

**Perfil molecular obtido por RAPD-PCR para as pragas de expressão econômica,
Grapholita molesta e quarentenária, *Grapholita prunivora* (Lepidoptera,
Tortricidae), para o Brasil**

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Helio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Silvio Crestana
Diretor Presidente

José Geraldo Eugênio de França
Kepler Euclides Filho
Tatiana Deane de Abreu Sá
Diretores Executivos

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe-Geral

Maurício Antônio Lopes
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Isabel de Oliveira Penteado
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

Maria do Rosário de Moraes
Chefe-Adjunto de Administração

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 102

Perfil molecular obtido por RAPD-PCR para as pragas de expressão econômica, *Grapholita molesta* e quarentenária, *Grapholita prunivora* (Lepidoptera, Tortricidae), para o Brasil

Luzia Helena Corrêa Lima

Paulo Roberto Queiroz

Rose Monnerat

Cássia de Oliveira Hiragi

Kenya Carla Cardoso Simões

Daniel Carlos Almeida

Shirley Franx Silva

Karen Regina Vilarinho

Maria Regina Vilarinho de Oliveira

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Serviço de Atendimento ao Cidadão

Parque Estação Biológica, Av. W/5 Norte (Final) –

Brasília, DF CEP 70770-900 – Caixa Postal 02372 PABX: (61) 3348-4739 Fax: (61)

3340-3666 TUTUTU <http://www.cenargen.embrapa.br>

e.mail:sac@cenargen.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Maria Isabel de Oliveira Penteado*

Secretário-Executivo: *Maria da Graça Simões Pires Negrão*

Membros: *Arthur da Silva Marante*

Maria Alice Bianchi

Maria de Fátima Batista

Maurício Machain Franco

Regina Maria Dechechi Carneiro

Sueli Correa Marques de Mello

Vera Tavares de Campos Carneiro

Supervisor editorial: *Maria da Graça S. P. Negrão*

Normalização Bibliográfica: *Maria Lara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria da Graça S. P. Negrão*

1ª edição

1ª impressão (2005):

P 439 Perfil molecular obtido por RAPD-PCR para as pragas de expressão econômica, *Grapholita molesta* e quarentenária, *Grapholita prunivora* (Lepidoptera, Tortricidae), para o Brasil / Luzia Helena Corrêa Lima ... [et al.]. – Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005.

44 p. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 – 1340; 102)

1. *Grapholita molesta* – praga quarentenária – Brasil. 2. *Grapholita prunivora* – praga quarentenária – Brasil. 3. Insetos exóticos - coleção biológica de referência. 4. Praga quarentenária – perfil molecular - RAPD-PCR. I. Lima, Luzia Helena Corrêa. II. Série.

632.93 – CDD 21.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	8
INTRODUÇÃO	9
MATERIAIS E MÉTODOS	12
<i>Insetos</i>	12
<i>Perfil molecular</i>	12
<i>Reações de RAPD-PCR</i>	13
<i>Obtenção de perfis eletroforéticos</i>	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
1. Descrição das fichas bioecológicas das espécies de insetos utilizadas nesse trabalho	14
1.1. <i>Grapholita molesta</i> (Busck)	14
1.2. <i>Grapholita prunivora</i> (Walsh).....	20
1.3. <i>Spodoptera frugiperda</i> (J. E. Smith, 1797)	24
2. Definições de perfis eletroforéticos.....	27
CONCLUSÃO	31
AGRADECIMENTOS	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

Perfil molecular obtido por RAPD-PCR para as pragas de expressão econômica, *Grapholita molesta* e quarentenária, *Grapholita prunivora* (Lepidoptera, Tortricidae), para o Brasil

Luzia Helena Corrêa Lima⁹
Paulo Roberto Queiroz⁴
Rose Monnerat⁵
Cássia de Oliveira Hiragi⁶
Kenya Carla Cardoso Simões⁷
Daniel Carlos Almeida⁸
Shirley Franx Silva¹
Karen Regina Vilarinho²
Maria Regina Vilarinho de Oliveira³

RESUMO

O aumento na demanda de frutas no comércio internacional vem contribuindo de forma preponderante para o incremento das exportações brasileiras, gerando empregos na área rural. Entretanto, uma das conseqüências da globalização da economia é a dispersão de espécies invasoras exóticas. Medidas quarentenárias desempenham papéis importantes contribuindo para barrar a entrada dessas espécies. *Grapholita molesta* (Busck, 1916) e *G. prunivora* (Walsh, 1868), são pragas de expressão econômica e quarentenária para o Brasil, respectivamente. Elas compõem a “Coleção biológica de referência de insetos exóticos” da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. O perfil molecular para essas pragas foi determinado por meio de RAP-

¹ Bióloga, Doutora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970. E.mail: vilarin@cenargen.embrapa.br

¹ Graduanda Geografia, Estagiária, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970. E.mail: shirley@cenargen.embrapa.br

¹ Bióloga, Mestranda, Departamento de Produção Vegetal, Universidade de Brasília/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970. Email: karen@cenargen.embrapa.br

⁴ Biólogo, Doutorando, Departamento de Biologia Animal, Universidade de Brasília/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970. E.mail: queiroz@cenargen.embrapa.br

⁵ Bióloga, Doutora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970. E.mail: rose@cenargen.embrapa.br

⁶ Bióloga, Mestre, Departamento de Biologia Animal, Universidade de Brasília/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970.

⁷ Bióloga, Departamento de Biologia - UNICEUB/ Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970.

⁸ Graduando Biólogo, Estagiário, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970.

⁹ Bióloga, Doutora, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Caixa Postal 02372, CEP 70849-970. E.mail: luzia@cenargen.embrapa.br

PCR. O protocolo molecular otimizado deverá ser aplicado quando da suspeita ou interceptação da praga quarentenária no país, contribuindo para a concretização de ações quarentenárias e no estabelecimento e desenvolvimento de um banco de marcadores moleculares baseados em RAPD para insetos exóticos. A técnica de RAPD-PCR (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) se baseia na amplificação do DNA, gerando simplicidade e rapidez a baixos custos ao mesmo tempo em que facilita a identificação de uma praga quarentenária.

RAPD-PCR fingerprinting of the pests of economic, *Grapholita molesta* and quarantine, *Grapholita prunivora* (Lepidoptera, Tortricidae), importance to Brazil.

ABSTRACT

Introdução

O aumento na demanda de frutas no comércio internacional vem contribuindo de forma preponderante para o aumento do PIB brasileiro, gerando empregos na área rural e, conseqüentemente, melhoria na qualidade dos habitantes do campo. Apesar de todos os esforços por parte de organizações internacionais e nacionais para gerenciar os diferentes segmentos de agronegócio, incluindo o de frutíferas, as nações mais desenvolvidas impõem grandes pressões econômicas aos países em desenvolvimento. Desse modo, na mesma proporção em que aumenta o volume do comércio, surgem as barreiras fitossanitárias em decorrência da presença de pragas indesejadas nesses produtos.

A contribuição da atividade humana para a ocorrência de invasão de espécies de plantas, animais e microrganismos exóticos é reconhecida, principalmente pelo movimento de pessoas e mercadorias para condução desse processo. Desde os primórdios da agricultura, esses organismos têm sido intencionalmente transportados de uma para outra região do mundo, fazendo com que nos anos recentes tenha sido muito grande o volume das espécies introduzidas nos diversos locais do Planeta. Muitas dessas espécies tornaram-se pragas em várias regiões do mundo.

De acordo com a FAO (2002), praga é qualquer espécie, raça ou biótipo de vegetais, animais ou agentes patogênicos, nocivos aos vegetais ou produtos vegetais. Praga quarentenária é um organismo de expressão econômica potencial para a área posta em perigo e onde ainda não está presente, ou se está, não se encontra amplamente distribuída e é oficialmente controlada (FAO, 2002). Entende-se também como sinônimo de pragas quarentenárias, as espécies exóticas – EE, cuja definição é: espécies ou subespécies ou grupos táxons inferiores, introduzidos fora de seu habitat natural ou presente distribuição geográfica; inclui qualquer parte de tais espécies como gametas, ovos ou propágulos que possam sobreviver e subseqüentemente reproduzir. Por “espécie invasora exótica” – EIE, entende-se uma espécie exótica cuja introdução e ou dispersão ameaça a diversidade biológica (CBD, 2002).

