

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

Isolamento reprodutivo entre linhagens brasileiras de *Helicoverpa zea* e *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

Dayana Rosalina de Sousa

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

**Piracicaba
2016**

Dayana Rosalina de Sousa
Bacharela em Ciências Biológicas

**Isolamento reprodutivo entre linhagens brasileiras de *Helicoverpa zea* e
Helicoverpa armigera (Lepidoptera: Noctuidae)**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2016

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

Sousa, Dayana Rosalina de

Isolamento reprodutivo entre linhagens brasileiras de *Helicoverpa zea* e *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) / Dayana Rosalina de Sousa. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

66 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Híbridaçãõ 2. Especiaçãõ 3. Fitness 4. Marcadores moleculares 5. MIP I. Título

CDD 632.78
S725i

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

A minha mãe Luzia Rosalina de Sousa e minhas “mães” de criação Terezinha Rosalina Brandão, Maria Rosalina de Sousa e Gislaine Rosalina Brandão pelo amor, incentivo e apoio.

DEDICO E AGRADEÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alberto Soares Corrêa pela orientação, pelos excelentes ensinamentos, confiança, dedicação, amizade e oportunidade para realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Celso Omoto pelo papel essencial no meu mestrado, oferecendo suporte e apoio nos meus experimentos, ensinamentos e amizade.

A Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado e pelos conhecimentos adquiridos.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) pelos conhecimentos transmitidos.

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

Aos amigos e colegas do Laboratório de Ecologia Molecular de Artrópodes e Laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle (ESALQ/USP), em especial, a equipe de trabalho que me deu grande apoio e suporte para realização dos experimentos e pela grande amizade Natália Alves,

Mariana Durigan, Rogério Machado, Douglas Amado, Frederico Nanini e Ana Luiza Wock.

Aos colegas e professores dos Laboratórios: de Insetos Vetores de Fitopatógenos, Interações de Insetos e Patologia e Controle Microbiano, por disponibilizar seus equipamentos e espaço físico para a condução dos experimentos.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Ecologia Molecular de Artrópodes e Laboratório de Resistência de Artrópodes e Táticas de Controle (ESALQ/USP): Patricia Lima Soares, Laura Pantoja, Cleane Souza, Petra Ferronato, Daniela Okuma, Oderlei Bernardi, Renato Hiroshi, Antônio Rogério Nascimento, Anderson Bolzan, Daniel Bernardi, Eloisa Salmeron, Osmar Arias, Marcelo Mochetti, Mariana Colli, Fernando Semmelroth, Leonardo Libardi, Natasha Umezu, Alexandre Colli, Guilherme Andrade Picarelli, Guilherme Giordano Paranhos e Luiz Victor Perazolo pela amizade e companheirismo dentro e fora do laboratório, auxílio e suporte na condução do meu mestrado.

À toda minha família em especial minha mãe, minha irmã Daniella Rosalina de Sousa, avó, tias, tios e primas que sempre me incentivaram e me acompanharam em cada jornada da minha formação

À minha família de Piracicaba: Eimi Arikawa, Nayara Marcon por morar com vocês, pelo companheirismo, por poder dividir meus dias fora do laboratório, pelo apoio essencial e pela incrível amizade; Bianca Carbogim Soares pela incrível

amizade, por sempre estar por perto oferecendo apoio em todos os momentos, Tia Eliana Ono por me acolher como parte da família, Raphael Branco de Araujo pela gratificante amizade.

Meus amigos Mariana Durigan, Fernanda Polastre, Taciana Azevedo, Daniela Okuma, Renato Hiroshi e Natália Alves pela grande amizade e convivência.

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

A todos os funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP pela dedicação e aos serviços prestados.

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

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o êxito deste trabalho o meu sincero agradecimento.

Muito obrigada.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 <i>HELICOVERPA SPP.</i> NO BRASIL	19
2.2 MECANISMOS DE ESPECIAÇÃO PRÉ E PÓS-ZIGÓTICOS.....	21
2.3 HIBRIDAÇÃO	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 INSETOS.....	27
3.2 BIOENSAIOS DE PREFERÊNCIA.....	27
3.3 PARÂMETROS DE FERTILIDADE E DESENVOLVIMENTO.....	28
3.4 BIOENSAIOS DE TOLERÂNCIA A ESTRATÉGIAS DE CONTROLE	29
3.4.1 Tolerância a deltametrina	29
3.4.2 Tolerância a plantas geneticamente modificadas.....	29
3.5 IDENTIFICAÇÃO DAS LINHAGENS MITOCONDRIAIS E NUCLEARES	30
3.5.1 POPULAÇÕES COLETADAS EM CAMPO	30
3.5.2 Extração do DNA.....	32
3.5.3 Marcadores moleculares	33
4 RESULTADOS	35
4.1 BIOENSAIOS DE PREFERÊNCIA DE ACASALAMENTO	35
4.2 PARÂMETROS DE FERTILIDADE E DESENVOLVIMENTO.....	36
4.2.3 Dieta artificial.....	36
4.2.4 Hospedeiro algodão	41
4.4 BIOENSAIOS DE TOLERÂNCIA A ESTRATÉGIAS DE CONTROLE	44
4.4.1 Tolerância a deltametrina	44
4.2.2. Sobrevivência a plantas geneticamente modificadas	46
4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS POPULAÇÕES DE CAMPO	46
5 DISCUSSÃO	51
6 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
REFERÊNCIAS.....	59

RESUMO

Isolamento reprodutivo entre linhagens brasileiras de *Helicoverpa zea* e *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

O gênero *Helicoverpa* Hardwick, 1965 (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae) compreende insetos pragas de distribuição cosmopolita. Historicamente no Brasil, *H. zea* (Boddie) é a principal praga do gênero, no entanto, em 2013 foi reportado pela primeira vez no território brasileiro *H. armigera* (Hübner). Estudos filogenéticos, morfológicos e ecológicos têm relacionado estas duas espécies como irmãs. A possibilidade de hibridação entre *H. armigera* e *H. zea* em condições naturais desperta interesse sobre os mecanismos genéticos, reprodutivos, de desenvolvimento e comportamentais de especiação dessas espécies. Além disso, *H. armigera* e *H. zea* são pragas severas para diversos cultivos, o que torna o entendimento destes processos crucial para o desenvolvimento de estratégias de controle. Dentro deste contexto, nosso objetivo foi confirmar a viabilidade e a adaptabilidade da prole híbrida entre as linhagens brasileiras de *H. zea* e *H. armigera*. Associado a isso, nós também testamos a tolerância da linhagem híbrida a deltametrina e plantas geneticamente modificadas (*Bt*). E por último, aplicamos marcadores moleculares em indivíduos oriundos do campo para identificar a ocorrência natural de possíveis indivíduos híbridos em diferentes cultivos e regiões do território brasileiro. Nossos resultados confirmam a possibilidade de surgimento de uma prole híbrida parcialmente fértil entre as linhagens brasileiras de *H. zea* e *H. armigera*. Assim como os marcadores nucleares sugerem a presença de indivíduos híbridos putativos em condições naturais no território brasileiro. Os mecanismos pré-copulatórios de especiação parecem ser menos efetivos na manutenção do isolamento reprodutivo, visto que os testes de escolha revelaram cruzamentos interespecíficos recíprocos entre as espécies. A linhagens provenientes dos cruzamentos interespecíficos tiveram um menor intervalo de tempo entre cada geração (T) ao serem comparadas com as linhagens provenientes de cruzamentos coespecíficos. Porém a capacidade de fêmeas gerarem fêmeas e a capacidade de manter a população em crescimento (R_0 , r_m) foram menores nas linhagens híbridas em relação as linhagens coespecíficas, indicando uma tendência à extinção das populações híbridas ao longo das gerações. A prole híbrida proveniente do cruzamento interespecífico ♀ H_a x ♂ H_z não foi fértil. As proles provenientes dos cruzamentos interespecíficos tiveram índice de sobrevivência a deltametrina equivalente ao da linhagem coespecífica de *H. armigera*, já os indivíduos híbridos da geração F2 (híbrido F1 x híbrido F1) apresentaram menor sobrevivência em relação a *H. armigera*. Não houve sobrevivência das linhagens coespecíficas e interespecíficas nos testes de sobrevivência ao algodão *Bt*. A baixa viabilidade de cruzamentos interespecíficos e híbridos em laboratório e a baixa frequência de híbridos putativos no campo confirmaram isolamento reprodutivo entre *H. zea* e *H. armigera*, mesmo que parcial.

Palavras-chave: Hibridação; Especiação; *Fitness*; Marcadores moleculares; MIP

ABSTRACT

Reproductive isolation between Brazilian strains of *Helicoverpa zea* and *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae)

The genus *Helicoverpa* Hardwick, 1965 (Lepidoptera: Noctuidae: Heliethinae) includes insect pests of cosmopolitan distribution. Historically in Brazil, *H. zea* is the main pest of the genus (Boddie), however in 2013 *H. armigera* (Hübner) was first reported in Brazil). Phylogenetic, morphological and ecological traits have suggested these two species are “sibling species”. The possibility of hybridization between *H. armigera* and *H. zea* under natural conditions arouses interest in genetic, reproductive, developmental and behavioral mechanisms of speciation between these species. In addition, *H. armigera* and *H. zea* are severe pests in several crops, which makes the understanding of these processes critical to the development of control strategies. Within this context, our goal was to carry out interspecific bioassays of behavior and development to confirm the viability and fitness of hybrid offspring between Brazilian strains of *H. zea* and *H. armigera*. Furthermore, we tested the tolerance of the hybrid strains to deltamethrin and genetically modified cotton plant (*Bt*). Finally, we applied molecular markers in specimens from different regions and hosts to identify the possible occurrence of natural putative hybrid specimens in Brazil. Our results confirm the possibility of emergence of a partially fertile hybrid offspring between Brazilian strains of *H. zea* and *H. armigera*. In addition nuclear markers suggest the presence of putative hybrids in natural conditions in Brazil. Pre-copulatory speciation mechanisms are not effective in the maintenance of reproductive isolation, since the choice tests showed reciprocal interspecific crosses between species. The interspecific strains showed lower developmental time among generations (T) when compared with the conspecific strains. However, interspecific strains have lower reproductive capacity and maintaining growing population (R_0 , RM , λ), indicating an extinction trend of hybrid populations over generations. The hybrid individuals from ♀Ha x ♀Hz cross are not fertile. The hybrid individuals from interspecific crosses showed equivalent survival to deltamethrin than *H. armigera* conspecific strain, however hybrid individuals F2 (hybrid F1 x hybrid F1) showed lower survival to *H. armigera*. There were no survival of the parental and hybrid strains to *Bt* cotton. The low viability of interspecific crosses in the laboratory and the low frequency in the field confirmed reproductive isolation between *H. zea* and *H. armigera* Brazilian strains, even partial.

Keywords: Hybridization; Speciation; Fitness, Molecular markers; IPM

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae) está relacionado a grandes problemas na área agrícola em vários países. *Helicoverpa zea* (Boddie) é uma importante praga no continente Americano, e no Brasil ataca principalmente a cultura do milho (LEITE et al., 2014). Já *Helicoverpa armigera* (Hübner) antes considerada restrita a alguns países da Europa, Ásia e Austrália, passou a ser uma praga invasora nas Américas, o primeiro registro oficial de *H. armigera* no continente americano ocorreu em 2013 (SPETCH et al., 2013; CZEPACK et al., 2013). As larvas são polífitas alimentando-se da estrutura vegetativa e reprodutiva de importantes plantas cultivadas como milho, trigo, algodão, soja, tomate e várias outras espécies de cereais, leguminosas e hortícolas (FITT, 1989; ZALUCKI et al., 1994; SOUZA; REIS, 2003).

Estudos filogenéticos, morfológicos e ecológicos têm relacionado estas duas espécies como espécies-irmãs (CHO et al., 2008; POGUE, 2013; LEITE et al., 2014). Tal fato sugere que as populações de *H. zea* encontradas nas Américas possivelmente se originaram por especiação alopátrica devido a eventos evolutivos como efeito fundador de um pequeno grupo de *H. armigera* oriundo do velho mundo (BEHERE et al., 2007).

O isolamento geográfico que havia entre essas populações permitiu que houvesse uma diferenciação entre elas, tornando assim duas espécies distintas, mas estritamente relacionadas. O isolamento é a principal chave para a especiação e ele se dá por meio de acúmulo de características que direcionam mecanismos pré-zigóticos, que precedem a fecundação do zigoto impedindo que ela aconteça (FEDER, 2007; JUNG, 2013), e/ou mecanismos pós-zigóticos, que atua na inviabilidade do zigoto, infertilidade ou menor adaptabilidade da prole híbrida (ARNOLD; HODGES, 1995; COYNE; ORR, 2004; RIDLEY, 2006; SCHLUTER, 2001).

Porém com a recente aproximação geográfica dessas duas espécies e seus hábitos ecológicos comuns, aumenta a possibilidade de acasalamentos interespecíficos, já que, esses mecanismos são passíveis de falhas. Em heliotíneos existem casos reportados de hibridação (LASTER, 1972; MILLER et al., 1986; TEAL; OOSTENDORP, 1995; ZHAO et al., 2005; MING et al., 2007), inclusive entre *H. zea* e *H. armigera* em condições de laboratório (LASTER; HARDEE, 1995; LASTER; SHENG, 1995).

A hibridação é o resultado do fluxo gênico entre espécies interespecíficas podendo gerar ou não uma prole viável e fértil (MALLET, 2005). Quando a prole híbrida é fértil ocorre o surgimento de zonas de hibridação com fluxo gênico interespecífico entre os espécimes relacionados (HARRISON; ARNOLD, 1982). Hibridação pode gerar vigor híbrido na prole (heterose) e introgressões no genoma de uma espécie aumentando suas chances de adaptação em novos e perturbados ecossistemas (JIGGINS et al., 2008; BAACK; RIESEBERG, 2007; ABBOT et al., 2013).

