhante aos resultado encontrados no presente trabalho.

Os resultados do nosso trabalho concluem que as populações de *N. elegantalis* do Sudeste e Nordeste do Brasil apresentam elevada diferenciação genética para a região do gene CO1, o qual o tempo de divergência entre os grupos data aos eventos do Pleistoceno, nos quais os refúgios na floresta atlântica podem está relacionados com filogeografia de *N. elegantalis*.



## Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pela concessão de bolsa de estudo e Fundação para a Ciência e Tecnologia de Alagoas (FAPEAL) pelo apoio para a realização dos trabalhos de laboratório.

## Literatura Citada

- Badji, C.A., A.E. Eiras, A. Cabrera & K. Jaffe. 2003.** Avaliação do feromônio sexual de *Neoleucinodes elegantalis* Guenée (Lepidoptera: Crambidae). Neotrop. Entomol. 32: 221-229.
- Benvenga, S.R., S.A de Bortoli, S. Gravena & J.C. Barbosa. 2010.** Monitoramento da broca-pequena-do-fruto para tomada de decisão de controle em tomateiro estaqueado. Horticult. Bras. 28: 435-440.
- Carnaval, A.C. & C. Moritz. 2008.** Historical climate modeling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. J Biogeogr. 35: 1187-1201.
- Carneiro, J.S., F.N.P. Haji & F.A.M. Santos. 1998.** Bioecologia e controle da broca-pequena do tomateiro *Neoleucinodes elegantalis*. Teresina, Embrapa Meio-Norte, 14 p. (Circular Técnica 26).
- Darriba, D., G.L., Taboada, R. Doallo & D. Posada. 2012.** jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods. 9: 772.
- Díaz-Montilla, A.E., H.G. Suárez-Baron, G. Gallego-Sánchez, C.I. Saldamando-Benjumea, & J. Tohme. 2013.** Geographic Differentiation of Colombian *Neoleucinodes elegantalis* (Lepidoptera: Crambidae) Haplotypes: Evidence for Solanaceae Host Plant Association and Holdridge Life Zones for Genetic Differentiation. Ann. Entomol. Soc. Am. 106: 586-597.
- Doyle, J.J. & J.L. Doyle. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11-15.
- Drummond, A.J. & A. Rambaut. 2007.** BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evol. Biol. 7:214.
- Gallo, D., O. Nakano, S. Silveira Neto, R.P.L. Carvalho, G.C. de Batista, E. Berti Filho, J.R.P. Parra, R.A. Zucchi, S.B. Alves, J.D. Vendramin, L.C. Marchini, J.R.S. Lopes & C. Omoto. 2002.** Entomologia agrícola. Piracicaba: FEALQ, 920p.
- Gravena, S. & S.R. Benvenga. 2003.** Manual prático para manejo ecológico de pragas do tomate. Jaboticabal, 144p.

- Liebhold, A.M. & P.C. Tobin. 2008.** Population Ecology of Insect Invasions and Their Management. *Annu. Rev. Entomol.* 53:387–408.
- Martins, F.M. 2011.** Historical biogeography of the Brazilian Atlantic forest and the Carnaval–Moritz model of Pleistocene refugia: what do phylogeographical studies tell us? *Biol J Linn Soc.* 104: 499–509
- Morais, E.G.F., M.C. Picanço, M.E. de Sena, L. Bacci, G.A. Silva & M.R. de Campos. 2007.** Identificação das principais pragas de hortaliças no Brasil. In: Zambolim, L., C.A. Lopes, M.C. Picanço & H. (Ed.) Costa. *Manejo integrado de doenças e pragas: hortaliças.* Viçosa: UFV. p.199-232.
- Miranda, M.M.M., M.C. Picanço, J.C. Zanuncio, L. Bacci & E.M. da Silva. 2005.** Impact of integrated pest management on the population of leafminers, fruit borers, and natural enemies in tomato. *Cienc. Rural.* 35: 204–208.
- Nunes, M.U.C. & M.L.S. Leal. 2001.** Efeito da aplicação de biofertilizante e outros produtos químicos e biológicos, no controle da broca-pequena do fruto e na produção do tomateiro tutorado em duas épocas de cultivo e dois sistemas de irrigação. *Hortic. Bras.* 19: 53-59
- Papadopoulou A, I. Anastasiou & A.P. Vogler. 2010.** Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: The mid-Aegean trench calibration. *Mol. Biol. Evol.* 27:1659–1672.
- Picanço, M.C, L. Bacci, A.L.B. Crespo, M.M.M. Miranda & J.C. Martins. 2007.** Effect of integrated pest management practices on tomato production and conservation of natural enemies. *Agric. For. Entomol.* 9: 327-335.
- Salas, J., C. Alvarez & A. Parra. 1991.** Contribucion al conocimiento de la ecologia del perforador del fruto del tomate *Neoleucinodes elegantalis* Guenee (Lepidóptera: Pyrastidae). *Agron. Trop.* 41: 275-284.

Tabela 1. Localização e tamanho da amostra. Para cada população, a diversidade de haplótipos (h), a diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ), Fu e D de Li, D de Tajima e número de haplótipos de Tajima.