Dentro dessa perspectiva, a Estação Quarentenária de Germoplasma Vegetal – EQGV, da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, tem como uma de suas atribuições, a estruturação de uma “Coleção biológica de referência de insetos exóticos”. A elaboração de informes bioecológicos da praga, considerando a abordagem de prevenção de entrada da praga no país associado à determinação do perfil molecular de RAPD-PCR (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), contribui para a concretização de ações quarentenárias e no estabelecimento e desenvolvimento futuro de um banco de marcadores moleculares. Isso permitirá a identificação rápida e segura de uma praga exótica ao ser interceptada em um ponto de entrada no país, colaborando para a adoção de medidas quarentenárias e fitossanitárias de forma mais eficiente.

Grapholita molesta (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae), conhecida comumente por mariposa oriental, é nativa do continente asiático e foi introduzida no Brasil em 1929, no Estado do Rio Grande do Sul (ARIOLI et al., 2004), dispersando-se para os demais estados das regiões Centro-Sul (ARIOLI et al., 2004). A grafolita é uma praga polífaga, que ataca preferencialmente rosáceas. Ela se desenvolve em diversas plantas frutíferas, como ameixeira, cerejeira, pereira, pessegueiro, nectarineiro, marmeleiro, macieira e nespeira, entre outras (SALLES, 2001). A literatura refere também o ataque da grafolita em caqui, uva, noqueira-pecã e rosa, embora ainda não tenha sido constatado sua presença nesses hospedeiros no sul do Brasil (SALLES, 2001).

Dentro da categoria de outras frutíferas, a macieira, cultura de grande expressão na exportação de frutas no sul do Brasil pode ser comprometida pela presença da mariposa-oriental, *G. molesta*, que se alimenta dos frutos e é considerada praga-chave da cultura (FERREIRA et al., 2005).

Além das pragas já existentes no sistema de produção de frutíferas temperadas, outras exóticas ao país podem ser introduzidas e, uma vez estabelecidas, poderão causar grande impacto econômico, social e ambiental. Entre as pragas quarentenárias para frutíferas temperadas temos a pequena traça-da-maçã, *Grapholita prunivora*

(Walsh) (PAULA et al., 2004). A larva, enquanto se alimenta, faz galerias superficiais com menos de 6mm de profundidade sob a casca, que a princípio permanece intacta e depois fica enrugada, tornando-se marrom e formando ampolas onde os excrementos são acumulados. As maçãs atacadas pela primeira geração de larvas tendem a cair prematuramente e, quando atacadas no final da estação, o fruto permanece na árvore até a colheita, mas inapto para a comercialização (SMITH et al., 1992; PAULA et al., 2004).

Para efeito de determinação do perfil molecular de *G. molesta* e *G. prunivora*, nesse trabalho, *Spodoptera frugiperda* (Smith), foi utilizada como espécie-padrão. Esta é uma das principais pragas do arroz e milho, no continente americano. Vulgarmente conhecida como a lagarta-do-cartucho do milho ou lagarta-militar é considerada a mais importante praga do milho no país. O seu ataque ocorre em todos os estádios da cultura, podendo causar perdas de até 39%, dependendo, principalmente, do estágio da cultura em que ocorre o ataque (BOGORNÍ e VENDRAMIM, 2003; VIANA e PRATES, 2003). Nagoshi e Meagher (2004), relacionam duas raças para essa espécie, a raça do arroz e a do milho.

A metodologia de trabalho constará da elaboração das fichas biológicas de *G. molesta* e *G. prunivora*, considerando a abordagem de prevenção de entrada da praga no país e de *S. frugiperda*, pela expressão econômica que ela representa para as culturas de milho e arroz. Também terá como objetivo determinar o perfil molecular por meio de RAPD, para essa espécie, de forma a subsidiar as medidas quarentenárias que, por ventura, necessitem ser aplicada para essa espécie quarentenária que integra a coleção biológica de referência de insetos quarentenários, se houver interceptação ou introdução da praga no país.

MATERIAIS E MÉTODOS

Insetos

Os insetos utilizados nesse trabalho foram, *S. frugiperda*, *G. molesta* e *G. prunivora*.

S. frugiperda foi utilizada como espécie-padrão para a determinação do perfil molecular utilizando-se o RAPD-PCR. Larvas de terceiro instar, em número de cinco, foram coletadas na “Colônia de criação de insetos” da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Essa colônia foi estabelecida em 1990 e é constituída de populações originárias da Embrapa Milho e Sorgo, da cultura do milho. A fase imatura é mantida em dieta artificial, conforme estabelecido por Schmidt et al. (2001). A criação das larvas foi realizada em ambiente com temperatura constante de $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h.

O material analisado de *G. molesta* e *G. prunivora* é originário do Yakima Agricultural Research, ARS/USDA, estado de Washington, Estados Unidos da América. Utilizou-se, para análise das amostras, larva de *G. molesta* e de *G. prunivora*, respectivamente.

Perfil molecular

O procedimento utilizado para a obtenção de perfis moleculares de *G. molesta* e *G. prunivora* foi otimizado com base no protocolo previamente estabelecido para *Helicoverpa armigera* (Lima et al., trabalho não publicado).

Os insetos foram submetidos à maceração e, em seguida, adicionados a 500 μL de tampão de extração (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM, Triton X-100 0,3% e Proteinase K 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), incubando-se por 30min a 65 $^{\circ}\text{C}$. Em seguida, adicionaram-se 500 μL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). As fases foram homogeneizadas em vortex por 5s. Após a homogeneização, o material foi centrifugado por 10min a 10.000xg e a 10 $^{\circ}\text{C}$. A fase aquosa foi então transferida para um novo tubo plástico, repetindo-se a etapa anteriormente descrita.

O DNA foi precipitado pela adição de 30 μ L de NaCl 5M e 1mL de etanol absoluto, incubando-se por 2h a – 20°C. Após centrifugação a 10.000xg por 10min a 10°C, o DNA precipitado foi lavado duas vezes com 500 μ L de etanol 70%, seco à temperatura ambiente, ressuspenso em TE 0,1X (Tris-HCl 1mM pH 8, EDTA 0,1mM) e armazenado a –20°C. Para as análises de RAPD, utilizou-se o DNA das amostras de *G. molesta*, *G. prunivora* e de *S. frugiperda* diluídas 50X em TE 0,1X.

Reações de RAPD-PCR

Para os estudos de caracterização molecular, utilizaram-se 5 μ L do DNA diluídos (100ng) em 30 μ L de uma reação de RAPD-PCR, contendo 3,0 μ L de tampão 10X (Amersham), 0,6 μ L de dNTP's 10mM, 1,2 μ L de um primer 10 μ M de seqüência aleatória da Operon Technologies, Inc. (Tabela 1), 0,3 μ L de enzima *Taq* DNA polimerase (Pharmacia), na concentração de 2,5U. μ L⁻¹ e 24,9 μ L de água milliQ destilada. Após a adição do DNA, as reações foram cobertas com óleo mineral.

Tabela 1 – Primers usados nas reações de RAPD-PCR.

Primer	Seqüência (5' → 3')
OPA-03	AGT CAG CCA C
OPA-04	AAT CGG GCT G
OPA-10	GTG ATC GCA G
OPA-11	CAA TCG CCG T
OPA-13	CAG CAC CCA C
OPA-18	AGG TGA CCG T
OPR-01	TGC GGG TCC T
OPR-02	CAC AGC TGC C
OPR-04	CCC GTA GCA C
OPR-08	CCC GTT GCC T

Obtenção de perfis eletroforéticos

As ampliações foram efetuadas em termociclador (PTC 100 MJ Research) programado para 45 ciclos, contendo uma etapa inicial de desnaturação de 3min a 94°C. Cada ciclo foi constituído de uma etapa de desnaturação de 1min a 93°C, anelamento por 1min a 35°C e extensão por 2min a 72°C. Após os ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final de 5min a 72°C. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 1,5% submerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 9mM e EDTA 1mM), fotografados e arquivados no sistema de fotodocumentação (Eagleeye). Em todos os géis, marcadores de massa molecular (Ladder 100 bp - GIBCO) foram usados para a determinação do tamanho dos fragmentos amplificados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Descrição das fichas bioecológicas das espécies de insetos utilizadas nesse trabalho

1.1. *Grapholita molesta* (Busck)

Posição Taxonômica

Classe: Insecta

Ordem: Lepidoptera

Família: Tortricidae

Sinonímia

Cydia molesta

Nomes Vulgares

eastern moth
eastern peach fruit moth
mariposa oriental
oriental fruit moth
oriental peach moth
pear piercing moth
Tordeuse orientale du pecher
torduse orientale