No âmbito agrícola a detecção de híbridos pode requerer um novo arranjo nas estratégias de Manejo Integrado de Pragas (MIP). A confirmação da possibilidade de um híbrido entre *H. armigera* e *H. zea* deve ser abordada com o intuito de esclarecer questões relacionadas a rápida dispersão de *H. armigera* no Brasil, e a adaptação de possíveis híbridos em relação a hospedeiros, fertilidade, capacidade de dispersão, resistência a inseticidas e plantas geneticamente modificadas, que são de extrema relevância para o controle de pragas. Visto que, após confirmação da presença no Brasil em 2013, *H. armigera* já atingiu uma ampla distribuição em toda América do Sul e Central com recente coleta em armadilhas de feromônio na Florida, USA (LEITE et al., 2014; MASTRANGELO et al., 2014; MURÚA et al., 2014; SENAIVE, 2014; HAYDEN; BRAMBILA, 2015).

A possibilidade de hibridação entre *H. armigera* e *H. zea* em condições naturais desperta interesse sobre os mecanismos genéticos, reprodutivos, de desenvolvimento e comportamentais de especiação dessas espécies. Além disso, *H. armigera* e *H. zea* são pragas severas para diversos cultivos, o que torna o entendimento destes processos crucial para o desenvolvimento de estratégias de manejo, uma vez que a transferência de genes/loci com potencial adaptativo é uma realidade em zonas de hibridação (ARNOLD; MARTIN, 2009; ABBOT et al., 2013, FRAÏSE et al., 2014). Sendo assim nossos objetivos foram:

- Realizar em condições laboratoriais bioensaios interespecíficos de comportamento de preferência de acasalamento entre linhagens brasileiras de *H. zea* e *H. armigera*.
- Realizar bioensaios de desenvolvimento para confirmar a viabilidade e vigor da prole híbrida entre as linhagens brasileiras de *H. zea* e *H. armigera*.

- Testar a tolerância da linhagem híbrida resultante do cruzamento interespecífico recíproco entre *H. zea* e *H. armigera* a deltametrina e algodão geneticamente modificado (*Bt*).
- Aplicar marcadores moleculares em indivíduos oriundos do campo para identificar a ocorrência natural de putativos híbridos em diferentes cultivos e regiões do território brasileiro.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Helicoverpa* spp. no Brasil

As espécies do gênero *Helicoverpa* fazem parte do complexo da subfamília Heliiothinae, dentro da ordem Lepidoptera. Dentre estas, destacam-se as espécies *Helicoverpa zea* (Boddie) e *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) como importantes pragas agrícolas. Estas espécies atacam diversas culturas e causam prejuízos em diversos países (FITT, 1989; HEAD et al., 2010; WALSH et al., 2014). O manejo dessas pragas é difícil e complexo uma vez que há uma grande dificuldade de identificação em campo devido as suas semelhanças morfológicas e já foram reportados casos de resistência a diversos inseticidas (RUMMEL et al., 1986; FITT, 1989; WU et al., 2008; POGUE, 2004; ARTHROPOD PESTICIDE RESISTANCE DATABASE – APRD, 2016)

Restrita ao continente americano *H. zea* é considerada uma das principais pragas da cultura do milho, porém no Brasil há registros de *H. zea* em outros hospedeiros como milheto, algodão e tomate (DEGRANDE; OMOTO, 2013). Seu ciclo de vida no milho compreende as fases de ovo, que são depositados no estilo-estigma e eclodem após 3 dias aproximadamente. Posteriormente a lagarta migra para espiga e se desenvolve dentro de 18 dias em média passando por cinco ou seis instares larvais; nos últimos instares larvais, as lagartas migram para o solo onde ocorre a fase de pupa até a emergência do adulto, essa fase dura em média 15 dias. Os adultos sobrevivem de 5 a 15 dias, porém dependendo das condições podem sobreviver até 30 dias. *H. zea* tem hábito principalmente noturno, se alimenta de néctar, as fêmeas podem ovipositar mais de 1.000 ovos, e a oviposição começa normalmente três dias após a emergência (MANTRAGOLO et al., 1998; NAVARRO, 1987; NASERI et al., 2011; NASREEN; MUSTAFA, 2000).

Os danos causados por *H. zea* no milho ocorrem principalmente na espiga quando os grãos ainda estão leitosos, a lagarta perfura a palha e se alimenta dos grãos, além disso, elas atacam os estigmas impedindo a fertilização. Os locais perfurados facilitam a entrada de micro-organismos podendo causar outros danos a planta (CARVALHO, 1980; GALLO et al., 1988).

Já *H. armigera* é mais conhecida como uma praga que só ocorria no velho mundo e assim como *H. zea* apresenta uma gama de hospedeiros e uma alta mobilidade, além de características biológicas como alta fecundidade e um ciclo de vida curto (FITT, 1989). Ambas as espécies possuem morfologia semelhantes, tanto

na fase adulta quanto em lagartas, portanto são consideradas espécies crípticas o que dificulta a identificação no campo; a principal diferença morfológica está na genitália masculina, tornando inviável a identificação diretamente no campo (ZALUCKI et al., 1994; POGUE, 2004).

No ano de 2013, *H. armigera* foi oficialmente registrada pela primeira vez no Brasil, atacando cultivos de soja em Goiás e na Bahia, no Mato Grosso atacando o algodão (CZEPAK et al., 2013; SPECHT et al., 2013).. Em janeiro de 2014 o SENAVE (Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Vegetal y de Semillas), um órgão governamental do Paraguai confirmou o registro de *H. armigera* atacando cultivos de soja, chia, nabo forrageiro, trigo e canola. Na Argentina MURÚA et al. (2014) capturou exemplares em armadilhas com feromônio. Em outubro de 2014 a NAPPO (North American Plant Protection Organization) relatou a identificação de *H. armigera* em Porto Rico cujos indivíduos foram capturados em armadilha. Já no ano de 2015 foi relatado pela primeira vez a presença dessa praga no EUA em que um exemplar foi identificado em armadilhas de feromônio na Florida (HAYDEN; BRAMBILA, 2015; EL-LISSY, 2015).

H. armigera é uma praga que possui mais de 100 hospedeiros, sendo que grande parte destes apresentam importância econômica (FITT, 1989). No Brasil, *H. armigera* foi encontrada atacando principalmente as dicotiledôneas como feijão, algodão e soja. Entretanto, esta também foi encontrada em menor proporção em sorgo, milheto e milho (LEITE et al., 2014). Considerada uma das mais severas pragas da Ásia, Europa, África e na Austrália, *H. armigera* quando em estágio imaturo ataca folhas e caules, porém há uma forte preferência por frutos, inflorescência e vagens. Nestes países são relatados danos de mais de 2 bilhões de dólares por ano, isso sem mencionar os danos ambientais decorrentes do uso de inseticidas (TAY et al., 2013), e atualmente o mesmo vem ocorrendo no Brasil.

A entrada da praga do Velho Mundo no continente americano é preocupante, não só pelos prejuízos acarretados, já que essa praga é considerada mais voraz e mais tolerante aos inseticidas do que *H. zea*. Laster e Hardee (1995) e Laster e Sheng (1995) cruzaram as duas espécies em laboratório e essas foram capazes de produzir híbridos férteis. A presença de híbridos no campo pode ser amplificada já que as duas espécies compartilham os mesmos hospedeiros e espaço. As características desses híbridos e o seu potencial diante das nossas características agrícolas ainda são desconhecidos. Cabe aos pesquisadores reverem os conceitos

de Manejo Integrado de Pragas (MIP) e utilizar ferramentas mais modernas, como o uso de técnicas moleculares que desempenham papéis fundamentais na identificação, diversidade genética, distribuição espacial, origem de populações, raças, preferência de hospedeiros e manejo de resistência a inseticidas, principalmente das espécies introduzidas.

2.2 Mecanismos de especiação pré e pós-zigóticos

Deriva genética, efeito fundador, seleção natural, entre outros eventos são processos evolutivos para a formação de novas espécies. Quando esses eventos ocorrem e impedem o fluxo gênico entre populações, uma parte da população segrega, ou há uma seleção aleatória ao longo das gerações, e a especiação passa a ser possível. A especiação tem como seu principal promotor o isolamento reprodutivo. Quando há um fluxo gênico entre populações, o padrão genético delas será parecido, porém quando as populações se isolam reprodutivamente não há troca de material genético e os eventos que causam variações genéticas, como as mutações, continuam ocorrendo nas duas populações isoladamente (COYNE; ORR, 2004; NOSIL; FEDER, 2012). Essas diferenças que vão se acumulando possibilitam o surgimento de características genotípicas e fenotípicas que as diferenciam e aumentem cada vez mais as divergências entre essas populações garantindo que elas evoluam de forma independente uma da outra, tornando os cruzamentos entre elas mais raros, até cessarem (MALLETT, 2008; COYNE; ORR, 1989; COYNE; ORR, 2004).

O isolamento reprodutivo pode estar relacionado a preferência por uma planta hospedeira, comportamento para o início de uma cópula, barreiras geográficas, diferenças temporais e padrões fisiológicos, que irão impedir a cópula e conseqüente haverá a formação de novas espécies (COYNE; ORR, 1989; FATOUROS et al., 2006; KOROL et al., 2000; RIDLEY, 2006; XUE et al., 2009). Para que ocorra o isolamento reprodutivo são necessários mecanismos que irão impedir a cópula entre espécies ou populações distintas. Esses mecanismos ocorrem em uma fase pré-zigótica e/ou pós-zigótica. São processos que envolvem diferenças morfológicas, comportamentais ou fisiológicas.

Coyner e Orr (2004) definem o isolamento pré-zigótico como sendo um mecanismo que impede o fluxo de genes, antes do gameta masculino fecundar o gameta feminino. Esse isolamento pode acontecer antes da cópula ou até mesmo

após, impedindo a fecundação. Esses mecanismos podem dar-se por barreiras sexuais ou comportamentais um exemplo comum seria o uso de feromônios específicos para atrair um companheiro; barreiras por habitat, quando espécies tem nichos distintos e são separadas por uma barreira espacial, esse isolamento pode ser causado por adaptação preferencial de um hospedeiro, competição, entre outros fatores; barreira temporal que impede o fluxo gênico entre espécies em simpatria por eles se reproduzirem em tempos diferentes; barreiras mecânicas que impedem a cópula, por apresentarem diferentes estruturas (COYNER; ORR 2004).

Para exemplificar esses comportamentos podemos citar o caso de duas espécies de formigas simpátricas, *Mycocepurus goeldii* (Forel) (Hymenoptera: Formicidae) e *Mycocepurus castrator* (Habeling e Bacci) (Hymenoptera: Formicidae). Estas espécies coabitam o mesmo ninho e um estudo evidencia que *M. goeldii* evoluiu recentemente de *M. castrator*, e estudos morfológicos e comportamentais indicam que essas duas espécies são isoladas reprodutivamente, pois há diferenças no tamanho do corpo e na morfologia da genitália do macho, além disso existe uma preferência relacionada ao local de acasalamento, onde *M. goeldii* realiza voos nupciais para copular e *M. castrator* tem preferência por copular em vegetações baixas (RABELING et al., 2014)

Um outro exemplo de características que impedem a troca de gametas pode ser observado em plantas, onde um dos principais mecanismos de isolamento discutido, é o período de floração servindo como barreira. Savolainen et al., 2006 fez um estudo com duas espécies que evoluíram em simpatria, *Howea forsteriana* (Beccari) (Arecaceae) e *Howea belmoreana* (Beccari) (Arecaceae). A divergência entre essas espécies se deu após aparecer um novo tipo de solo que apresenta um pH diferente do já existente e conseqüentemente um novo nicho ecológico. Mesmo apresentando tais diferenças, há locais onde ambas as espécies estão presentes e o que mantém o isolamento entre elas são algumas diferenças morfológicas e o período de floração, onde o pico de floração de *H. forsteriana* ocorre cerca de seis semanas antes que *H. belmoreana*.

Quando ocorre cópula interespecífica e nenhuma barreira é capaz de impedir a fertilização, a atuação de mecanismos pós-zigóticos são necessários. Inviabilidade de ovos, mortalidade de formas jovens, menor adaptação dos híbridos (fitness) e esterilidade são processos que promovem o isolamento. Muitos casos referentes a

inviabilidade de ovos são relatados por pesquisadores (PRESGRAVES, 2002; ZHAO et al., 2005b).

Hibridização é um assunto de suma importância para a comunidade científica e nesse atual trabalho, devido suas implicações no sistema ecológico e agrícola. Esse tema será abordado em um tópico separadamente, finalizando os principais mecanismos que envolve especiação e suas ferramentas de isolamento reprodutivo.

2.3 Hibridação

Hibridação surge a partir de cruzamentos interespecíficos, isto ocorre quando há uma falha ou ausência de isolamento pré-zigótico. Híbridos são comuns na natureza, especialmente no caso das plantas, e de indivíduos em que a fertilização é externa, como os peixes, mas isso não quer dizer que seja uma vantagem. O isolamento reprodutivo pós-zigótico pode potencialmente estar relacionado a fatores genéticos, que irão causar esterilidade da progênie e apresentar desempenhos mais baixos em relação a seus pais (FATOUROS, 2006; GROTT et al., 2008; SANCHEZ; DUBENDORFER, 1983; TURELLI et al., 2001).

A esterilidade híbrida é muito comum e bem conhecida em alguns grupos de plantas e animais, um exemplo clássico é entre o cruzamento *Equus asinus* e *Equus caballus* (Linnaeus) (Perissodactyla: Equidae) gerando a mula (*Equus asinus* x *Equus caballus*) (Perissodactyla: Equidae), que é estéril (ZHAO et al., 2005a). Em *Drosophila* a maioria dos cruzamentos interespecíficos geram machos estéreis e fêmeas férteis, ao retrocuzar fêmeas F1 com machos parentais, a prole de machos F1 desse cruzamento também é estéril (várias referências). Esse tipo de esterilidade masculina também ocorre ao cruzar fêmea *Heliiothis subflexa* (Guenée) (Lepidoptera: Noctuidae) e macho de *Heliiothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) (ZHAO et al., 2005b).