Localização da amostra	Tamanho da amostra	h	$\pi$	n° Haplótipos	Fu e Li D	Tajima's D
Garanhuns (GA)	9	0,80	0,0019	5	-0,264	-0,689
Petrolina (PT)	3	-	-	1	-	-
Coimbra (CO)	5	0,40	0,0063	2	-1,192	-1,192
Camocim (CM)	6	0,73	0,0034	3	-0,214	-0,144
Encruzilhada de S. João (ES)	7	0,52	0,0435	3	-0,519	-0,654
São José do R. Pardo (SP)	4	0,66	0,0416	2	2,223	2,223
Bezerros (BE)	8	0,75	0,0018	4	-0,632	-0,812
São João (SJ)	9	0,69	0,0016	4	-1,031	-0,842
		0,83			0,272	-0,579
Total	51	6	0,00608	12		

**CHECAR SE O ESPAÇAMENTO DA TABELA ESTÁ ADEQUADO**

Tabela 2. AMOVA resultados entre grupos.

Fonte de variação	d.f.	Percentagem de variação		P-valor
Entre grupos	1	77.12	$F_{CT} = 0.77$	$P < 0.0001$
Entra populações dentro dos grupos	6	1.07	$F_{SC} = 0.05$	$P < 0.0001$
Dentro da população	43	21.81	$F_{ST} = 0.78$	$P < 0.0001$
Total	50	100.00		

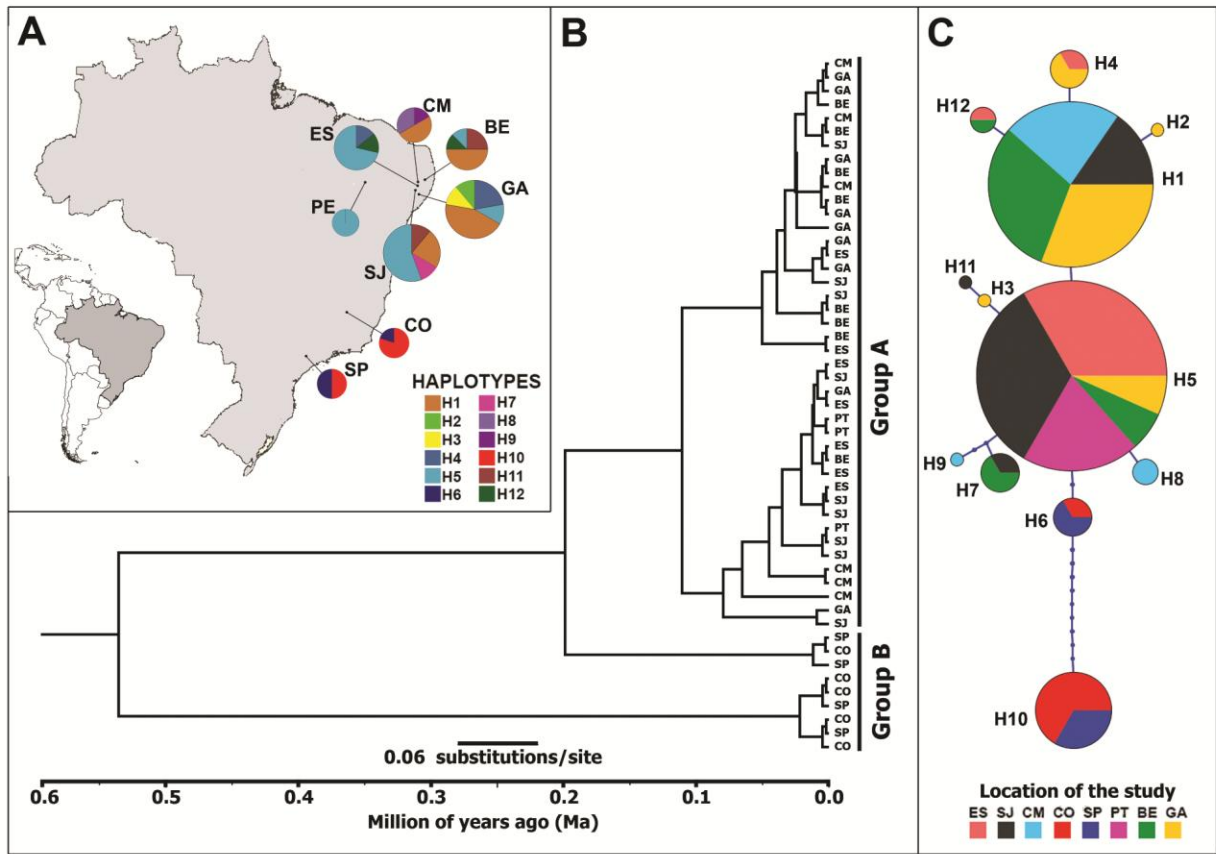


Figura 1 - Padrão geográfico de variação genética em *Neoleucinodes elegantalis*. (A) A frequência de haplótipos de mtDNA (CO1) por localidade. O tamanho de cada gráfico de pizza é proporcional ao tamanho da amostra em cada localidade (ver Tabela 1) e as cores correspondem aos haplótipos. (B) Análise filogenética Bayesiana de *cox1*. (C) Rede de haplótipos baseado no *cox1* mitocondrial. O tamanho dos Círculos é proporcional às frequências dos haplótipos e a cor indica grupos geográficos identificados no A.