Plantas Hospedeiras

Cydonia sp. (Rosaceae) (GARIC et al., 1990; IL'ICHEV e FLETT, 1999)

Cydonia oblonga (marmelo, Rosaceae) (IL'ICHEV e FLETT, 1999)

Malus pumila (maçã, Rosaceae) (IL'ICHEV e FLETT, 1999; BRENIAUX, 2001; OKAZAKI e IZAWA, 2003; GONZALEZ e VOLOSKY, 2004; KOVANCI et al., 2004; TOMSE et al., 2004; TSCHUDI REIN et al., 2004; WALDSTEIN e GUT, 2004)

Prunus armeniaca (damasco, Rosaceae) (IL'ICHEV e FLETT, 1999)

Prunus avium (cereja, Rosaceae) (IL'ICHEV e FLETT, 1999)

Prunus domestica (ameixa, Rosaceae) (ANDREEV e KUTINKOVA, 2004; DICKLER et al., 2004)

Prunus persica (pêssego, Rosaceae) (TOTH et al., 1991; ATANOV, 1993; OS'KIN, 1996; MURRELL e LO, 1998; POLESNY, 1999; SOUZA et al., 2000; BLOMEFIELD e BARNES, 2000; IVASCU et al., 2000; NUNEZ e SCATONI, 2001; OKAZAKI e IZAWA, 2003; IL'ICHEV et al., 2004; KIM et al., 2004; KOVANCI et al., 2004; LLANOS e MARIN, 2004; MOLINARI et al., 2004; TOMSE et al., 2004; TSIPOURIDIS et al., 2004; ARIOLI et al., 2005)

Pyrus communis (pêra, Rosaceae) (IL'ICHEV e FLETT, 1999; IL'ICHEV et al., 2004)

Pyrus sp. (Rosaceae) (PAN et al., 2002)

Vitis vinifera (uva, Vitaceae) (KOS, 2003)

Distribuição Geográfica

Ásia

China (PAN et al., 2002)

Coréia do Sul (KIM et al., 2004)

Japão (OKAZAKI e IZAWA, 2003)

Uzbequistão (ATANOV, 1993)

África

África do Sul (BLOMEFIELD e BARNES, 2000)

América do Norte

Estados Unidos (KOVANCI et al., 2004)

Canadá (TRIMBLE et al., 2004)

América do Sul

Argentina (LLANOS e MARIN, 2004)

Brazil

Minas Gerais (SOUZA et al., 2000)

Rio Grande do Sul (ARIOLI et al., 2005)

Santa Catarina (REIS, 1988)

Chile (GONZALEZ e VOLOSKY, 2004)

Uruguai (NUNEZ e SCATONI, 2001)

Europa

Alemanha (DICKLER et al., 2004)

Áustria (POLESNY, 1999)

Bulgária (ANDREEV e KUTINKOVA, 2004)

Croácia (BARIC e CIGLAR, 2003)

Eslovênia (KOS, 2003; TOMSE et al., 2004)

França (BRENIAUX, 2001)

Grécia (TSIPOURIDIS et al., 2004)
Hungria (TOTH et al., 1991)
Itália (MOLINARI et al., 2004)
República Tcheca (HRUDOVA, 2005)
Romênia (IVASCU et al., 2000)
Rússia (OS'KIN, 1996)
Sérvia e Montenegro (GARIC et al., 1990)
Suécia (SVENSSON, 1994)
Suíça (TSCHUDI REIN et al., 2004)
Ucrânia (OMELYUTA e CHERNISHOV, 1997)

Oceania

Austrália (IL'ICHEV e FLETT, 1999; IL'ICHEV et al., 2004)
Nova Zelândia (MURRELL e LO, 1998)

Via-de-ingresso

Ramos, frutos, gemas (EPPO, 2004).

Sintomas

As gerações pré-iniciais da larva perfuram partes dos ramos terminais e causam a murcharção (EPPO, 2004). Os danos provocados pelas lagartas e a intensidade de ataque dependem da geração da praga e do período de desenvolvimento da cultura. O dano nos ramos é significativo em pomares jovens e viveiros onde as plantas encontram-se em formação. O dano aos frutos pode ser provocado por lagartas desenvolvidas, oriundas das brotações e que migram para os frutos, ou por lagartas recém-eclodidas. No primeiro caso, observa-se um orifício de entrada relativamente grande, geralmente apresentando uma folha aderida ao mesmo. No segundo, a penetração ocorre na região do pedúnculo, sendo de difícil percepção. No interior do fruto as lagartas formam galerias em direção ao caroço, liberando os excrementos na

superfície, tornando-os imprestáveis para o comércio. Um prejuízo adicional do ataque da mariposa oriental é o dano indireto, resultante da abertura de porta de entrada para a podridão parda causada pelo fungo *Monilinia fructicola*, que eleva as perdas durante a fase de amadurecimento dos frutos nos pomares e, ainda, durante o armazenamento (BOTTON et al., 2005).

Bioecologia

De acordo com Botton et al. (2005), *G. Molesta* está distribuída em praticamente todas as regiões produtoras de pêssigo e de outras frutíferas da família das rosáceas. O adulto é uma mariposa de coloração pardo-escuro, com envergadura de asas entre 10 a 15 mm e comprimento do corpo variando de 5,5 a 7 mm. O acasalamento ocorre ao entardecer, sendo que os ovos são depositados isoladamente na face inferior de folhas novas ou diretamente sobre ramos não lignificados. Logo após a eclosão, as lagartas penetram nos ponteiros ou frutos. Uma única lagarta pode se alimentar de 3 a 7 ramos diferentes na mesma planta, geralmente próximos entre si. O ataque aos frutos pode ocorrer durante o movimento das lagartas entre ramos. As pupas medem entre 5 e 7 mm localizando-se, geralmente, sob fendas da casca no tronco, na região da base do pedúnculo dos frutos ou no solo, na área de projeção da copa. As primeiras mariposas que dão origem ao novo ciclo anual são procedentes das lagartas que passaram o inverno em diapausa. As fêmeas iniciam a oviposição um a três dias após o acasalamento, ovipositando de 30 a 40 ovos. O desenvolvimento do inseto é influenciado principalmente pela temperatura, variando o número de gerações anuais de acordo com as condições climáticas de cada região. A duração média das fases de desenvolvimento (dias), de *G. molesta* na temperatura de 26°C, são: ovo (3,1); larva (12,3); pré-pupa (3,4); pupa (7,7); adulto (14,8) e pré-oviposição (2 a 3) (GRELLMANN, 1992; SALLES, 1998; BOTTON et al., 2005). No Brasil, são observadas de 4 a 6 gerações sobre a cultura do pessegueiro (BOTTON et al., 2005).

Detecção

G. molesta entra em diapausa como larva madura em casulos, nas fendas sob a casca, no solo, em velhos recipientes ou embalagens de frutas. Os primeiros adultos aparecem quando o pêssego está em floração. As fêmeas depositam de 20 a 50 ovos embaixo da folha ou em ramos novos. As gerações pré-iniciais da larva perfuram partes dos ramos terminais e causam a murcharação. Antes da maturação, uma única larva pode destruir de 2 a 5 ramos. A larva empupa no tronco da árvore ou no chão. *G. molesta* pode completar de 3 a 4 gerações por ano. As larvas no verão alimentam-se nos frutos, quando os novos ramos começam a endurecer (EPPO, 2004).

Expressão Econômica

A espécie, *G. molesta* está entre os lepidopteros da família Tortricidae, de expressão econômica para o Uruguai (Bentancourt & Scatoni, 1989). *G. molesta* é uma praga de importância para a cultura da pêra na província de Hubei, China (PAN et al., 2002). As principais pragas do pêssego são *G. molesta* e *Anastrepha fraterculus*, que causam 100% de dano em pomares não tratados (BOTTON et al., 2002).

MONITORAMENTO

De acordo com Botton et al. (2003), o monitoramento da *G. Molesta* é realizado por meio de armadilhas contendo o feromônio sexual sintético. O feromônio é uma substância emitida pela fêmea com o objetivo de atrair os machos para o acasalamento. Os componentes ativos, sintetizados em laboratório, são impregnados em septos de borracha e dispostos em armadilhas com fundo adesivo, fixadas nas plantas de pessegueiro. O feromônio sexual sintético é liberado gradativamente no ambiente, atraindo os machos que ficam aprisionados nas armadilhas permitindo aos produtores acompanhar a população da praga nos pomares, direcionando os tratamentos. A armadilha deve ser instalada no pomar no início da brotação devendo ser mantida até a colheita. Recomenda-se posicioná-la numa planta no interior do

pomar a uma altura de 1,7 m do nível do solo, em local livre de ramos que possam interferir na captura dos insetos.