Liriomyza sativae e *L. trifolii* são duas pragas minadoras que danificam uma variedade de culturas principalmente nos Estados Unidos ao cruzar as duas espécies em laboratório entre fêmeas de *L. sativae* e macho de *L. trifolii* obteve-se ovos, porém estes não eclodiram e o cruzamento contrário gerou indivíduos híbridos, porém só do sexo feminino. Ao retrocuzar a prole híbrida com seus respectivos parentais as fêmeas não ovipositaram (TOKUMARU; ABE, 2005). Em gafanhotos do gênero *Chorthippus* GOTTSBERGER; MAYER (2007) cruzaram as duas espécies que vivem em simpatria (*C. biguttulus* x *C. brunneus*). Os machos dessas

espécies atraem suas parceiras pelo som que eles emitem, e em laboratório foi feito o cruzamento interespecífico e os híbridos foram testados para saber seu potencial de atração. Híbridos tiveram sonorização intermediária comparada aos seus parentais, tornando-os pouco atraentes para fêmeas de ambas espécies, assim, eles são considerados comportamentalmente estéreis.

Prole híbrida pode muitas vezes sofrer desvantagens quando comparadas aos seus pais, como nos casos mencionados acima. Porém nem sempre essa é a realidade, existe uma característica conhecida como heterose ou vigor híbrido que é um fenômeno onde a aptidão (viabilidade e taxa de desenvolvimento) do híbrido é melhorada em contraste aos seus parentais, essa característica foi proposta pela primeira vez por Shull em 1914. Portanto mesmo os híbridos sendo resultado de cruzamento entre espécies que carregam carga genotípica e fenotípica diferentes, atualmente o conceito de híbrido não é mais dado somente para aqueles indivíduos que por incompatibilidade gênica são estéreis, hoje já se tem muitos casos em que os híbridos têm boa adaptação e conseguem tornarem-se isolados reprodutivamente e assim formar uma nova espécie.

Existem estudos, como o de Mathenge et al., 2010 feito com *Dactylopius tomentosus* (Hemiptera: Dactylopiidae) que é uma espécie constituída por dois biótipos que controlam diferentes plantas daninhas que vivem em simpatria. Um biótipo controla *Cylindropuntia fulgida* e o outro *C. imbricata*, que são espécies de cactos. Ao serem liberadas para o controle desses dois cactos as espécies vão coexistir, podendo assim ocorrer a hibridação. Portanto MATHENGE et al., 2010 cruzou os dois biótipos em laboratório para avaliar o desempenho dos híbridos e saber se teria algum impacto com a liberação. Os testes indicaram um vigor híbrido para ambos hospedeiros, indicando que o controle das ervas daninhas não será prejudicado.

Atualmente a hibridização tem se tornado uma ferramenta para diversas finalidades como o melhoramento genético no meio agrônomo, principalmente quando se trata de culturas geneticamente modificadas, insetos para declínio da população através da esterilidade ou insetos para o controle biológico, portanto estudos como o de MATHENGE et al., 2010 são de grande relevância.

Outros trabalhos mostram casos de hibridização entre espécies de importância agrícola, comparando ciclo de vida, potencial reprodutivo e diferenças fisiológicas (GADENNE et al., 1997; FU et al., 2005; TABATA; ISHIKAWA, 2005).

Esses trabalhos são de suma importância para entender quais os problemas e as vantagens da hibridização para o sistema agrícola, onde temos um diversificado cenário com a introdução de insetos para controle biológico, invasão de pragas e plantas exóticas. *H. armigera*, por exemplo, atualmente está amplamente distribuída no Brasil, o que não ocorria até poucos anos atrás, sabemos também do histórico de hibridação dessa praga com espécies próximas (LASTER; HARDEE, 1995; LASTER; SHENG, 1995) o que nos leva a questionar o atual cenário brasileiro em relação a *H. zea* e *H. armigera*, onde temos plantações de diversas culturas em quase toda a extensão territorial. Nestes plantios há intercalação de safra e safrinha sem períodos de vazio sanitário, oferecendo condições propícias para o aumento na quantidade de gerações dessas pragas e o encontro das duas espécies no campo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Insetos

Os indivíduos de *H. armigera* utilizados nos bioensaios laboratoriais foram coletados na fase jovem provenientes de duas coletas independentes realizadas em cultivos de soja em Luiz Eduardo Magalhães – BA em 2013 e 2014. Os indivíduos de *H. zea* foram coletados na fase jovem em cultivos de milho também proveniente de duas coletas independentes nas cidades de Piracicaba – SP e Engenheiro Coelho – SP em 2014. As fases jovens foram mantidas em dieta artificial (GREENE et al., 1976) até a fase de pupa. Após emergência dos adultos, estes eram adicionados em gaiolas cilíndricas de PVC (40 cm de diâmetro x 40 cm de altura) revestidas internamente com papel e fechadas na parte superior com tecido tipo tule. O alimento fornecido aos adultos foi uma solução aquosa de mel a 10%. Os ovos coletados na superfície do papel e tule foram acondicionados em potes plásticos contendo papel filtro umedecido com água destilada. Após a eclosão, as lagartas foram inoculadas em dieta artificial e retornaram à criação de manutenção. As fases jovens e adultas foram mantidas em sala de criação a temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $60\pm 10\%$ e fotofase de 14 horas, assim como todos os bioensaios laboratoriais aqui realizados.

3.2 Bioensaios de preferência

Pupas de ambas as espécies foram separadas por sexo seguindo metodologia de BUTT; CANTU (1962) e isoladas individualmente. Adultos com menos de 24 horas de eclosão foram utilizados nos bioensaios. Um único indivíduo fêmea ou macho de cada espécie foi combinado com dois indivíduos do sexo oposto, um de cada espécie (*H. armigera* e *H. zea*), em gaiolas de PVC descritas acima. Indivíduos do mesmo sexo presentes na mesma gaiola foram marcados com tinta inodora para identificação dos indivíduos durante o processo de acasalamento. As gaiolas foram alocadas em uma sala com o fotoperíodo invertido, sendo a escotofase / fotofase de 12h. Observações periódicas a cada 30 min foram realizadas no período de escotofase por um período de sete dias utilizando lanterna com luz vermelha. Foram realizadas 30 repetições para cada tratamento [$\text{♀ } H. armigera + (\text{♂ } H. armigera \text{ e } \text{♂ } H. zea)$; $\text{♀ } H. zea + (\text{♂ } H. armigera \text{ e } \text{♂ } H. zea)$; $\text{♂ } H. armigera + (\text{♀ } H. armigera \text{ e } \text{♀ } H. zea)$; $\text{♂ } H. zea + (\text{♀ } H. armigera \text{ e } \text{♀ } H. zea)$]. Os

dados binomiais de preferência de cópula foram submetidos a análise de regressão com distribuição binomial usando a função logit link (SAS Institute 2002).

3.3 Parâmetros de Fertilidade e Desenvolvimento

Pupas de ambas as espécies foram separadas por sexo seguindo metodologia de BUTT; CANTU (1962) e isoladas individualmente. Adultos com menos de 24 horas de eclosão foram utilizados nos bioensaios. Foram realizados quatro tratamentos: (a) ♀ *H. armigera* x ♂ *H. armigera* [Ha x Ha], (b) ♀ *H. zea* x ♂ *H. zea* [Hz x Hz], (c) ♀ *H. zea* x ♂ *H. armigera* [Hz x Ha] e (d) ♀ *H. armigera* x ♂ *H. zea* [Ha x Hz]. Para os cruzamentos coespecíficos foram utilizados 25 casais, para os acasalamentos interespecíficos 50 casais. Sendo que cada repetição foi feita com cinco casais mantidos nas mesmas condições descritas no Item 3.1. A tabela de vida foi realizada em dois substratos distintos para a fase jovem, dieta artificial (GREENE et al., 1976) e algodão (variedade FM993).

As variáveis avaliadas foram: tempo de pré-oviposição e oviposição, longevidade e fertilidade da fêmea, viabilidade do ovo, larva e pupa e tempo de desenvolvimento de ovo à adulto. Também foi avaliado massa corpórea de larvas (12 dias) e pupa (24h). Pelo menos uma postura de cada casal foi utilizada para determinar o período embrionário, os ovos foram colocados em placas de petri com um papel filtro umedecido, e fechada na parte superior com película de plástico. Ovos foram contadas diariamente assim como o número de ovos eclodidos.

Com as variáveis acima foram estimados os parâmetros tempo médio entre gerações (T), a taxa líquida de reprodução (R_0), e taxa de crescimento intrínseca (r_m). Os parâmetros e seus respectivos erros padrão foram estimados por meio de programa de computador "Lifetable.sas" (MAIA et al., 2000) (SAS Institute, 2000). Os dados de cada parâmetro biológico foram testados em relação à homogeneidade das variâncias de erro. Nenhuma transformação de dados foi realizada. Como um método de discernir os diferentes tratamentos, as médias de cada parâmetro biológico foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$) em SAS® (PROC: ANOVA) (SAS INSTITUTE, 2000).

3.4 Bioensaios de tolerância a estratégias de controle

3.4.1 Tolerância a deltametrina

Bioensaios de curva concentração-resposta preliminares foram realizadas com indivíduos de *H. zea* e *H. armigera* com o objetivo de estimar uma dose discriminatória para os experimentos subsequentes. Para realização da curva concentração-resposta foram utilizadas de seis a oito concentrações do inseticida deltamethrin (Produto técnico, AgrEvo) (98,5%) e o controle com quatro repetições de 12 larvas de terceiro instar. A avaliação foi feita 48 horas após a infestação, até o momento da avaliação as placas foram mantidas em câmaras climatizadas com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotofase de 14h. As lagartas eram consideradas mortas, quando ao serem tocadas por uma pinça nos últimos segmentos abdominais, os indivíduos não tinham movimentos aparentes. Os dados foram submetidos a análise de Probit (SAS INSTITUTE, 2002) para determinação da susceptibilidade.

Posteriormente a prole oriunda dos cruzamentos coespecíficos, dos cruzamentos interespecíficos e dos cruzamentos entre híbridos foram submetidos a concentração de 10000 ppm (correspondente a CL_{50} de *H. armigera*), dose definida como discriminatória entre as duas espécies. Assim um total de cinco tratamentos foram realizados com as respectivas proles dos cruzamentos: (a) ♀ *H. armigera* x ♂ *H. armigera* [Ha x Ha], (b) ♀ *H. zea* x ♂ *H. zea* [Hz x Hz], (c) ♀ *H. zea* x ♂ *H. armigera* [Hz x Ha], (d) ♀ *H. armigera* x ♂ *H. zea* [Ha x Hz], (e) híbrido F1 x híbrido F1 oriundos do cruzamento ♀Hz x ♂Ha [Hza x Hza] com o número de repetições variando entre dois e seis por tratamento, sendo cada repetição contendo 12 larvas de terceiro instar seguindo a metodologia dos bioensaios de dose-resposta.

3.4.2 Tolerância a plantas geneticamente modificadas

Foram realizados bioensaios de sobrevivência em algodão convencional e geneticamente modificado (Bt) utilizando as larvas dos cinco tratamentos descritos acima (3.4.1). Para isso foram utilizados dois diferentes substratos: algodão convencional (FM993) e algodão *Bt* evento MON15985 (Bollgard II). Os experimentos foram realizados em placas contendo ágar microbiológico, papel filtro e o substrato. Foram feitas três repetições com 12 lagartas de primeiro instar para cada hospedeiro. A variável avaliada foi o número de sobreviventes até a fase de pupa.

3.5 Identificação das linhagens mitocondriais e nucleares

3.5.1 Populações coletadas em campo

Para a identificação de populações coletadas em campo, foram utilizadas 59 populações, provenientes de quatro culturas: soja, algodão, milho e milho, em diferentes localidades dos estados da Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, São Paulo e Rio Grande do Sul. No total foram identificados 433 indivíduos.

Tabela 1 – Populações de campo coletadas em soja, algodão, milho e milho de 2012-2015

(continua)				
Código	Local de coleta	Cultura	N	Data de coleta
Ba19	Riachão das Neves - BA	Soja	4	10/2012
Ba23	Riachão das Neves - BA	Soja	3	11/2012
Ba20	Luís E. Magalhães - BA	Soja	5	10/2012
MT6	Rondonópolis - MT	Soja	10	08/2012
MT7	Rondonópolis - MT	Soja	3	01/2013
MS2	Chapadão do Sul - MS	Soja	7	11/2012
Ma4	Balsa - MA	Soja	9	06/2013
Ba25	São Desidério - BA	Soja	10	01/2013
LRV1	Lucas de Rio Verde - MT	Soja	8	10/2014
PL1	Primavera do Leste - MT	Soja	12	10/2014
Ba55	Roda Velha - BA	Soja	3	12/2014
GO2	Mineiros - GO	Soja	9	03/2014
RS2	Itaará - RS	Soja	11	10/2014
Ba34	Anel da Soja - BA	Soja	8	01/2014
LM1	Luís E. Magalhães - BA	Soja	5	01/2015
VI1	Viradouro - SP	Soja	6	12/2015
Subtotal			113	
Ma1	Maranhão	Algodão	10	06/2012
Ba4	Luís E. Magalhães - BA	Algodão	4	05/2012
Ba5	Luís E. Magalhães - BA	Algodão	2	10/2012
Ba12	Luís E. Magalhães - BA	Algodão	6	12/2012
CE1	Limoeiro do Norte - CE	Algodão	4	08/2012

Tabela 1 – Populações de campo coletadas em soja, algodão, milho e milho de
2012-2015 (continuação)