Em pomares homogêneos, emprega-se uma armadilha para cada 5 ha. Entretanto, em pomares menores, recomendam-se no mínimo duas armadilhas por pomar. Os septos devem ser substituídos a cada seis semanas. Atenção especial deve ser dada ao fundo adesivo da armadilha, pois a ocorrência de períodos chuvosos, bem como a presença de grande quantidade de detritos e poeira ou o elevado número de insetos capturados ocasionam perda de adesividade, prejudicando a avaliação da flutuação populacional. O produtor deve observar as armadilhas e proceder à contagem e retirada dos insetos capturados semanalmente.

Na região da Serra Gaúcha, o ataque das lagartas da mariposa oriental inicia logo após a brotação do pessegueiro (fins de agosto/início de setembro) nas cultivares precoces. São observados quatro períodos distintos de vôo dos adultos durante a estação produtiva do pessegueiro: meados de agosto, segunda quinzena de outubro, primeira semana de dezembro e primeira semana de janeiro. O controle da praga deve ser direcionado aos períodos de vôo estabelecendo-se como nível de controle da praga a captura de 20 machos/armadilha/semana (BOTTON et al., 2005).

O comportamento da praga deve ser observado nos diferentes pomares para verificar a necessidade de antecipar ou retardar a adoção de medidas de controle em função das características locais onde o pessegueiro é cultivado. As pastilhas contendo feromônio sexual devem ser armazenados em refrigerador (4°C) no máximo por um ano, sendo retirados apenas no momento de levá-los à campo. Para o seu manuseio, não se recomenda o contato manual, pois isso pode acarretar alteração no comportamento do composto (feromônio) (BOTTON et al., 2005).

1.2. *Grapholita prunivora* (Walsh)

Posição Taxonômica

Classe: Insecta

Ordem: Lepidoptera

Família: Tortricidae

Sinonímia

Cydia prunivora (Walsh)

Epinotia prunivora

Sesamia prunivora (Walsh)

Laspeyresia prunivora (Walsh)

Enarmonia prunivora (Walsh)

Nomes Vulgares

carpocapse (petit) de la pomme

lesser appleworm

petite pyrale de la pomme

plum moth

Plantas Hospedeiras

Crataegus holmesiana, Rosaceae (SMITH et al., 1997)

Crataegus spp., Rosaceae (SMITH et al., 1997)

Malus domestica (maçã), Rosaceae (COMMONWEALTH INSTITUTE OF ENTOMOLOGY, 1975)

Photinia spp., Rosaceae (SMITH et al., 1992)

Prunus cerasus (cereja), Rosaceae (COMMONWEALTH INSTITUTE OF ENTOMOLOGY, 1975)

Prunus domestica (ameixa), Rosaceae (COMMONWEALTH INSTITUTE OF ENTOMOLOGY, 1975)

Prunus persica (pêssego), Rosaceae (COMMONWEALTH INSTITUTE OF ENTOMOLOGY, 1975)

Quercus sp. (carvalho), Fagaceae (SMITH et al., 1992)

Rosa sinensis, Rosaceae (COMMONWEALTH INSTITUTE OF ENTOMOLOGY, 1975)

Ulmus sp., Ulmaceae (SMITH et al., 1992)

Distribuição Geográfica

América do Norte

Canadá

Colúmbia Britânica (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Manitoba (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Nova Brunswick (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Nova Escócia (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Ontário (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Quebec (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Estados Unidos América

Arkansas (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Califórnia (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Colorado (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Geórgia (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Idaho (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Illinois (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Indiana (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Iowa (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Maine (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Maryland (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Massachusetts (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Michigan (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Missouri (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Nova Iorque (CAB INTERNATIONAL, 1999)
Ohio (CAB INTERNATIONAL, 1999)
Oregon (CAB INTERNATIONAL, 1999)
Pennsylvania (CAB INTERNATIONAL, 1999)
Virginia (CAB INTERNATIONAL, 1999)
Washington (CAB INTERNATIONAL, 1999)
West Virgínia (CAB INTERNATIONAL, 1999)
Wisconsin (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Ásia

China

Heilongjiang (CAB INTERNATIONAL, 1999)

Bioecologia

A maioria das larvas da primeira geração completa seu desenvolvimento sobre frutos caídos. Os adultos de *C. prunivora* da segunda geração podem produzir uma terceira geração abortiva. Desse modo, que embora ocorra eclosão dos ovos, as larvas resultantes são aparentemente inábeis para completar o desenvolvimento (SMITH et al., 1992) (PAULA et al., 2004).

Sintomas

A larva enquanto se alimenta faz galerias superficiais com menos de 6 mm de profundidade sob a casca, que a princípio permanece intacta e depois fica enrugada, tornando-se marrom e formando ampolas onde os excrementos são acumulados. As ampolas geralmente são formadas na extremidade do cálice do fruto, mas podem ser encontradas próximas ao pedúnculo. As maçãs atacadas pela primeira geração de larvas tendem a cair prematuramente e quando atacadas no final da estação, o fruto permanece na árvore até a colheita, mas é inapto para a comercialização (SMITH et al., 1992; PAULA et al., 2004).

Medidas Quarentenárias

Em geral, todas as plantas com origem de *Crataegus*, *Malus*, *Prunus* e *Rosa* vindas de países onde a praga ocorre devem ser livres de flores e frutos e o material deve ter sido cultivado em meio orgânico ou meio de crescimento tratado ou testado contra *C. prunivora*. Além disso, a *commodity* deve ser mantida em condições que impeçam a reinfestação pelo organismo. A fumigação com brometo de metila tem sido utilizada para o controle em frutas frescas (SMITH et al., 1997; PAULA et al., 2004).

1.3. *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797)

Posição Taxonômica

Classe: Insecta

Ordem: Lepidoptera

Família: Noctuidae

Sinonímia

Laphygma frugiperda

Noctua frugiperda

Phalaena frugiperda

Nomes Vulgares

fall armyworm

gusano cogollero

lagarta-do-cartucho

lagarta-do-cartucho do milho

lagarta-dos-arrozais

lagarta militar

Plantas Hospedeiras

Arachis hypogea (amendoim), Fabaceae (MEAGHER JUNIOR e MITCHELL, 2001)

Brassica oleracea var. *capitata* (repolho), Brassicaceae (ARMSTRONG, 1994)

Gossypium hirsutum (algodão), Malvaceae (FERNANDES et al., 2002)

Oryza sativa (arroz) Poaceae (DIDONET et al., 2001; IAPAR, 2001; BUSATO et al., 2005)

Zea mays (milho) Poaceae (EVANS e STANSLY, 1990; VANEGAS, 1990; GONZALEZ et al., 1994; LOPEZ e REYES, 1995; SILVA et al., 2000; JOSE FERNANDEZ et al., 2001; PINANGO et al., 2001; GARCIA et al., 2002; BASTOS et al., 2003; BLEICHER et al., 2003; GUERREIRO et al., 2003; KUNIYOSHI et al., 2003; VARGAS e BOBADILLA, 2003; GIAVENO et al., 2004; NAGOSHI e MEAGHER, 2004; BUSATO et al., 2005)

Saccharum officinarum (cana-de-açúcar), Poaceae (BADILLA FERNANDEZ, 2002)

Triticum aestivum (trigo) Poaceae (GOMEZ e AVILA, 2001)

Distribuição Geográfica

América Central e Caribe

Cuba (JOSE FERNANDEZ et al., 2001)

Costa Rica (BADILLA FERNANDEZ, 2002)

Honduras (KUNIYOSHI et al., 2003)

Nicaragua (VANEGAS, 1990)

Porto Rico (ARMSTRONG, 1994)

Trinidade e Tobago (VIGNES, 1991)

América do Norte

Estados Unidos (NAGOSHI e MEAGHER, 2004)

México (ROJAS et al., 2004)

América do Sul

Argentina (GIAVENO et al., 2004)

Bolívia (LOPEZ e REYES, 1995)

Brasil

Ceará (BLEICHER et al., 2003)

Espírito Santo (FANTON, 1990)