Código	Local de coleta	Cultura	N	Data de coleta
Bg1	São Desidério - BA	Algodão	9	2013
Ba44	Luís E. Magalhães - BA	Algodão	11	02/2014
Ba45	Roda Velha - BA	Algodão	4	02/2014
CO1	Correntina - BA	Algodão	10	03/2015
Subtotal			82	
Ba9	Luís E. Magalhães - BA	Milheto	6	10/2012
Ba11	Luís E. Magalhães - BA	Milheto	3	12/2012
Subtotal			9	
Ba18	Luís E. Magalhães - BA	Milho	12	09/2012
SP1	Itapira - SP	Milho	7	12/2012
SP2	Assis - SP	Milho	7	06/2012
MS1	São Gabriel do Oeste - MS	Milho	10	06/2012
MT1	Rondonópolis - MT	Milho	7	01/2012
MG1	Capitólio - MG	Milho	15	08/2012
Ba10	Luís E. Magalhães - BA	Milho	2	12/2012
Ba27	Barreiras – BA	Milho	7	02/2013
SP5	Candido Mota – SP	Milho	5	01/2013
SP6	Jardinópolis - SP	Milho	7	04/2013
Ba28	Luís E. Magalhães – BA	Milho	6	03/2013
Ba32	Luís E. Magalhães – BA	Milho	3	06/2013
PR1	Rolândia – PR	Milho	8	01/2013
RS1	Passou Fundo – RS	Milho	10	01/2013
GO1	Montividiu – GO	Milho	10	05/2012
PR3	Londrina – PR	Milho	12	01/2014
SP12	Jaboticabal – SP	Milho	4	01/2014
SP13	Candido Mota – SP	Milho	11	03/2014
SP14	Casa Branca – SP	Milho	3	05/2014
MG3	Uberlândia – MG	Milho	12	03/2014
MG4	Capitólio – MG	Milho	12	02/2014
Ba49	Correntina – BA	Milho	11	04/2014
PR4	Castro – PR	Milho	3	05/2014
Ba53	Roda Velha – BA	Milho	8	12/2014

Tabela 1 – Populações de campo coletadas em soja, algodão, milho e milho de 2012-2015 (continuação)

PA1	Palotina – PR	Milho	7	02/2015
JA2	Jaboticabal – SP	Milho	7	02/2015
PG1	Ponta Grossa – PR	Milho	6	07/2015
JA1	Jaboticabal – SP	Milho	9	02/2015
RV1	Rio Verde – GO	Milho	6	02/2015
Subtotal			113	
Total			433	

3.5.2 Extração do DNA

O DNA genômico total foi extraído a partir de tecido torácico de adultos ou de lagartas, utilizando o protocolo de CORRÊA et al. (2014) modificado. As amostras foram alocadas em tubos de 1,5mL. Em cada amostra foi adicionado 700 µL de CTAB (100 mM de Tris HCl; 1,4M de NaCl; 0,02M de EDTA ph 8,0; 2% CTAB); 2 µL de β-mercaptoetanol e 10 µL de proteinase K (20mg/mL), após foi feita a maceração da amostra e os tubos foram incubados em banho-maria (65°C) por 1 hora. Centrifugou-se durante 10min a 14.000 rpm para formação do sobrenadante, que foi removido e colocado em um novo tubo (1,5mL), com 600 µL de CIA (Clorofórmio – álcool isoamílico 24:1) e 200 µL de CTAB, os tubos foram agitados no vórtex e centrifugados a 14.000 rpm por 10min. A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo tubo (1,5mL), e adicionado 600 µL de CIA, agitado no vórtex e centrifugado a 14.000 rpm por 10min; novamente o sobrenadante foi transferido para um novo tubo (1,5mL) e adicionado o isopropanol gelado (-20°C) (2/3 do volume = 260 µL – 400 µL), os tubos foram calmamente agitados e levados ao freezer (-20°C) por 1 hora ou overnight. Na etapa seguinte foram centrifugados a 12.000 rpm por 15min, o sobrenadante foi removido, mantendo o pellet que foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 70% e 95% respectivamente. Os tubos foram colocados para secar durante 3 horas ou overnight. Para ressuspender o pellet foi usado 100 µL de água MilliQ e 1 µL de RNase (20 mg/mL – pura), os tubos eram colocados em banho-maria a 37°C por 1 hora. A concentração de DNA de cada amostra foi estimada por meio de eletroforese em géis de agarose 1,5% (p/v) corados com SYBR Safe (Life Technologies) e por comparação com padrões de concentrações conhecidas (Lambda DNA). A partir dessas concentrações estimadas, foi feita a

diluição das amostras em água ultrapura, padronizando-se as concentrações das amostras em 10 ng/μL de DNA.

3.5.3 Marcadores moleculares

Dois marcadores baseados no genoma mitocondrial e nuclear foram utilizados para identificação molecular das espécies. O primeiro marcador baseado no gene mitocondrial Citocromo c Oxidase subunidade I (COI) (BEHERE et al., 2008) foi utilizado para confirmação da herança materna das populações. A metodologia consiste na amplificação de um fragmento do gene COI com posterior corte com uma enzima de restrição específica a um sítio de mutação que diferencia fielmente as espécies em questão. A enzima identifica uma mutação específica no fragmento do gene amplificado de *H. armigera* promovendo a fragmentação do gene em dois fragmentos de 318 e 193pb. Já para *H. zea* essa enzima não é capaz de cortar o fragmento, mantendo o mesmo no tamanho original de 511pb.

A amplificação via PCR de um fragmento de tamanho de 511 pb do gene COI foi realizada em volume total de 10 μL, contendo 1 μL de DNA (50ng/ μL); 3,4 μL de água ultra pura; 1 μL de tampão (10X); 1,5 μl MgCl₂ (25 mM); 1 μl de dNTP (2,5mM); 1 μl de cada iniciador (5 pmols) e 0,15 μL de Taq (5U/ μL). Os primers utilizados foram COI-F02 (5' - CTCAAATTAATTACTCCCCATC - 3') e COI-R02 (5' - GGAGGTAAGTTTTGGTATCATT - 3'). O programa de PCR consistiu de um passo de desnaturação inicial a 97°C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94 ° C durante 30 s, emparelhamento a 47°C durante 30 s, e a polimerização a 72 °C durante 1,5 min, com um passo de extensão final a 72°C durante 10 min. Após observação da amplificação positiva, foi feita a reação com a enzima de restrição sendo utilizados 4 μL da reação de PCR, 5 μL de água ultra pura, 1,5 μL de 10X Buffer (CutSmart Buffer da Uniscience) e 0,5 μL da enzima de restrição BstZ17I, essa reação foi incubada em banho-maria a 37°C por 1 hora, e para a visualização do corte da enzima foi feito um gel de agarose 1,5% (p/v).

O segundo marcador foi baseado no gene nuclear ribossomal ITS1 (rRNA) utilizando primers espécie específicos descritos por Perera et al. (2015) que permite a identificação das espécies por amplificação de fragmentos de diferentes tamanhos. Os fragmentos amplificados de *H. armigera* apresenta 147pb e de *H. zea* 334pb (PERERA et al., 2015). Os iniciadores utilizados foram: o iniciador “forward” comum para ambas espécies ITS1-F (5' – GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCC - 3'),

ITS1Ha-R específico para *H. armigera* (5' – CGTTCGACTCTGTGTCCTCTAGTGG - 3') e TS1Hz-R específico para *H. zea* (5' – TTGATTGTTAACGAACGCGCCG - 3') (PERERA et al., 2015). As condições de amplificação foram feitas utilizando 1 µL de DNA genômico (10ng); 4,65 µL de água ultra pura; 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM); 0,25 µL de dNTPs (10 mM); 0,75 µL de cada iniciador (5 pmols); 1 µL de Tampão (10x); 0,1 µL de Taq DNA polimerase (5U/ µL) num volume final de 10 uL. O programa de PCR consistiu de um passo de desnaturação inicial a 95°C durante 3 min, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95 ° C durante 30 s, emparelhamento a 55°C durante 30 s, e a polimerização a 72 ° C durante 2 min, com um passo de extensão final a 72°C durante 10 min. Este marcador, nos permite sugerir a presença de híbridos, quando o mesmo indivíduo apresenta bandas características de *H. zea* e *H. armigera*.

4 RESULTADOS

4.1 Bioensaios de Preferência de Acasalamento

Machos de *H. zea* não demonstrou preferência significativa por nenhuma das duas espécies (Figura 1A) (likelihood ratio, $X^2 = 1.65$, g.l. = 1, $p > 0.05$). Já machos de *H. armigera* preferem fêmeas de *H. armigera* 75% em relação as fêmeas de *H. zea* 25% (likelihood ratio, $X^2 = 4.18$, g.l. = 1, $p < 0.05$) (Figura 1B). Fêmeas de *H. zea* que tiveram um sucesso de acasalamento de 60% com macho da própria espécie e 40% com *H. armigera*, no entanto as diferenças não são significativas (likelihood ratio, $X^2 = 0,40$, g.l. = 1, $p < 0.05$) (Figura 1C). Resultado similar para fêmeas de *H. armigera* tiveram 67% de acasalamento com machos da mesma espécie e 33% de acasalamento com machos interespecífico, porém não houve uma diferença significativa entre os acasalamentos (likelihood ratio, $X^2 = 1.35$, g.l. = 1, $p < 0.05$) (Figura 1D).

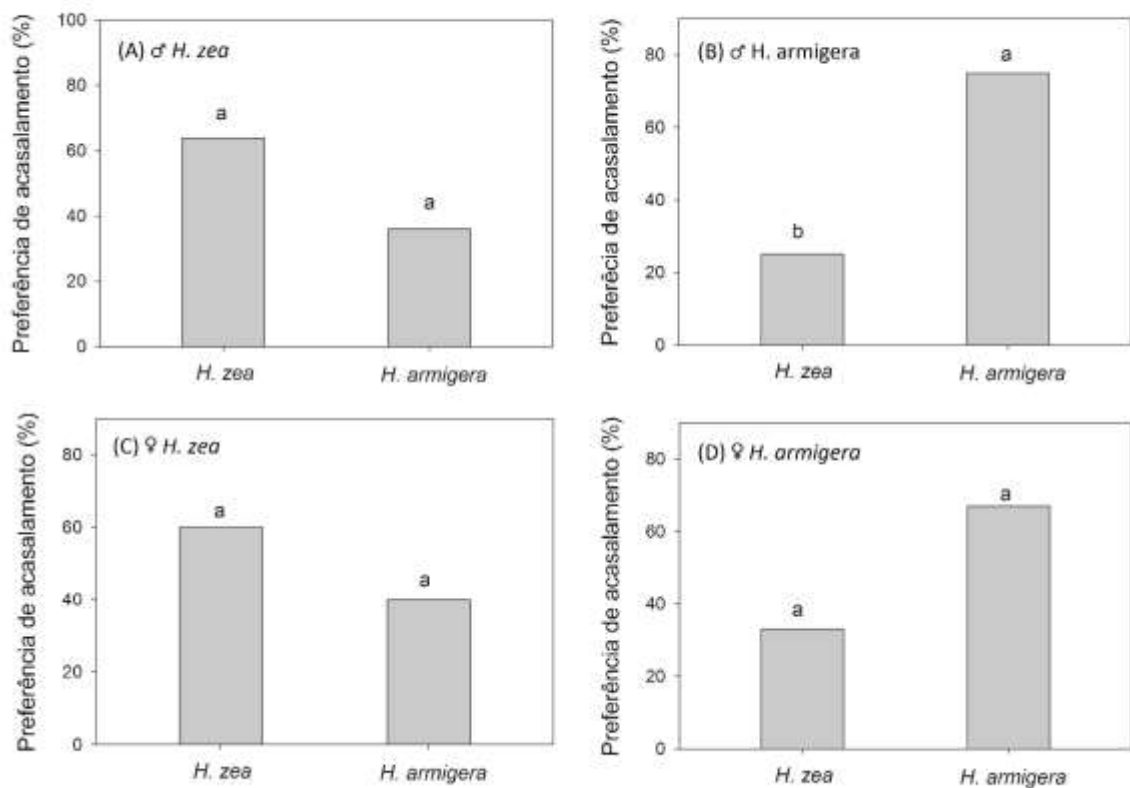


Figura 1 - Teste de escolha de acasalamento interespecífico entre *H. armigera* e *H. zea*

4.2 Parâmetros de fertilidade e desenvolvimento

4.2.1 Fertilidade

A viabilidade de ovos entre os tratamentos variou entre $47 \pm 13,55\%$ e 0% . Não existe diferença significativa entre os cruzamentos coespecíficos [*Ha x Ha*], [*Hx x Hz*] e o cruzamento entre híbridos [*Hza x Hza*]. O cruzamento entre híbridos [*Hza x Hza*] teve diferença significativa quando comparada ao cruzamento interespecífico [*Ha x Hz*]. Já o cruzamento entre híbridos [*Haz x Haz*] foi completamente infértil não apresentando ovos viáveis (Figura 2).

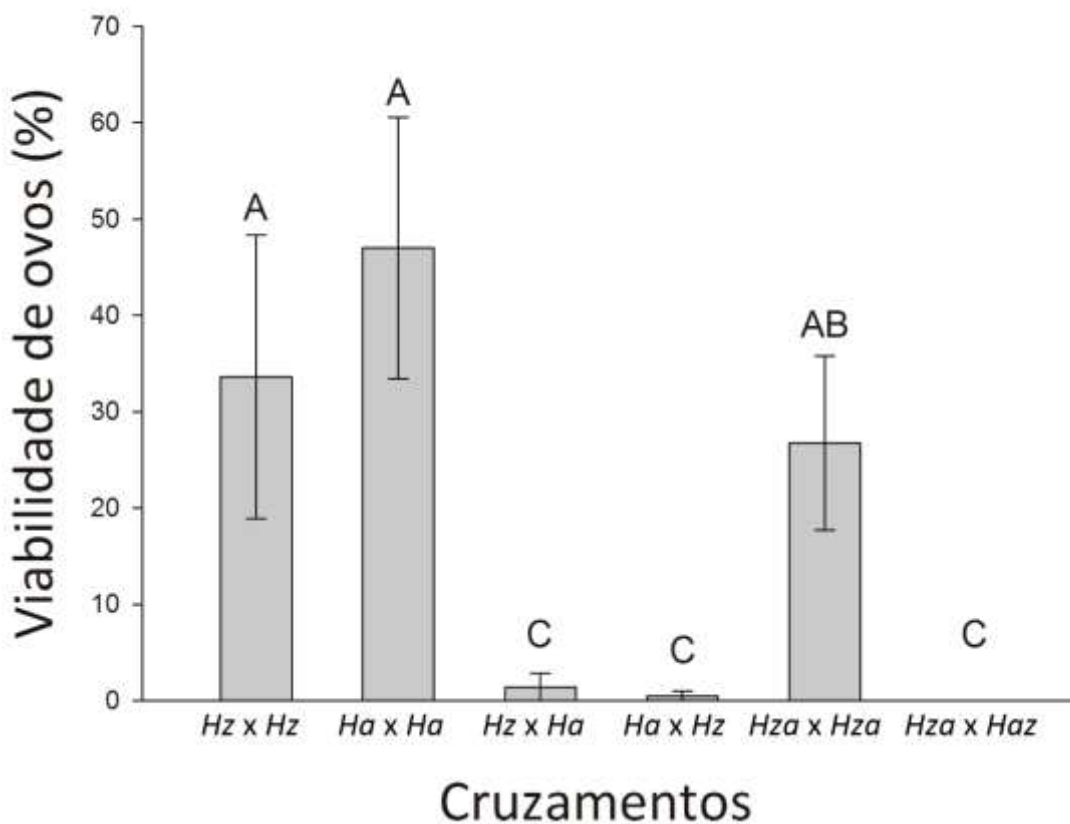


Figura 2 - Viabilidade de ovos para todos os tratamentos. Colunas representam as médias. Barras de erro (\pm EP) com as mesmas letras dentro de evento não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

4.2.2. Viabilidade e desenvolvimento em dieta artificial

Na Figura 3A foi observado que houve diferença significativa na maioria dos cruzamentos em relação a massa corpórea das lagartas, sendo que a maior média de $572 \pm 18,34$ foi da prole do cruzamento entre [*Ha* x *H_z*] e a menor média foi da prole oriunda do cruzamento híbrido entre [*H_{za}* x *H_{za}*], sendo uma média de $197 \pm 33,02$ mg (Figura 3A). A duração do estágio de lagarta não apresentou diferença significativa entre a prole do cruzamento coespecífico [*H_z* x *H_z*] e a prole do cruzamento entre híbridos [*H_{za}* x *H_{za}*], mas apresentou diferença entre lagartas oriundas do cruzamento coespecífico de *H. armigera* [*Ha* x *Ha*], interespecífico [*H_z* x *Ha*] e [*Ha* x *H_z*] que não apresentam diferenças entre si (Figura 3A). Sendo que a prole do cruzamento [*H_z* x *H_z*] teve a maior média de duração de lagarta de $21,32 \pm 0,4$ dias e a menor duração foi dada pela prole híbrida do casal [*H_z* x *Ha*] com tempo médio de $17,76 \pm 0,2$ dias (Figura 3A).

Em relação ao peso de pupa resultante do cruzamento [*H_z* x *H_z*] foi significativamente diferente das pupas dos outros cruzamentos, assim como as do cruzamento [*Ha* x *H_z*], já as pupas resultantes dos cruzamentos coespecífico [*Ha* x *Ha*], interespecífico [*Ha* x *H_z*] e entre híbridos [*H_{za}* x *H_{za}*] não diferiram entre si (Figura 3B). Para o parâmetro duração do estágio de pupa a maior média foi de $15,29 \pm 0,3$ dias e a menor foi $14,67 \pm 0,33$ para as respectivas proles dos cruzamentos [*Ha* x *H_z*] e [*H_z* x *H_z*] (Figura 3B). O maior tempo de ciclo total de ovo-adulto foi de $42,78 \pm 0,38$ dias para as pupas oriundas do cruzamento entre híbridos [*H_{za}* x *H_{za}*] que não teve diferença significativa quando comparada as pupas do cruzamento coespecífico [*Ha* x *Ha*], já o ciclo mais curto foi da prole [*H_z* x *Ha*] com $38,41 \pm 0,48$ dias e não apresentou diferença significativa quando comparada a duração de pupa oriunda dos cruzamentos [*H_z* x *H_z*] e [*Ha* x *H_z*] (Figura 3C).

O tempo médio de geração (*T*) teve diferença significativa em todos os tratamentos quando realizados em dieta artificial (Tabela 2). A prole do cruzamento coespecífico de *H. zea* [*H_z* x *H_z*] teve o maior *T* = 44,57 dias, variando em sete dias em relação ao menor tempo médio de geração que foi da prole oriunda do cruzamento [*Ha* x *H_z*] (*T* = 37,50 dias) (Tabela 2). Já o *R₀* que é a taxa de reprodução líquida mostrou um decréscimo significativo entre os quatro tratamentos, indicando que a redução da população é evidente principalmente nas linhagens híbridas [(*R₀* 0,69 ± 0,68) e (*R₀* 0,0 ± 0,0)], se comparadas as linhagens puras [(*R₀* 89,34 ± 17,94) e (*R₀* 34,27 ± 14,84)] (Tabela 2).

Com base nesses resultados estima-se que, depois de 43,2 dias (T) o cruzamento coespecífico [$Ha \times Ha$] vai gerar cerca de 99 fêmeas resultantes de cada fêmea, em *H. zea* [$H_z \times H_z$] é esperado que depois de 44,57 dias (T) cada fêmea oriunda desse cruzamento gere 37 fêmeas, híbridos do cruzamento [$H_z \times Ha$] terão 0,66 fêmea resultante de cada fêmea e a prole do cruzamento entre [$Ha \times H_z$] não vão gerar nenhuma fêmea. A taxa de crescimento intrínseco (r_m) foi semelhante entre *H. armigera* e *H. zea*, não tendo diferença significativa entre elas, e foi bem inferior para os híbridos, indicando que no cruzamento entre [$Ha \times H_z$] o crescimento foi nulo (Tabela 2).

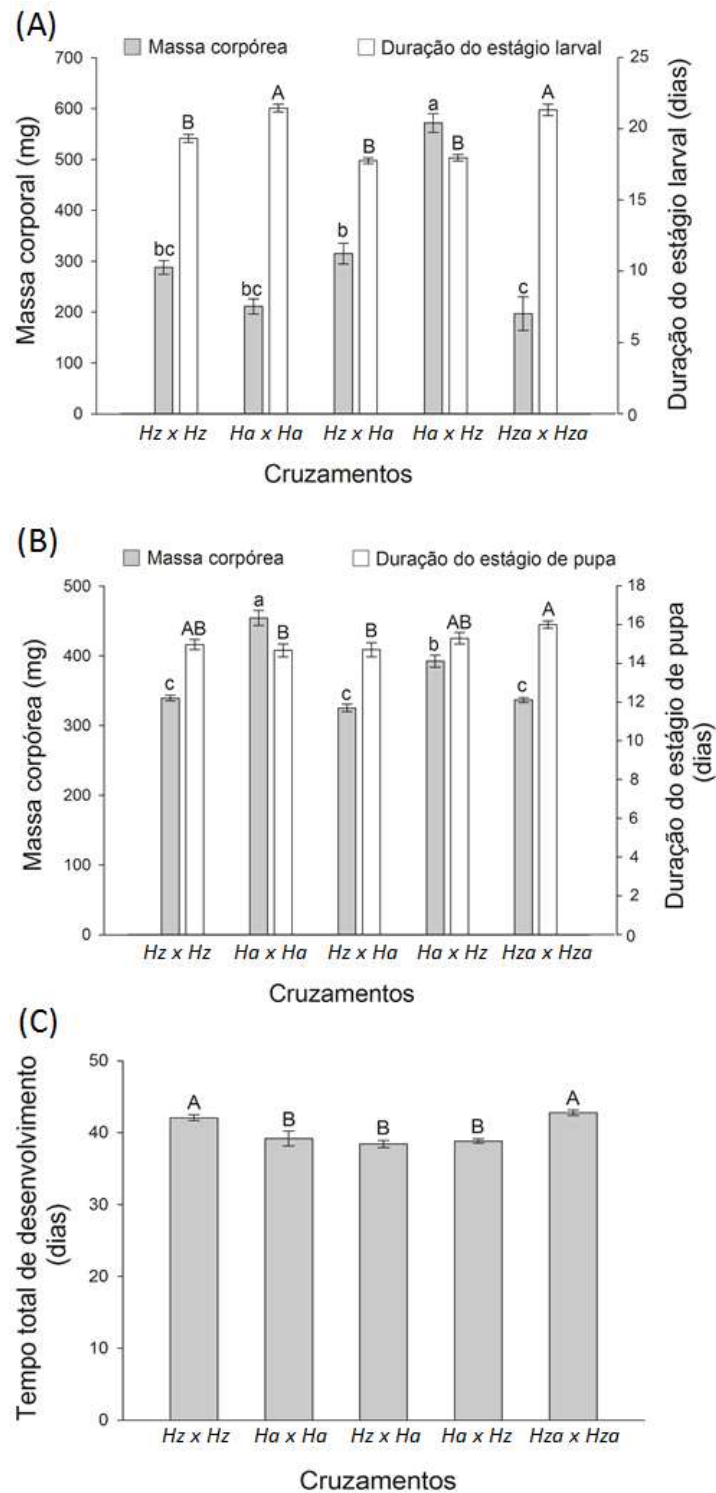


Figura 3 - (A) peso de lagarta com 12 dias e duração do estágio larval, (B) peso de pupa com 24h e duração do estágio de pupa e (C) tempo de desenvolvimento ovo-adulto em dieta artificial. Colunas representam as médias. Barras de erro (\pm EP) com as mesmas letras dentro de evento não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

Tabela 2 - Parâmetros da tabela de vida de fertilidade de (a) ♀ *H. armigera* x ♂ *H. armigera*, (b) ♀ *H. zea* x ♂ *H. zea*, (c) ♀ *H. zea* x ♂ *H. armigera* e (d) ♀ *H. armigera* x ♂ *H. zea* em dieta artificial

Cruzamento	T (dias)	R_0	r_m
(a) ♀ <i>H. armigera</i> x ♂ <i>H. armigera</i>	43,263 ± 0,206 ^{b 1}	89,344 ± 17,942 ^a	0,104 ± 0,005 ^a
(b) ♀ <i>H. zea</i> x ♂ <i>H. zea</i>	44,574 ± 0,367 ^a	34,270 ± 14,845 ^b	0,082 ± 0,011 ^a
(c) ♀ <i>H. zea</i> x ♂ <i>H. armigera</i>	41,220 ± 0,012 ^c	0,687 ± 0,687 ^c	-0,032 ± 0,001 ^b
(d) ♀ <i>H. armigera</i> x ♂ <i>H. zea</i>	37,500 ± 0,001 ^d	0,020 ± 0,020 ^d	-0,103 ± 0,000 ^c

¹ Médias (± EP) não seguidas de mesmas letras, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. T = intervalo de tempo entre cada geração, R_0 = taxa líquida de reprodução e r_m = capacidade inata de aumentar em número

4.2.3. Viabilidade e desenvolvimento em dieta artificial

Também foram analisados parâmetros biológicos para as proles dos cruzamentos em folhas de algodão. O peso de lagarta foi maior na prole do cruzamento [*Ha* x *H_z*] com uma média de $439,08 \pm 20,08$ mg e menor para as lagartas oriundas de [*H_za* x *H_za*] pesando em média $167,43 \pm 21,85$ mg (Figura 4A). A duração do estágio de lagarta não teve uma diferença significativa entre proles de [*Ha* x *Ha*], [*H_z* x *Ha*] e [*Ha* x *H_z*], porém foi diferente da progênie resultante do cruzamento [*H_z* x *H_z*] que teve uma duração de $27,43 \pm 0,67$ dias (Figura 4A), tendo uma duração de cinco dias a mais em relação a menor duração. Além disso o a progênie do cruzamento [*H_z* x *H_z*] apresentou o maior peso de pupa ($362,43 \pm 12,85$ mg), um período do estágio de pupa superior a todos os outros cruzamentos ($14,5 \pm 0,66$ mg) (Figura 4B) e o maior tempo em dias do tempo total de desenvolvimento ($43,78 \pm 1,39$ dias) (Figura 4C), porém para os dois últimos parâmetros não houve diferença significativa entre as proles dos cruzamentos (Figura 4B e C).

Na tabela de vida o valor de *T* foi significativamente diferente somente para o os descendentes do cruzamento [*H_z* x *H_z*] com um tempo médio de geração de 50,96 dias (Tabela 3), tendo um tempo de geração de 7 dias maior que as outras linhagens. A partir do valor de *T* podemos calcular que depois de 43,5 dias (*T*) os descendentes do cruzamento [*Ha* x *Ha*] resultara em 121 fêmeas resultantes de cada fêmea, para a prole de [*H_z* x *H_z*] é esperado que depois de 50,96 dias 30,29 fêmeas, e a prole híbrida oriunda dos cruzamentos interespecíficos [*H_z* x *Ha*] e [*Ha* x *H_z*] depois de 43,22 e 43,57 dias 0,54 e 2,02 fêmeas respectivamente por dia.

R_o teve sua maior taxa no cruzamento coespecífico [*Ha* x *Ha*] ($R_o = 108,88 \pm 21,8$) e sua menor taxa para o cruzamento interespecífico [*H_z* x *Ha*] ($R_o = 0,57 \pm 0,57$) (Tabela 3). A diferença foi significativa em todos os cruzamentos para o parâmetro r_m , o maior valor foi 0,11 e menor -0,034 (Tabela 3).