Mato Grosso (GOMEZ e AVILA, 2001)

Mato Grosso do Sul (FAVERO et al., 2000; FERNANDES et al., 2002)

Minas Gerais (BASTOS et al., 2003)

Paraná (IAPAR, 2001)

Pernambuco (GONZALEZ et al., 1994)

Rio Grande do Norte (SILVA et al., 2000)

Rio Grande do Sul (BUSATO et al., 2005)

São Paulo (GUERREIRO et al., 2003)

Tocantins (DIDONET et al., 2001)

Chile (VARGAS e BOBADILLA, 2003)

Colômbia (GARCIA R. et al., 2002)

Equador (EVANS e STANSLY, 1990)

Guiana Francesa (SILVAIN e REMILLET, 1993)

Venezuela (PINANGO et al., 2001)

Europa

Lituânia (OSTRAUSKAS, 2003)

Sintomas

No início do ataque à planta do milho, as lagartas raspam as folhas deixando áreas transparentes. A lagarta se desenvolve e passa a localizar-se no cartucho da planta, destruindo-o. O estágio da planta mais sensível ao ataque é quando esta

apresenta de 8 a 10 folhas. Medidas para o controle devem ser realizadas quando 17% das plantas estiverem com o sintoma de folhas raspadas (CRUZ et al., 2000).

A lagarta-dos-arrozais, também conhecida como lagarta-do-cartucho do milho ou lagarta-militar (*Spodoptera frugiperda*) existe em todos os Estados do Brasil, é polífaga e tem grande poder de destruição. No arroz irrigado, o período crítico de ataque ocorre entre a emergência das plântulas e a inundação da lavoura, quando as lagartas cortam as plantas rente ao solo, podendo destruir áreas extensas da cultura. A praga pode atacar toda a parte aérea da planta de arroz, sendo mais comum e prejudicial por reduzir a superfície foliar das plantas jovens ou mais desenvolvidas, quando há comprometimento da folha bandeira (FERREIRA e BARRIGOSI, 2004).

Expressão Econômica

Spodoptera frugiperda é considerada a principal praga da cultura do milho no Brasil. Ataca a planta desde a sua emergência até o pendoamento e espigamento. O seu ataque ocorre em todos os estádios do milho, podendo causar perdas de 34% até 39% (CRUZ et al., 2000). Nagoshi e Meagher (2004) relacionam duas raças para essa espécie, a raça do arroz e a do milho. Busato et al. (2004) e Busato et al. (2005), citam a presença das raças do arroz e milho, no estado do Rio Grande do Sul.

Em condições de laboratório, uma lagarta de *S. frugiperda*, para completar o desenvolvimento na cultivar de arroz irrigado BR Irga 409, precisou, em média, de 20,6 dias, e consumiu 156,7 cm² de folha; os três últimos ínstaes larvais foram responsáveis por mais de 90% do total de folhas consumidas. Em arroz novo, antes da irrigação, verificou-se que, em sete dias de alimentação, cada lagarta pode provocar redução de 0,9% na produção de grãos, se for originada dentro da lavoura, e 1,5%, se for migrante (FERREIRA e BARRIGOSI, 2004).

2. Definições de perfis eletroforéticos

Os 10 primers de seqüência aleatória de RAPD produziram padrões de bandejamento diferenciados entre as espécies de lepidópteras analisadas nesse trabalho (Figura 1).

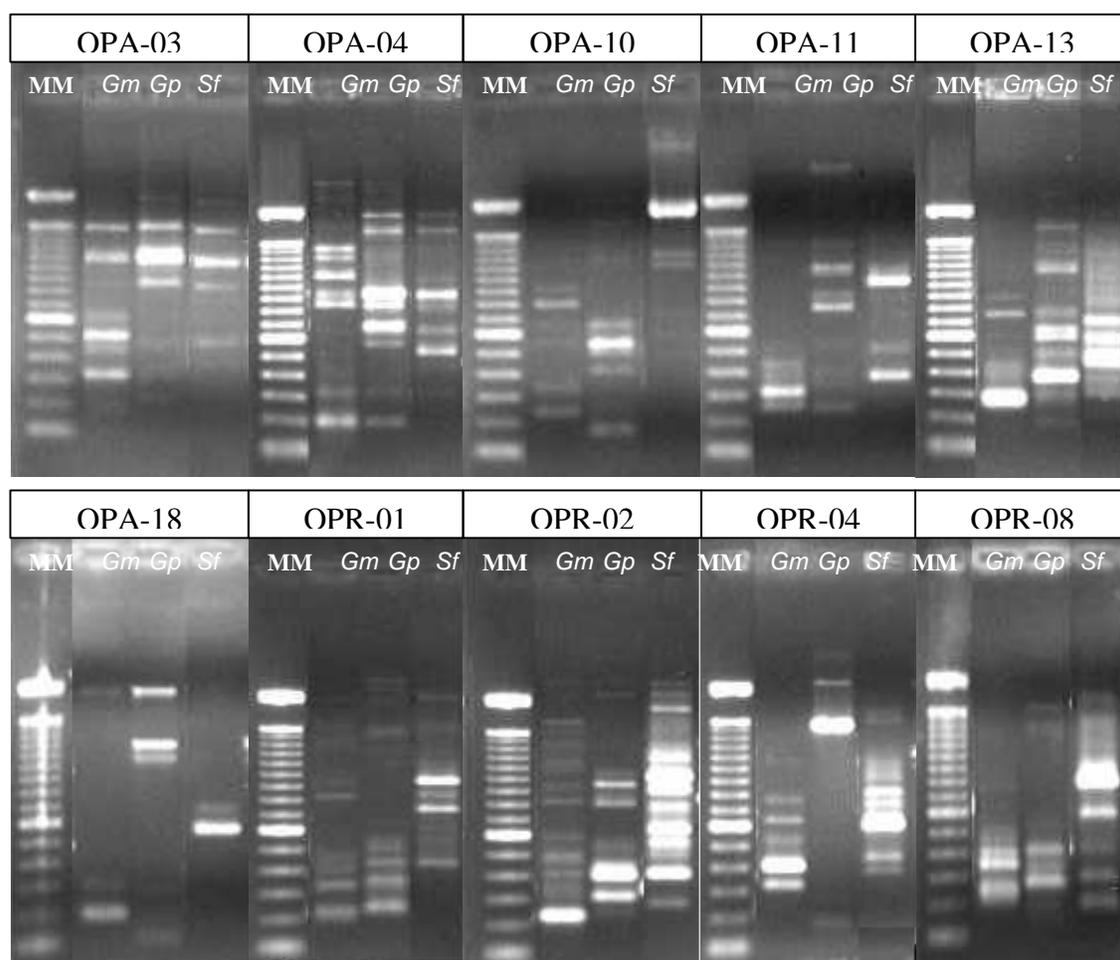


Figura 1 – Perfis de marcadores moleculares obtidos das amostras analisadas com 10 primers de RAPD. Amostras organizadas da esquerda para direita: (MM) marcador de massa molecular 100 pb ladder, (Gm) *G. molesta*, (Gp) *G. prunivora* e (Sf) *S. frugiperda*.

As três espécies de lepidópteras quando analisadas com o primer OPA-13 produziram duas bandas de massa molecular elevada, comum aos dois gêneros. Entretanto, com *G. molesta* foram produzidas duas bandas de DNA de 300 pb e 500 pb. Com *G. prunivora*, identificou-se uma banda característica de 850 pb e com *S. frugiperda*, observou-se a ausência de uma banda na faixa de 300 pb. Ao ser utilizado o primer OPA-04, obtiveram-se duas bandas de 700 pb e 1000 pb em *G. prunivora*, as

quais não apresentavam correspondência em *G. molesta*. Provavelmente, o emprego desse primer possa ser útil para a detecção de marcadores específicos para *G. prunivora*. Resultado similar foi observado com o primer OPA-10. Empregando-se o primer OPA-11 obteve-se uma banda de 300 pb detectável apenas em *G. molesta*. O resultado sugere que esse primer possa ser usado como marcador específico dessa espécie de lepidóptero. Resultado similar também foi observado com o primer OPA-18 para *G. molesta*. Os primers OPR-02 e OPR-04 geraram marcadores distintos para as espécies de lepidópteras do gênero *Grapholita* sendo que, o primer OPR-04 produziu uma banda de 400 pb em *G. molesta* e uma banda de 1500 pb em *G. prunivora*. Esse primer apresenta-se como forte candidato para uso em programas de identificação rápida dessas espécies quando detectadas em material originário de importação.