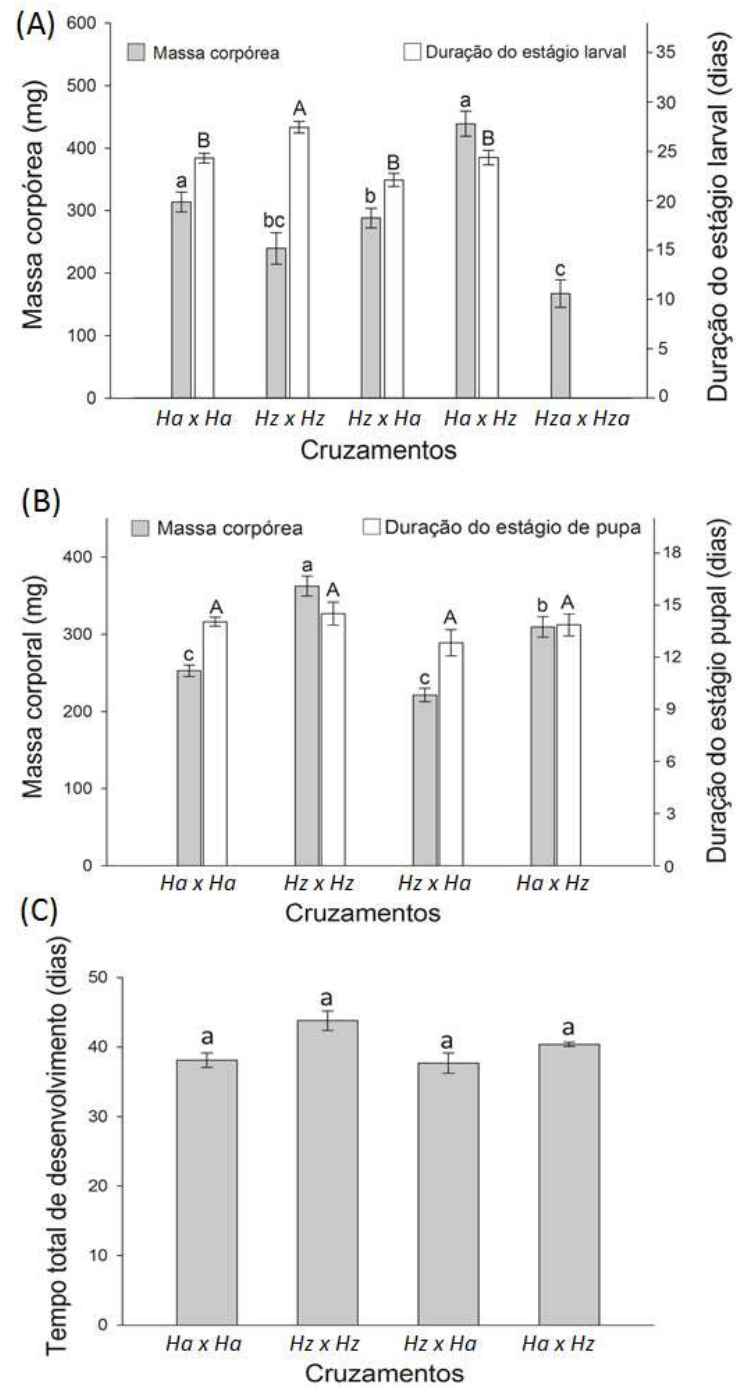


Figura 4 - (A) peso de lagarta com 20 dias e duração do estágio larval, B) peso de pupa com 24h e duração do estágio de pupa e (C) tempo de desenvolvimento ovo-adulto em Algodão. Colunas representam as médias. Barras de erro (\pm EP) com as mesmas letras dentro de evento não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P > 0,05$)

Tabela 3 - Parâmetros da tabela de vida de fertilidade de (a) ♀ *H. armigera* x ♂ *H. armigera*, (b) ♀ *H. zea* x ♂ *H. zea*, (c) ♀ *H. zea* x ♂ *H. armigera* e (d) ♀ *H. armigera* x ♂ *H. zea* em algodão

Cruzamento	T (dias)	R_o	r_m
(a) ♀ <i>H. armigera</i> x ♂ <i>H. armigera</i>	43,508 ± 0,787 ^b	108,888 ± 21,867 ^a	0,108 ± 0,004 ^b
(b) ♀ <i>H. zea</i> x ♂ <i>H. zea</i>	50,960 ± 0,403 ^a	28,310 ± 12,263 ^b	0,068 ± 0,009 ^a
(c) ♀ <i>H. zea</i> x ♂ <i>H. armigera</i>	43,220 ± 0,001 ^b	0,575 ± 0,575 ^c	-0,034 ± 0,000 ^c
(d) ♀ <i>H. armigera</i> x ♂ <i>H. zea</i>	43,572 ± 0,001 ^b	2,046 ± 2,046 ^c	-0,005 ± 0,000 ^d

¹ Médias (± EP) Não seguidas de mesmas letras, diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. T= intervalo de tempo entre cada geração, R_o = taxa líquida de reprodução e r_m = capacidade inata de aumentar em número.

4.3 Bioensaios de tolerância a estratégias de controle

4.3.1 Tolerância a deltametrina

A curva dose resposta revelou um valor de CL_{50} igual a 0,0011 μg i.a./lagarta para *H. zea* ($X^2 = 3,91$; $p = 0,27$). Já para *H. armigera* a CL_{50} igual a 14382,00 μg i.a./lagarta ($X^2 = 5,58$; $p = 0,20$) gerando uma razão de tolerância entre as duas espécies de $1,3 \times 10^7$ (Tabela 4).

Os bioensaios com deltametrina para prole resultante de todos os cruzamentos descritos anteriormente apresentou sobrevivência distinta entre tratamentos ($F_{(4,24)} = 51,55$; $p < 0,01$) (Figura 5), porém para a prole dos cruzamentos coespecífico de *H. armigera* [*Ha x Ha*] e dos cruzamentos interespecíficos [*Hx x Ha*] e [*Ha x Hx*] não tiveram diferença significativa entre si, tendo uma variação máxima de 4,5% de diferença entre os tratamentos e um alto índice de sobrevivência chegando a 91,7%. A sobrevivência da prole oriunda de [*Hza x Hza*] foi de 25,93% sendo uma média de sobrevivência significativamente superior à prole do cruzamento coespecífico de *H. zea* que não houve nenhum sobrevivente na concentração discriminatória (Figura 5).

Tabela 4 - Susceptibilidade de *Helicoverpa zea* e *H. armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) a deltametrina

Espécie	n ¹	Coefficiente angular (\pm EPM ²)	CL ₅₀ (IF 95%) ³	RT (CL ₅₀) ⁴	χ^2	GL	P
<i>H. zea</i>	237	0,94 \pm 0,13	0,0011 (6,3 x 10 ⁻⁴ – 0,0016)	-	3,91	3	0,27
<i>H. armigera</i>	287	0,49 \pm 0,13	14382,00 (4631,00 - 4,9x10 ⁵)	1,3x10 ⁷	5,98	4	0,20

¹número de insetos testados; ² Erro padrão da média; ³ Concentração letal 50 (μ g i.a./lagarta) e intervalo fiducial a 95%; ⁴ razão de tolerância

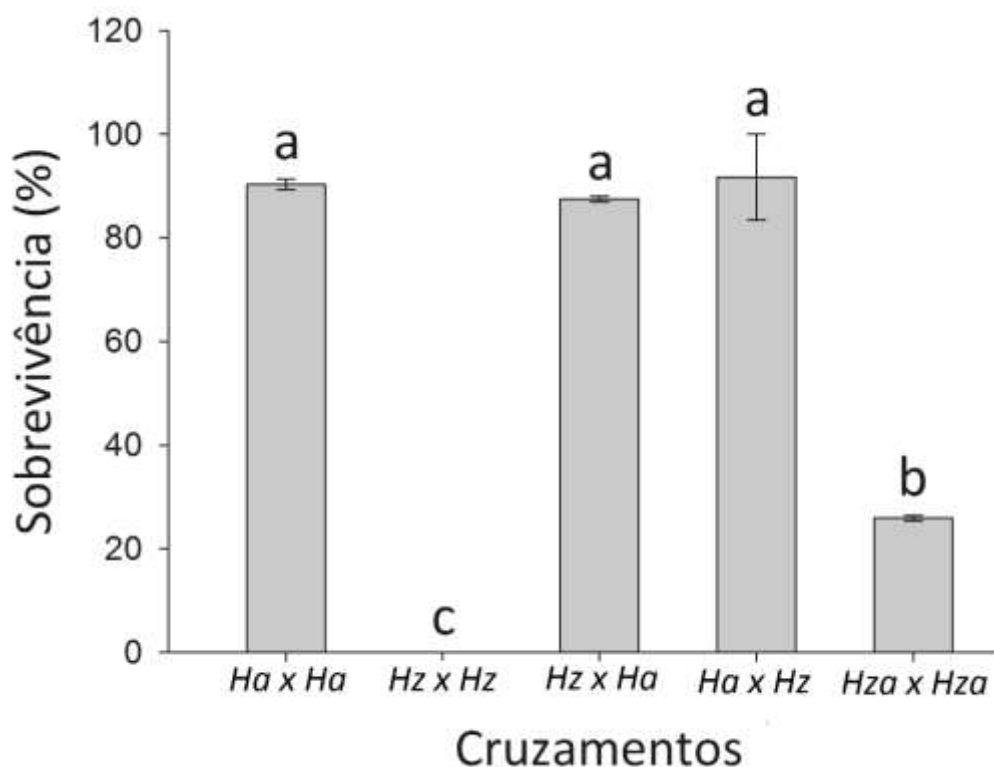


Figura 5 - Porcentagem de mortalidade a deltametrina da prole oriunda de diferentes cruzamentos recíprocos de *H. armigera* e *H. zea*. Letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

4.3.2 Sobrevivência a plantas geneticamente modificadas

Não houve sobrevivência da prole resultante de nenhum dos tratamentos no algodão geneticamente modificado. No algodão convencional que serviu como controle a progênie do cruzamento coespecífico de *H. armigera* teve um índice de sobrevivência de 38%, para a progênie do cruzamento coespecífico de *H. zea* 23%; e para a prole dos cruzamentos interespecífico [*Hz x Ha*] e [*Ha x Hz*] tiveram índice de sobrevivência de 46% e 33%, respectivamente.

4.4 Identificação molecular das populações de campo

Do total 431 indivíduos testados 219 foram identificados como *H. zea* (Figura 6) e 212 como *H. armigera* utilizando o gene mitocondrial (COI) (Figura 7). De maneira geral, os dados oriundos dos marcadores nucleares (nrITS1) geraram informações similares aos marcadores mitocondriais (Figura 6 e 7). A exceção de 14 indivíduos (LM1-10, Ba45-4, Ba46-3, Ba54-4, Ba54-5, Ba54-6, Ba9-5, Ba18-17, Ba18-19, MS1-14, SP5-2, JA2-6, RV1-6 e RV1-15) que apresentaram a linhagem mitocondrial de *H. zea* e um ou dois alelos de *H. armigera* (Figura 6) e outros 17

indivíduos (MT6-11, LRV1-3, GO2-20, RS2-16, Ba34-12, Ma1-2, Ma1-3, Ma1-6, Ba12-4, Ba12-5, CO1-1, CO1-6, CO1-8, CO1-10, Ba9-2, Ba27-46 e Ba49-9) que apresentaram a linhagem mitocondrial de *H. armigera* e um alelo de *H. zea* (Figura 7). As linhagens mitocondriais de *H. zea* foram encontradas preferencialmente no hospedeiro milho (Figura 6) com exceção do indivíduo LM1-10 que foi coletado em soja e sugerido como híbrido em nossas análises. Já os indivíduos identificados como *H. armigera* pela linhagem mitocondrial foram provenientes principalmente de hospedeiros dicotiledônios como soja, algodão e feijão.

No algodão podemos identificar o maior número de indivíduos híbridos, em *H. zea* 35% (sete) dos híbridos foram coletados nessa cultura (Tabela 6). Em *H. armigera* dos 17 híbridos, 9 foram coletados em algodão, 5 em soja e apenas 2 em milho.

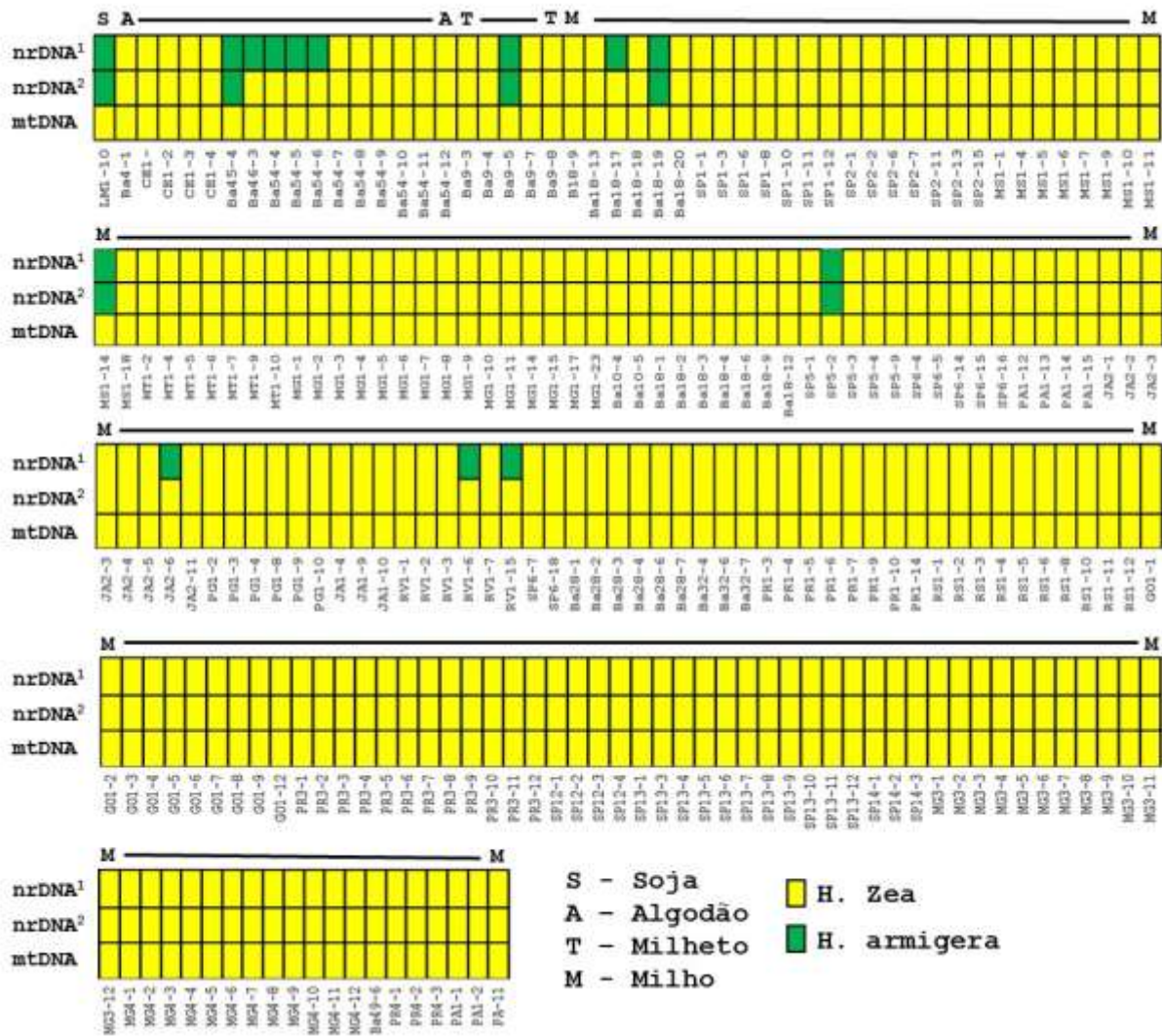


Figura 6 - *H. zeae* em diferentes culturas, identificadas utilizando marcador mitocondrial COI (mtDNA) e marcador nuclear ITS1 (nrDNA)

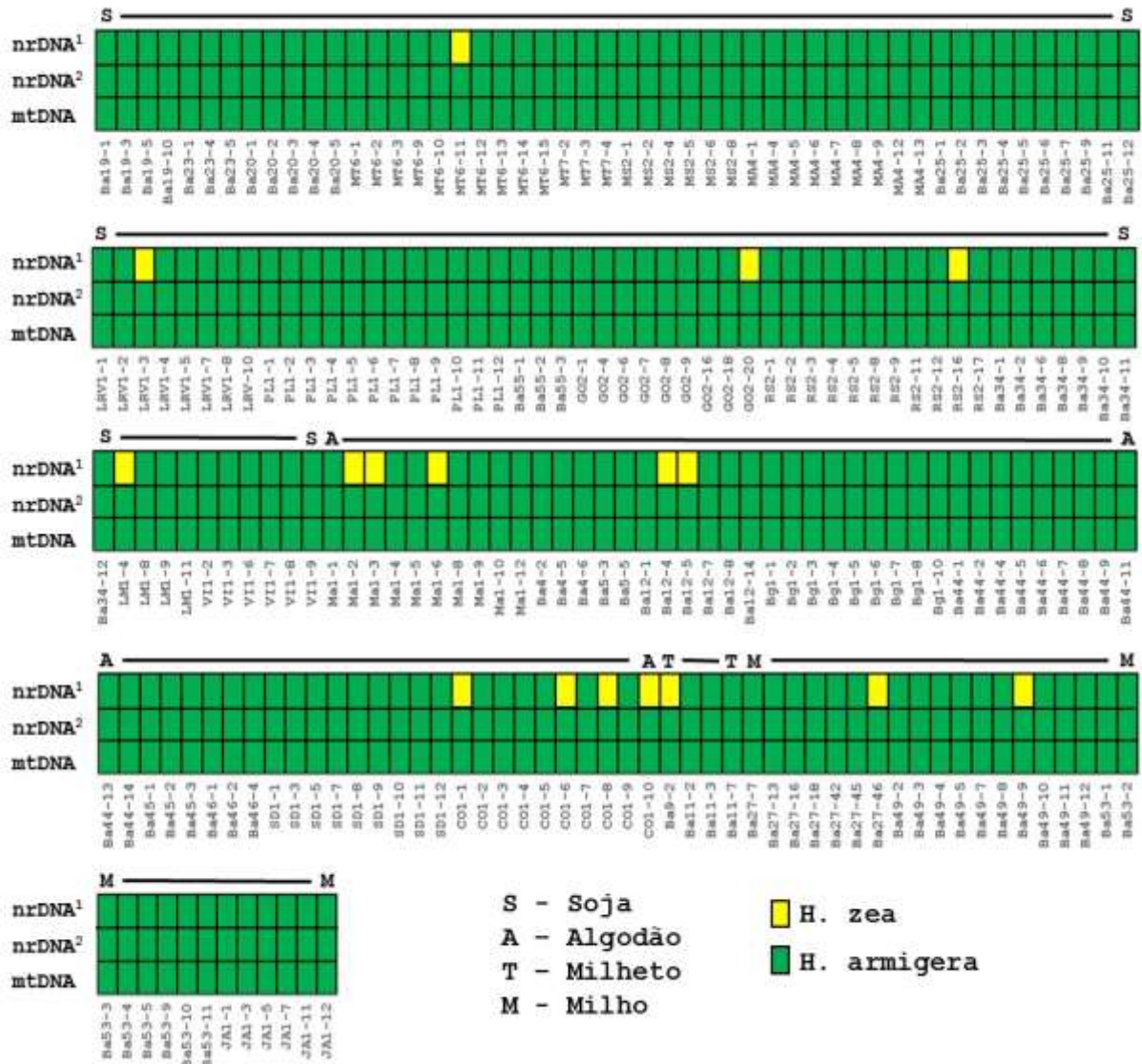


Figura 7 - *H. armigera* em diferentes culturas, identificadas utilizando marcador mitocondrial COI (mtDNA) e marcador nuclear ITS1 (nrDNA)

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados confirmam a possibilidade de surgimento de uma prole híbrida parcialmente fértil entre as linhagens brasileiras de *H. zea* e *H. armigera*, demonstrando o incompleto isolamento reprodutivo entre as duas espécies. O marcador nuclear baseado na região do nrDNA (ITS1) também sugere a presença de indivíduos híbridos putativos em condições naturais no território brasileiro. Prole híbrida resultante de cruzamentos entre espécies de mariposas da subfamília Heliiothinae (Lepidoptera: Noctuidae) em condições de laboratório é reportada na literatura para espécies como *Heliothis virescens* (Fabricius) e *H. subflexa* (Guenée) (LASTER, 1972; LASTER et al., 1988) e entre *H. armigera* e *H. assulta* (Guenée) (ZHAO et al., 2005). Também não é o primeiro relato de prole híbrida fértil entre *H. zea* e *H. armigera* (LASTER; HARDEE, 1995; LASTER; SHENG, 1995). No entanto, é o primeiro relato que sugere fortemente a presença de uma prole híbrida em condições de campo. Esses resultados concordam com Leite (2016) e Leite et al. (2016), onde análises de loci de microssatélites interespecíficos de populações de *H. zea* e *H. armigera* também sugeriram a presença de indivíduos híbridos em condições naturais. No entanto, *H. zea* e *H. armigera* mantêm uma clara identidade genética não apresentando uma ampla mistura dos genomas entre as populações (LEITE, 2016; LEITE et al., 2016).

A baixa viabilidade dos cruzamentos interespecíficos em laboratório e a baixa frequência no campo confirmaram isolamento reprodutivo entre *H. zea* e *H. armigera*, mesmo que este seja parcial. Os mecanismos pré-copulatórios de especiação parecem ser menos efetivos na manutenção do isolamento reprodutivo, visto que os testes de escolha revelaram cruzamentos interespecíficos recíprocos entre as espécies. Os indivíduos machos de *H. armigera* demonstram preferência para acasalamentos com fêmeas da mesma espécie enquanto os machos de *H. zea* não diferiram entre fêmeas co e heteroespecíficas, apesar de em números absolutos ocorreram um maior número (77%) de acasalamento de macho de *H. zea* com sua fêmea coespecífica. Já os indivíduos fêmeas de *H. zea* e *H. armigera* não diferiram entre machos de ambas as espécies. Isso sugere que os machos são mais seletivos na escolha dos parceiros sexuais que as fêmeas. Assim nós podemos inferir que os mecanismos de percepção do feromônio sexual, usado pelo macho para reconhecer a fêmea, são mais eficientes como isolamento reprodutivo quando comparamos com os padrões comportamentais pré-copulatórios de corte realizados pelo macho que

antecedem a aceitação final da fêmea para que ocorra a cópula, já que as fêmeas foram menos específicas durante os testes de escolha.

Apesar do mecanismo pré-zigóticos relacionados à copula não serem eficiente para o isolamento reprodutivo, os nossos resultados sugerem que os mecanismos pós-copula são os principais responsáveis pelo isolamento reprodutivo entre *H. zea* e *H. armigera*, já que tivemos uma baixa viabilidade de ovos oriundos de acasalamentos interespecíficos. Um dos mecanismos pós-copula, mas ainda pré-zigóticos, que podem agir é a incompatibilidade dos gametas, onde os espermatozoides de uma espécie não são capazes de fecundar o óvulo da outra espécie.

Os principais mecanismos de isolamento pós-zigótico em insetos são aqueles de incompatibilidade citoplasmática mediada por endossimbiontes celulares (principalmente *Wolbachia*), nula/baixa viabilidade da prole híbrida e incompatibilidade do zigoto (BORDENSTEIN et al., 2001; KOUKOU et al.; 2006). Testes preliminares realizados com linhagens brasileiras *H. zea* e *H. armigera* não apontaram presença de *Wolbachia*, principal simbiote em artrópodes (Prof. Fernando L. Cônsoli, comunicação pessoal). Além disso, presença de *Wolbachia* no gênero *Helicoverpa* não é descrito na literatura.

Os indivíduos híbridos provenientes de cruzamentos interespecíficos apresentaram um menor tempo de desenvolvimento ovo-adulto. As larvas e pupas dos híbridos de maneira geral possuem maior peso quando comparadas com as linhagens resultantes dos cruzamentos intraespecíficos, tanto em dieta artificial quanto em folhas de algodão, constatando-se o fenômeno de heterose ou vigor híbrido na fase jovem. A heterose observada na prole híbrida aumenta a significância dos mecanismos de incompatibilidade dos gametas ou inviabilidade do zigoto no isolamento reprodutivo entre *H. zea* e *H. armigera*, que também foi demonstrada nos casais híbridos onde a prole F2 (híbrido vs híbrido) apresentou baixa viabilidade de ovos. No entanto, não foi testado retrocruzamento de híbridos com as respectivas linhagens puras de *H. armigera* e *H. zea*, o que poderia aumentar a viabilidade dos cruzamentos e as chances de introgressões nos genomas das espécies devido ao fenômeno de recombinação. Laster e Sheng (1995) realizando cruzamentos recíprocos entre linhagens de *H. zea* oriundas dos EUA e linhagens de *H. armigera* oriundas da China, atestaram viabilidade similar entre a prole híbrida oriunda de cruzamentos recíprocos e da prole oriunda de

retrocruzamentos. A principal diferença encontrada por Laster e Sheng (1995) foi que a linhagem materna de *H. zea* possui um melhor desempenho em todos os cruzamentos interespecíficos realizados. Este resultado foi semelhante ao encontrado aqui, pois foi o cruzamento “♀ *H. zea* + ♂ *H. armigera*” que resultou em híbridos férteis em nossos bioensaios.

Assim, a baixa viabilidade de ovos oriundos de cruzamentos híbridos recíprocos e dos cruzamentos da geração F1 revelada pelos nos bioensaios permite sugerir que os mecanismos fisiológicos e genéticos de incompatibilidade dos gametas/inviabilidade do zigoto são os principais responsáveis pelo isolamento reprodutivo de *H. zea* e *H. armigera*. A inviabilidade dos cruzamentos foram os principais fatores para os índices negativos apresentados na tabela de fertilidade para os cruzamentos recíprocos interespecíficos. *Heliothis virescens* (Fabricius) e *H. subflexa* produzem uma prole híbrida parcialmente fértil, pois o macho é infértil (LASTER, 1972). Trabalhos realizados para determinar a base da esterilidade do híbrido (GOODPASTURE et al., 1980a,b; LACHANCE, 1984) indica que as mitocôndrias herdadas maternalmente de *H. subflexa* (LANSMAN et al., 1983) são deficientes no híbrido e no espermatozoides retrocruzado (MILLER et al., 1986). No entanto, se o progenitor recorrente no retrocruzamento é *H. subflexa*, a fertilidade masculina é recuperada em duas ou três gerações de retrocruzamento (KARPENKO; PROSHOLD, 1977).

A presença de indivíduos híbridos férteis em condições naturais possibilita a ocorrência de fenômenos de introgressão entre *H. zea* e *H. armigera*. Esse fenômeno pode acarretar a transferência de genes de importância adaptativa entre as espécies (BAAK; RIESEBERG, 2007; MALLET, 2007; BEEBEE; ROWE, 2008). Isso pode afetar diretamente a adaptação dessas espécies a novos ambientes bem como a resistência a táticas de controle. Introgressões no genoma de *H. armigera* devido ao fluxo gênico interespecífico com espécies de heliotíneos nativos da América do Sul é uma hipótese que deve ainda ser testada para justificar a rápida adaptação e expansão de *H. armigera* no território sul-americano.

Resistência a inseticidas piretróides é amplamente reportada em *H. armigera* em diferentes regiões do mundo e falhas de controle têm sido reportadas no Brasil (MARTIN et al., 2000; JOUËN et al., 2012; RASSOL et al., 2014). Nos nossos bioensaios preliminares, elevada tolerância a deltametrina foi confirmada nos indivíduos de *H. armigera* quando comparado a indivíduos de *H. zea*. Os resultados

dos bioensaios de sobrevivência a deltametrina com os indivíduos híbridos F1 oriundos de ambos os cruzamentos interespecíficos recíprocos apresentaram sobrevivência similar a deltametrina em relação aos indivíduos provenientes dos cruzamentos coespecíficos de *H. armigera*. Já a prole do cruzamento entre híbridos [*Hza* x *Hza*] apresentaram menor sobrevivência a deltametrina, por aparente segregação mendeliana. Esses resultados são de grande impacto para o manejo da praga, visto que, demonstra que a tolerância a piretróides foi transferida para a prole híbrida oriunda do cruzamento [*Hza* x *Ha*] e [*Ha* x *Hza*] de maneira dominante e autossômica. Em condições de campo eventos de introgressão podem permitir a transferir essa alta tolerância a inseticidas piretróides a *H. zea* e outras espécies de da subfamília *Heliothes* nativas do continente americano. Apesar dos nossos resultados não apontarem diferença de sobrevivência entre as linhagens puras e híbridas de *Helicoverpa* para algodão transgênico com proteínas *Bt*, o fenômeno descrito aqui para inseticidas piretróides pode também influenciar a sobrevivência da prole híbrida em plantas *Bt*, já que *H. armigera* têm demonstrado alta tolerância/resistência a plantas *Bt* (GUNNING et al., 2005; NAIR et al., 2013).