Estes resultados indicam que a técnica de RAPD pode ser usada a partir de amostras frescas ou conservada em álcool (LIMA et al., no prelo), para a identificação dos lepidópteros em questão. Uma estratégia molecular foi estabelecida para atender à necessidade de se detectar a presença de insetos exóticos nas culturas do Brasil, a partir de amostras armazenadas em álcool. Além disso, a partir dos marcadores moleculares gerados por RAPD, é possível o desenvolvimento de primers específicos para as espécies de lepidópteras. Essa estratégia foi aplicada por Agusti et al. (1999) que desenvolveram primers específicos para a detecção de *H. armigera* no intestino de possíveis predadores dessa espécie. Dessa forma, os marcadores moleculares obtidos por RAPD mostram-se úteis para o desenvolvimento de várias estratégias no estudo da dinâmica das populações de lepidópteras.

Contudo, o sucesso na obtenção de marcadores moleculares via RAPD é dependente da qualidade do DNA obtido a partir dos tecidos do inseto. A técnica de extração utilizada nesse trabalho forneceu DNA com qualidade para a análise de lepidópteros utilizando-se primers de RAPD.

CONCLUSÃO

O perfil molecular obtido por meio de RAPD-PCR nesse trabalho indica que o método poderá ser utilizado para elaboração de um perfil padrão de identificação de *G. prunivora*. Deverão ser testadas outras espécies correlatas para avaliar a eficiência da identificação molecular desta praga, caso ela venha ser interceptada ou introduzida no país, permitindo a identificação segura e ações rápidas de quarentena e a elaboração de políticas públicas para pragas quarentenárias. Para *G. molesta*, a identificação molecular torna-se importante para o monitoramento das populações presentes no Brasil, comparando-as com outras que podem ser introduzidas juntamente com a importação inadvertida de rosáceas.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Yakima Agricultural Research, ARS/USDA, estado de Washington, Estados Unidos da América.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUSTI, N.; DE VICENTE, M. C.; GABARRA, R. Development of sequence amplified characterized region (SCAR) markers of *Helicoverpa armigera*: a new polymerase chain reaction-based technique for predator gut analysis. **Molecular Ecology**, Oxford, GB, v. 8, p. 1467-1474, 1999.

ANDREEV, R.; KUTINKOVA, H. Plum pests in Middle-Southern Bulgaria and their control. **Progress in Plant Protection**, Poznan, Poland, v. 44, n. 2, p. 577-579, 2004.

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

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

ARMSTRONG, A. M. Additional new records of armyworms (*Spodoptera frugiperda* & *S. exigua*) attacking cabbage in Puerto Rico. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, Rio Piedras, PR, v. 78, n. 1-2, p. 69-70, 1994.

ATANOV, N. M. Optimizing the control of the oriental fruit moth. **Zashchita Rastenii Moskva**, n. 11, p. 32-33, 1993.

BADILLA FERNANDEZ, F. A successful biological control program of insect pests in sugar cane in Costa Rica. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia**, Turrialba, CR, n. 64, p. 77-87, 2002.

BARIC, B.; CIGLAR, I. Testing of the attract and kill technique against *Cydia pomonella* in Croatia. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v. 68, n. 4a, p. 275-276, 2003.

BASTOS, C. S.; GALVAO, J. C. C.; PICANCO, M. C.; CECON, P. R.; PEREIRA, P. R. G. Incidência de insetos filófagos e de predadores no milho e no feijão cultivados em sistema exclusivo e consorciado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 3, p. 391-397, 2003.

BENTANCOURT, C. M.; SCATONI, I. B. Lepidoptera of economic importance in Uruguay (identification and biology of agricultural and forest pests and the damage caused by them). Part I - Tortricidae. **Notas Tecnicas Facultad de Agronomia, Universidad de la Republica, Montevideo**, n. 7, p. 57, 1989.

BLEICHER, E.; OLIVEIRA, I. S. R. de; VIDAL NETO, F. das C. Controle da lagarta-do-cartucho do milho usando-se areia como veículo de inseticida. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, CE, v. 34, n. 1, p. 51-56, 2003.

BLOMEFIELD, T. L.; BARNES, B. N. Integrated control of oriental fruit moth, *Grapholita molesta*, on peaches using a spray-date prediction model. **Acta Horticulturae**, The Hague, NL, n. 525, p. 161-168, 2000.

BOGORNÍ, P. C.; VENDRAMIM, J. D. Bioactivity of aqueous extracts of *Trichilia* spp. on *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) development on maize. **Neotropical Entomology**, Londrina, PR, v. 32, n. 4, p. 665-669, 2003.

BOSTANIAN, N. J.; VINCENT, C.; PITRE, D.; SIMARD, L. G. Chemical control of key and secondary arthropod pests of Quebec apple orchards. **Applied Agricultural Research**, v. 4, n. 3, p. 179-184, 1989.

BOTTON, M.; ARIOLI, C. J.; BAVARESCO, A.; SCOZ, P. L. **Mariposa Oriental - *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae)**: sistema de produção, 3. Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pessego/PessegodeMesaRegiaoSerraGaucha/pragas.htm>>. Acesso em: 15 out. 2005. ISSN 1678-8761. Versão eletrônica.

BOTTON, M.; ARIOLI, C. J.; BAVARESCO, A.; SCOZ, P. L. Principais pragas. In: GARRIDO, L.; BOTTON, M. (Orgs.) **Sistema de produção de pêssego de mesa na região da Serra Gaúcha**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2003. (Embrapa Uva e Vinho, Sistema de Produção, 3). Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/pessego/pragas.htm>>. Acesso em: 10 out. 2005.

BOTTON, M.; SCOZ, P. L.; ARIOLI, C. J. IPM on peaches in Brazil: actual situation and future trends. **Acta Horticulturae**, The Hague, NL, n. 592, p. 655-658, 2002.

BOTTON, M.; ARIOLLI, C. J.; COLLETA, V. D. **Monitoramento da mariposa oriental *Grapholita molesta* (BUSCK, 1916) na cultura do pessegueiro**. Bento Gonçalves, RS: Embrapa Uva e Vinho, 2001. 4 p. (Embrapa Uva e Vinho. Comunicado técnico, 38).

BRENIAUX, D. Fruit trees: year 2000 plant health review. **Phytoma**, Paris, n. 536, p. 22-25, 2001.

BUSATO, G. R.; GRUTZMACHER, A. D.; GARCIA, M. S.; GIOLO, F. P.; ZOTTI, M. J.; BANDEIRA, J. de M. Exigências térmicas e estimativa do número de gerações dos biotipos "milho" e "arroz" de *Spodoptera frugiperda*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 4, p. 329-335, 2005.

BUSATO, G. R.; GRUTZMACHER, A. D.; OLIVEIRA, A. C. de; VIEIRA, E. A.; ZIMMER, P. D.; KOPP, M. M.; BANDEIRA, J. de M.; MAGALHAES, 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.

CAB INTERNATIONAL. **Crop protection compendium**. London, 1999. 1 CD- ROM.

COMMONWEALTH INSTITUTE OF ENTOMOLOGY. **Distribution maps of pests: *Cydia prunivora***. London, 1975. Não paginado. Mapa n. 341.

CBD. Alien species that threaten ecosystems, habitats or species. In: CONFERENCE OF THE PARTIES TO THE CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY, 6., 2002, The Hague, the Netherlands. **[Proceedings...]**. [S.l.: s.n], 2002. p. 54-60. UNEP/CBD/COP/6/20.

COMMONWEALTH OF AUSTRALIA (Canberra: Australia). **Stem Borers:** (Lepidoptera: Pyralidae), *Chilo partellus* (Swinhoe, 1885), *C. infurcatellus* (Snellen), *C. auricillius* (Dudgeon), *C. terrenellus* (Pagenstecher). Canberra: AQIS, 1996. Não paginado. (Plant Quarantine Leaflet, 83).

CRUZ, I.; VIANA, P. A.; WAQUIL, J. M. Pragmas: pragmas da fase vegetativa e reprodutiva. In: CRUZ, I.; VERSIANI, R. P.; FERREIRA, M. T. R. (Ed.). **Cultivo do milho**. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2000. (Embrapa Milho e Sorgo).

Sistemas de Produção, 1). Disponível em:

<<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/prvegetativa.htm>>. Acesso em: 13 out. 2005.

DICKLER, E.; THEINERT, C.; RAULEDER, H. *Cydia tenebrosana*: a new pest in plum fruits? **Bulletin OILB/SROP**, Dijon, FR, v. 27, n. 5, p. 13-17, 2004.

DIDONET, J.; DIDONET, A. P. P.; ERASMO, E. L.; SANTOS, G. R. dos. Incidência e densidade populacional de pragas e inimigos naturais em arroz de terras altas, em Gurupi-TO. **Bioscience Journal**, Uberlândia, MG, v. 17, n. 1, p. 67-76, 2001.

EPPO. Stone fruits. **Bulletin OEPP**, Oxford, v. 34, n. 3, p. 427-438, 2004.

EVANS, D. C.; STANSLY, P. A. Weekly economic injury levels for fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) infestation of corn in lowland Ecuador. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, US, v. 83, n. 6, p. 2452-2454, 1990.

FANTON, C. J. **Principais pragas das pastagens no Espírito Santo**. [Vitória]: Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária, 1990. p. 14-21. (Documentos, 73).

FAO. **Glossary of phytosanitary terms**: reference standard. Rome: FAO, 2002. (ISPM Publ., n. 5). Secretariat of the International Plant Protection Convention of the Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FAVERO, S.; CONTE, C. de O.; SILVA, M. V. da. Resistência de duas populações de *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) a deltametrina. **Ensaios e Ciência: Série Ciências Biológicas, Agrárias, e da Saúde**, Campo Grande, v. 4, n. 2, p. 71-80, 2000.

FERNANDES, M. G.; BUSOLI, A. C.; BARBOSA, J. C. Distribuição espacial de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) em algodoeiro. **Revista Brasileira de Agrocência**, Pelotas, RS, v. 8, n. 3, p. 203-211, 2002.

FERREIRA, A. J.; CARVALHO, G. A.; BOTTON, M.; MENDONÇA, L. A.; CORRÊA, A. R. B. Seletividade de inseticidas usados na cultura da macieira a ovos de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae) **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, jul./ago. 2005.

FERREIRA, E.; BARRIGOSI, J. A. F. Manejo dos principais insetos fitófagos. In: SANTOS, A. B. dos; BIAVA, M. (Ed.). **Cultivo do arroz irrigado no estado do Tocantins**. Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão, 2004. (Embrapa Arroz e Feijão. Sistema de Produção, 3). Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoTocantins/manejo_insetos_fitofagos.htm>. Acesso em: 13 out. 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

GARCIA, R. F.; MOSQUERA, E. M. T.; VARGAS, S. C. A.; ROJAS, A. L. Biological, microbiological and physical control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in corn and other crops in Colombia. **Revista Colombiana de Entomologia**, Santafe de Bogotá, v. 28, n. 1, p. 53-60, 2002.

GARIC, R.; STAMENKOVIC, S.; CANAK, M. The effect of *Cydia molesta* on the incidence of *Monilinia* spp. on quince fruits. **Bulletin OEPP**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 603-606, 1990.

GIAVENO, C. D.; PARAVANO, A. S.; CURIS, M. C.; PORTMANN, E. Breeding maize for resistance to fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in Argentina: genetic and environmental effects. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 4, n. 4, p. 434-440, 2004.

GOMEZ, S. A.; AVILA, C. J. **Controle químico da lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1792), na cultura do trigo**. Mato Grosso do Sul: Embrapa Agropecuária Oeste, 2001. (Embrapa Agropecuária Oeste. Boletim de pesquisa, 9).

GONZALEZ, P. A. de; LEMOS, M. A.; RAMALHO NETO, C. E.; REIS, O. V. dos; TABOSA, J. T.; TAVARES FILHO, J. J. Correlações genéticas, fenotípicas e ambientais em dois ciclos de seleção no milho Dentado Composto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 3, p. 419-425, 1994.

GONZALEZ, R. H.; VOLOSKY, F. C. Mealybugs and fruit moth: quarantine problems affecting fresh fruit exports. **Revista Fruticola**, Curico, CH, v. 25, n. 2, p. 41-62, 2004.

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

GUERREIRO, J. C.; BERTI FILHO, E.; BUSOLI, A. C. Ocorrência estacional de *Doru luteipes* na cultura do milho em São Paulo, Brasil. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia**, Turrialba, CR, n. 70, p. 46-49, 2003.

HALLMAN, G. J. Ionizing irradiation quarantine treatment against oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) in ambient and hypoxic atmospheres. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, US, v. 97, n. 3, p. 824-827, 2004.

HRUDOVA, E. Nontarget Lepidoptera species found in the pheromone traps for selected tortricid species in 2002 and 2003 years. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, Brno, CS, v. 53, n. 1, p. 35-44, 2005.

IAPAR. **Arroz irrigado**: práticas de cultivo. Londrina, 2001. (Instituto Agronômico do Paraná. Circular, 119).

IL'ICHEV, A. L.; FLETT, S. P. Major pest and disease problems in stone fruit production in Northern Victoria, Australia. **Bulletin OILB/SROP**, Dijon, France, v. 22, n. 11, p. 131-135, 1999.

IL'ICHEV, A. L.; WILLIAMS, D. G.; MILNER, A. D. Mating disruption barriers in pome fruit for improved control of oriental fruit moth *Grapholita molesta* Busck (Lep., Tortricidae) in stone fruit under mating disruption. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 128, n. 2, p. 126-132, 2004.

IVASCU, A.; BALAN, V.; TOMA, S.; OPREA, M.; SEVERIN, V.; MIRCEA, I.; SONICA, D.; ISAC, M. Strategy of peach breeding for resistance to diseases in Romania. **Acta Horticulturae**, The Hague, NL, n. 525, p. 489-497, 2000.

JOSE FERNANDEZ, T.; JOA, J.; CARIDAD JIMENEZ, A.; LEONIDES DANGER, E.; MELITINA ANDINO, R.; GONZALEZ, N. Biological control of *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) with *Bacillus thuringiensis* Berliner (strain LBT-24) in the province of Granma, Cuba. I. **Centro Agrícola / Universidad Central De Las Villas**, Santa Clara, CU, v. 28, n. 3, p. 5-10, 2001.

KIM, D. S.; BOO, K. S.; JEON, H. Y. Evaluation of pheromone lure of *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) and forecasting its phenological events in Suwon. **Korean Journal of Applied Entomology**, v. 43, n. 4, p. 281-289, 2004.

KOS, A. Pyrinex 25 CS - microencapsulated organophosphorous insecticide, a perfect compound in integrated control in fruit trees and grapevine. In: SLOVENIAN CONFERENCE ON PLANT PROTECTION, 6., 2003, Zrece, Slovenije. **[Proceedings...]**. [S.l: s.n.], 2003. p. 155-164.

KOVANCI, O. B.; WALGENBACH, J. F.; KENNEDY, G. G. Evaluation of extended-season mating disruption of the Oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Busck) (Lep., Tortricidae) in apples. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 128, n. 9/10, p. 664-669, 2004.

KUNIYOSHI, C. H.; RUEDA, A.; TRABANINO, R.; CAVE, R. Evaluation of the use of pheromones for the control and monitoring of *Spodoptera frugiperda* and *Helicoverpa zea* in sweetcorn. **CEIBA**, Tegucigalpa, Honduras, v. 44, n. 1, p. 61-65, 2003.

LIMA, L. H. C.; QUEIROZ, P. R.; OLIVEIRA, M. R. V. **Protocolo de extração de DNA e análise da variabilidade genética de *Helicoverpa armigera* por meio de RAPD**. Brasília, D.F. 13 p. No prelo.

LLANOS, L. V.; MARIN, M. S. Chemicophysical characteristics of preferential host of *Grapholita molesta*: buds and fruits of peach tree in Mendoza, Argentina. **Revista de la**

Facultad de Ciencias Agrarias / Universidad Nacional De Cuyo, Mendoza, AR, v. 36, n. 1, p. 29-36, 2004.

LOPEZ, O.; REYES, E. Control of *Spodoptera frugiperda* in maize under irrigated and non-irrigated cropping systems. In: MEMORIAS DE LA REUNION LATINOAMERICANA, 3.; REUNION DE LA ZONA ANDINA DE INVESTIGADORES EN MAIZ, 16., 1995, Cochabamba, Santa Cruz, Bolivia. [Proceedings...]. [S.l: s.n.], 1995. p. 1071-1081.

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

MOLINARI, F.; MAZZONI, E.; CRAVEDI, P. Control trials against *Myzus persicae* and *Cydia molesta* in organic farming. **Bulletin OILB/SROP**, Dijon, France, v. 27, n. 5, p. 109-114, 2004.

MURRELL, V. C.; LO, P. L. Control of oriental fruit moth (*Grapholita molesta*) on golden queen peaches. In: NEW ZEALAND PLANT PROTECTION CONFERENCE, 51., 1998, Hamilton, New Zealand. **Proceedings...** New Zealand: [s.n.], 1998. p. 189-194.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L. Behavior and distribution of the two fall armyworm host strains in Florida. **Florida Entomologist**, Lutz, US, v. 87, n. 4, p. 440-449, 2004.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L. Seasonal distribution of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae), host strains in agricultural and turf grass habitats. **Environmental Entomology**, Lanham, USA, v. 33, p. 8810-889, 2004. ISSN 0046-225X.

NUNEZ, S.; SCATONI, I. Current pest management status in IFP in Uruguay. **Bulletin OILB/SROP**, Dijon, France, v. 24, n. 5, p. 259-263, 2001.

OKAZAKI, K.; IZAWA, H. Control of fruit insect pests by multiple mating disruptors in apple and pear orchards. **Agrochemicals Japan**, n. 83, p. 7-11, 2003.

OMELYUTA, V. P.; CHERNISHOV, O. V. The flight dynamics of the oriental fruit moth *Grapholitha molesta* Busck. (Lepidoptera, Tortricidae) on sticky pheromone traps. **Zakhist Roslin**, n. 42, p. 52-56, 1997.

OS'KIN, A. A. The oriental peach moth in the Stavropol' region. **Zashchita i Karantin Rastenii**, n. 4, p. 30, 1996.

OSTRAUSKAS, H. Moths caught in pheromone traps for southern armyworm (*Spodoptera eridania* Cr.), fall armyworm (*S. frugiperda* Sm.), and Egyptian cotton leafworm (*S. littoralis* Bsd.) (Noctuidae, Lepidoptera) during 1999-2001 in Lithuania. **Acta Zoologica Lituanica**, v. 13, n. 4, p. 411-424, 2003.

- PAN, Y. Z.; LU, J.; JIANG, F. The occurrence of pear piercing moth and its control. **South China Fruits**, Chongqing, China, v. 31, n. 6, p. 77-78, 2002.
- PAULA, S. V.; OLIVEIRA, M. R. V.; NÁVIA, D.; PINHEIRO, F. **Lepidópteras Quarentenárias para o Brasil**: subsídios para identificação e análise de risco de pragas. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 1 CD ROM.
- PINANGO, L.; ARNAL, E.; RODRIGUEZ, B. Population fluctuation of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) on corn under three tillage systems. **Entomotropica**, v. 16, n. 3, p. 173-179, 2001.
- POLESNY, F. Arthropod pests of apricot - the specific situation in Austria. **Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Fruchteverwertung**, v. 49, n. 6, p. 241-244, 1999.
- REIS, F. W.; NORA, I.; MELZER, R. Population dynamics of *Grapholita molesta*, Busk, 1916, and its adaptation on apple in south Brazil. **Acta Horticulturae**, The Hague, NL, n. 232, p. 204-208, 1988.
- ROJAS, J. C.; VIRGEN, A.; MALO, E. A. Seasonal and nocturnal flight activity of *Spodoptera frugiperda* males (Lepidoptera: Noctuidae) monitored by pheromone traps in the coast of Chiapas, Mexico. **Florida Entomologist**, Lutz, USA, v. 87, n. 4, p. 496-503, 2004.
- SALLES, L. A. B. Mariposa-oriental, *Grapholita molesta* (Lepidoptera, Tortricidae). In: VILELA, E. F.; ZUCCHI, R. A.; CANTOR, F. (Ed.). **Histórico das introduções das pragas introduzidas no Brasil**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 42-45.
- SALLES, L. A. B. Principais pragas e seu controle. In: MEDEIROS, C. A. B.; RASEIRA, M. C. B. (Ed.). **A cultura do pessegueiro**. Brasília: Embrapa-SPI; Pelotas: Embrapa CPACT, 1998. p. 205-239.
- SCHMIDT, F. G. V.; MONNERAT, R.; BORGES, M.; CARVALHO, R. **Criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos e semioquímicos**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular técnica, 11).
- SILVA, P. S. L. e; DINIZ FILHO, E. T.; GRANJEIRO, L. C.; DUARTE, S. R. Effects of nitrogen rates and deltamethrin application on yields of green ears and grain yield of maize. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 47, n. 269, p. 75-87, 2000.
- SILVAIN, J. F.; REMILLET, M. Ecology and biology of *Noctuidonema guyanense* (Nematoda, Aphelenchoididae), an ectoparasite of *Spodoptera frugiperda* (Lep., Noctuidae), in French Guiana. **Entomophaga**, Paris, FR, v. 38, n. 4, p. 465-474, 1993.
- SMITH, I. M.; MCNAMARA, D. G.; SCOTT, P. R.; HARRIS, K. M.; BURGER, B. **Quarantine pests for Europe**: data sheets on quarantine pests for the European

Communities and for the European and Mediterranean Plant Protection Organization. Wallingford: CAB International; Paris: EPPO, 1997. 1425 p.

SMITH, J. M.; MCNAMARA, D. G.; SCOTT, P. R.; HAAIS, K. M. (Ed.). **Quarantine Pests for Europe**: Data sheets on quarantine pests for the European Communities and for the European and Mediterranean Plant Protection Organization. Wallingford: CAB International; Paris: EPPO, 1992. 1032 p.

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

SVENSSON, I. Remarkable records of Microlepidoptera in Sweden during 1993. **Entomologisk Tidskrift**, Stockholm, SE, v. 115, n. 1-2, p. 45-52, 1994.

TOMSE, S.; ZEGLINA, I.; MILEVOJ, L. Dynamics of appearing *Cydia molesta* and *Anarsia lineatella* in peach orchards in Slovenia. **Bulletin OILB/SROP**, Dijon, France, v. 27, n. 5, p. 49-53, 2004.

TOTH, M.; SZIRAKI, G.; SZOCS, G.; SARINGER, E. A pheromone inhibitor for male *Grapholitha funebrana* Tr., and its use for increasing the specificity of the lure for *G. molesta* Busck (Lepidoptera: Tortricidae). **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, NL, v. 35, n. 1, p. 65-72, 1991.

TRIMBLE, R. M.; PREE, D. J.; BARSZCZ, E. S.; CARTER, N. J. Comparison of a sprayable pheromone formulation and two hand-applied pheromone dispensers for use in the integrated control of oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, USA, v. 97, n. 2, p. 482-489, 2004.

TSCHUDI REIN, K.; BRAND, N.; KUHRT, U.; DORN, S. First record of *Hyssopus pallidus* (Askew, 1964) for Switzerland (Hymenoptera: Eulophidae). **Revue Suisse de Zoologie**, Geneve, Suíça, v. 111, n. 3, p. 671-672, 2004.

TSIPOURIDIS, C.; XATZICHARISIS, I.; THOMIDIS, T. Integrated control of the most damaging pests of peach trees in Greece. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 37, n. 4, p. 275-281, 2004.

VANEGAS, J. A. Abstracts of theses in the field of entomology at the Institute of Agricultural Science, Nicaragua. **Revista Nicaragüense de Entomología**, Leon, NI, n. 13, p. 1-12, 1990.

VARGAS, H.; BOBADILLA, D. The experimental use of tralomethrin against some Lepidopterous larvae attacking vegetable crops in northern Chile. **IDESIA**, Arica, CL, v. 21, n. 2, p. 115-124, 2003.

VIANA, P. A.; PRATES, H. T. Larval development and mortality of *Spodoptera frugiperda* fed on corn leaves treated with aqueous extract from *Azadirachta indica* leaves. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 1, p. 69-74, 2003.

VIGNES, W. G. des. Monitoring and control of fall armyworm, (*Spodoptera frugiperda*) (J.E. Smith), on corn in Trinidad. **Journal of the Agricultural Society of Trinidad and Tobago**, Port Of Spain, TT, n. 88, p. 41-46, 1991.

WALDSTEIN, D. E.; GUT, L. J. Effects of rain and sunlight on oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae) pheromone microcapsules applied to apple foliage. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, Clemson, US, v. 21, n. 2, p. 117-128, 2004.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, GB, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.