A identificação molecular de *H. zea* e *H. armigera* baseado em marcadores mitocondriais confirma a ampla distribuição de ambas as espécies no território brasileiro (LEITE et al., 2014, 2016). A alta capacidade de dispersão, a ocorrência simultânea em alguns hospedeiros e o sistema intensivo de cultivo no Brasil, como reportado por Leite et al. (2014), e confirmado pelos nossos dados, proporciona a ocorrência simultânea de indivíduos de ambas as espécies no espaço e no tempo no território brasileiro. O marcador nuclear, aqui aplicado, baseado na região ribossomal do genoma (PERERA et al., 2015), sugere que o fenômeno de hibridação está ocorrendo naturalmente no território brasileiro. No entanto, assim como reportado em nossos experimentos laboratoriais, a frequência de possíveis indivíduos híbridos é baixa no campo o que confirma o isolamento reprodutivo entre as duas espécies.

Aqui foi realizado uma série de experimentos para definir o isolamento reprodutivo de *H. zea* e *H. armigera* no Brasil. O isolamento reprodutivo entre as duas espécies é real e as espécies mantém sua identidade genética, assim como reportado por Leite, 2016. Aparentemente os mecanismos de incompatibilidade dos gametas/inviabilidade do zigoto são os principais responsáveis pelo isolamento reprodutivo de *H. zea* e *H. armigera*. No entanto, apesar da baixa frequência de indivíduos híbridos em condições artificiais e naturais, o fenômeno de hibridação

pode levar a transferência de genes/loci que impactam diretamente na adaptação destes indivíduos e a capacidade de adaptação a novos ambientes e estratégias de controle.

6 CONCLUSÕES/CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Linhagens brasileiras de *H. zea* e *H. armigera* realizam copulas interespecíficas.
- Linhagens brasileiras de *H. zea* e *H. armigera* produzem uma prole híbrida fértil. No entanto, a viabilidade dos cruzamentos interespecíficos é baixa.
- O fenômeno de heterose foi reportado na fase jovem da prole híbrida de *H. zea* e *H. armigera*.
- *H. armigera* é mais tolerante a deltametrina que *H. zea*. E a prole híbrida também apresenta alta tolerância a deltametrina.
- Os marcadores mitocôndrias revelam ampla distribuição de *H. zea* e *H. armigera* no território brasileiro, sendo ampla preferência de *H. zea* por milho e *H. armigera* por plantas dicotiledôneas como soja e algodão.
- Os marcadores nucleares sugerem a presença de acasalamentos interespecíficos em condições naturais, no entanto existe uma baixa frequência de indivíduos híbridos entre *H. zea* e *H. armigera* em condições naturais.
- Proporcionalmente, plantas de algodão apresentam uma maior ocorrência de indivíduos híbridos.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, R.; ALBACH, D.; ANSELL, S.; ARNTZEN, J.W.; BAIRD, S.J.E.; BIERNE, N.; BOUGHMAN, J. Hybridization and speciation. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 26, n. 2, p. 229-246, 2013.
- ARNOLD, M.L.; HODGES, S.A. Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? **Trends in Ecology & Evolution**, Cambridge, v. 10, n. 2, p. 67–71, 1995.
- BAACK, E. J.; RIESEBERG, L. H. A genomic view of introgression and hybrid speciation. **Current Opinion in Genetics & Development**, London, v. 17, n. 2, p. 513–518, 2007.
- BEEBEE, T.J.C.; ROWE, G. **An introduction to molecular ecology**. Oxford University Press, New York, 2008. 7 p.
- BEHERE, G.T.; TAY, W.T.; RUSSELL, D.A.; BATTERHAM, P. Molecular markers to discriminate among four pest species of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 98, n. 6, p. 599-603, 2008.
- BEHERE, G.T.; TAY, W.T.; RUSSELL, D.A.; HECKEL, D.G.; APPLETON, B.R.; KRANTHI, K.R.; BATTERHAM, P. Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae) and of its relationship to *H. zea*. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 7, n. 1, p. 117, 2007.
- BIRKHEAD, T. R.; BRILLARD, J. P. Reproductive isolation in birds: postcopulatory prezygotic barriers. **Trends in Ecology & Evolution**, Cambridge v. 22, n. 5, p. 266–272, 2007.
- BUTT, B.A.; CANTU, E. **Sex determination of lepidopterous pupae**. Washington: USDA, 1962. 7 p.
- CARVALHO, R.P.L. Pragas do milho. In: PATERNIANI, E. **Melhoramento e produção de milho no Brasil**. Piracicaba: Fundação Cargill, 1980. p. 505-570, 1980.
- CHANG, A. S. Conspecific sperm precedence in sister species of *Drosophila* With overlapping ranges. **Evolution**, Lancaster, v. 58, n. 4, p. 781–789, 2004.
- CHO, S.; MITCHELL, A.; MITTER, C.; REGIER, J.; MATTHEWS, M.; ROBERTSON, R. Molecular phylogenetics of heliothine moths (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae), with comments on the evolution of host range and pest status. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 33, n. 4, p. 581-594, 2008.
- CORRÊA, A.S.; OLIVEIRA, L.O.; BRAGA, L.S.; GUEDES, R.N.C. Distribution of the related weevil species *Sitophilus oryzae* and *S. zea mays* in Brazil. **Insect Science**, Malden, v. 20, n.6, p. 763-770, 2013.
- COYNE, J.A.; ORR, H.A. Patterns of speciation in *Drosophila*. **Evolution**, Lancaster, v. 43, n. 2, p. 362–381, 1989.

COYNE, J.A.; ORR, H.A. **Speciation**. Sunderland: Sinauer Associates, 2004. 545 p.

CZEPAK, C.; ALBERNAZ, K.C.; VIVAN, L.M.; GUIMARÃES, H.O.; CARVALHAIS, T. Primeiro registro de ocorrência de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 43, n. 1, p. 110-113, 2013.

DEGRANDE, P.E.; OMOTO, C. Estancar prejuízos. **Revista Cultivar**, Cultivar Grandes Culturas, Pelotas, p. 32-35, abr. 2013.

EL-LISSY, O. **Detection of old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Florida**.

Disponível em:

<http://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/owb/downloads/DA-2015-43.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2015.

FATOUROS, N. E.; HILKER, M.; JÜRGEN, G. Reproductive isolation between populations from Northern and Central Europe of the leaf beetle *Chrysomela lapponica* L. **Chemoecology**, Basel, v. 16, n. 4, p. 241–251, 2006.

FEDER, J.L.; FORBES, A. A. Habitat avoidance and speciation for phytophagous insect specialists. **Functional Ecology**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 585–597, 2007.

FITT, G.P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 34, n. 1, p. 17-52, 1989.

FRICKE, C. **Postmating sexual selection and its role in population divergence in beetles**. 2006.45 p. Dissertations (Doctor in philosophy) - Faculty of Science and Technology, Uppsala, 2006.

FRICKE, C.; ARNQVIST, G. Conspecific sperm precedence in flour beetles. **Animal Behaviour**, London, v. 67, n. 4, p. 729–732, 2004.

FU, X.; TATSUKI, S.; HOSIZAKI, S.; ISHIKAWA, Y. Study of the genetics of female sex pheromone production and male behavioral response in a moth, *Ostrinia orientalis*. **Entomological Science**, Tifton, v. 8, n. 4, p. 363–369, 2005.

GADENNE, C.; PICIMBON, J. F.; BECARD, J. M. Development and pheromone communication systems in hybrids of *Agrotis ipsilon* and *Agrotis segetum* (Lepidoptera: Noctuidae) - Springer. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 23, n. 1, p. 191–209, 1997.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIM, J.D. **Manual de entomologia Agrícola**. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1988. 649 p.

GOODPASTURE, C.; LACHANCE, L.E.; RICHARD, R.D. Persistence of abnormal spermiogenesis in the backcross generations of interspecific hybrids between *Heliothis virescens* x *H. subflexa*. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v.73, n. 4, p. 397-403, 1980a.

- GOODPASTURE, C.; RICHARD, R. D.; MARTIN, D.; LASTER, M. Sperm cell abnormalities in progeny from interspecific crosses between *Heliothis virescens* and *H. subflexa*. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v.73, n. 5, p. 529-532, 1980b.
- GOTTSBERGER, B.; MAYER, F. Behavioral sterility of hybrid males in acoustically communicating grasshoppers (Acrididae, Gomphocerinae). **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, New York, v. 193, n. 7, p. 703–714, 2007.
- GREENE, G.L.; LEPLA, N.C.; DICKERSON, W.A. Velvet bean caterpillar (Lepidoptera, Noctuidae) rearing procedure and artificial medium. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.
- GROOT, A. T.; MARR, M.; SCHÖFL, G. Host strain specific sex pheromone variation in *Spodoptera frugiperda*. **Frontiers in Zoology**, London, v. 5, n. 20, p. 13, 2008.
- GUNNING, R.V.; DANG, H.T.; KEMP, F.C.; NICHOLSON, I.C.; MOORES, G.D. New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatenstransgenic crops Expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.71, n. 5, p. 2558–2563, 2005.
- HARRISON, R. G.; ARNOLD, E.J. A narrow hybrid zone between closely related cricket species. **Evolution**, Lancaster, v. 36, n. 3, p. 535-552, 1982.
- HAYDEN, J.; BRAMBILA, J. **Pest alert: the old world bollworm**. Disponível em: <<http://www.freshfromflorida.com/Divisions-Offices/Plant-Industry/Plant-Industry-Publications/Pest-Alerts/Pest-Alert-The-Old-World-Bollworm>>. Acesso em: 24 nov. 2015.
- HEAD, G.; JACKSON, R.E.; ADAMCZYK, J.; BRADLEY, J.R.; VAN DUYN, J.; GORE, J.; HARDEE, D.D.; LEONARD, B.R.; LUTTRELL, R.; RUBERSON, J.; MULLINS, J.W.; ORTH, R.G.; SIVASUPRAMANIAM, S.; VOTH, R. Spatial and temporal variability in host use by *Helicoverpa zea* as measured by analyses of stable carbon isotope ratios and gossypol residues. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 583-592, 2010.
- HOWARD, D.J.; GREGORY, P.G.; CHU, J.; CAIN, M.L. Conspecific sperm precedence is an effective barrier to hybridization between closely related species. **Evolution**, Lancaster, v. 52, n. 2, p. 511-516, 1998.
- JIGGINS, C.D.; SALAZAR, C.; LINARES, M.; MAVAREZ, J. Hybrid trait speciation and *Heliconius* butterflies. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 363, p. 3047–3054, 2008.
- JOUSEN, N., AGNOLET, S., LORENZ, S., SCHCÖNE, S.E., ELLINGER, R., SCHNEIDER, B.; HECKEL, D.G. Resistance of Australian *Helicoverpa armigera* to fenvalerate is due to the chimeric P450 enzyme CYP337B3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.109, n. 38, p.15206 -15211, 2012.

JUNG, C.R.; JUNG, J.K.; KIM, Y. Effects of different sex pheromone compositions and host plants on the mating behavior of two *Grapholita* species. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, Melbourne, v.16, n. 4, p. 507–512, 2013.

KARPENKO, C.P.; PROSHOLD, F.I. Fertility and mating performance of interspecific crosses between *Heliothis virescens* and *H. subflexa* backcrossed for three generations to *H. subflexa*. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 70, n.5, p.737-74, 1977.

KOROL, A.; RASHKOVETSKY, E.; ILIADI, K.; MICHALAK, P.; RONIN, Y.; NEVO, E. Nonrandom mating in *Drosophila melanogaster* laboratory populations derived from closely adjacent ecologically contrasting slopes at "Evolution Canyon". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 23, p. 12637–12642, 2000.

LACHANCE, L.E. Hybrid sterility: Eupyrene sperm production and abnormalities in the backcross generations of interspecific hybrids between *Heliothis subflexa* and *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 77, n.1, p. 93-101, 1984.

LANSMAN, R.A.; AVISE, J.C.; HUETTEL, M.D. Critical experimental test of the possibility of "paternal leakage" of mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 80, n. 7, p. 1969-1971, 1983.

LASTER, M.L. Interspecific hybridization of *Heliothis virescens* and *H. subflexa*. **Environmental Entomology**, College Park, v. 6, p. 682–687, 1972.

LASTER, M.L.; HARDEE, D.D. Intermating compatibility between north american *Helicoverpa zea* and *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Russia. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 88, n. 1, p. 77-80, 1995.

LASTER, M.L.; SHENG, C.F. Search for hybrid sterility for *Helicoverpa zea* in crosses between the north american *H. zea* and *H. armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from China. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 88, n. 5, p. 1288-1291, 1995.

LASTER, M.L.; KING, E.G.; FURR, R.E. Interspecific hybridization of *Heliothis subflexa* and *H. virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) from Argentina. **Environmental Entomology**, College Park, v.17, n.6, p.1016–1018, 1988.

LEITE, N.A. **Genetic diversity and susceptibility to Vip3Aa20 protein in Brazilian populations of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2016. 146 p. Tese (Doutorado em Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

LEITE, N.A.; ALVES-PEREIRA, A.; CORRÊA, A.S.; ZUCCHI, M.I.; OMOTO, C. Demographics and genetic variability of the new world bollworm (*Helicoverpa zea*) and the old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. **PLoS One**, Berkeley, v. 9, n. 11, p. e113286, 2014.

LEITE, N.A.; CORRÊA, A.S.; CAMPOS, J.B.; ZUCCHI, M. I.; OMOTO, C. Cross-species amplification and polymorphism of microsatellite loci in *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera : Noctuidae) in Brazilian cropping systems. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 2, p. 1-12, 2016.

MAIA, A.D. H.; LUIZ, A J.; CAMPANHOLA, C. Statistical inference on associated fertility life table parameters using jackknife technique: computational aspects. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 93, n. 2, p. 511–518, 2000.

MALLET, J. Hybridization as an invasion of the genome. **Trends in Ecology and Evolution**, Berkeley, v. 20, n. 5, p. 229–237, 2005.

_____. Hybrid speciation. **Nature**, New York, v. 446, p. 279-284, 2007.

_____. Hybridization, ecological races and the nature of species: empirical evidence for the ease of speciation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, London, v. 363, n.1506, p. 2971–2986, 2008.

MALLET, J.; KORMAN, A.; HECKEL, D.; KING, P. Biochemical genetics of *Heliothis* and *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae) and evidence for a founder event in *Helicoverpa zea*. **Annals of Entomological Society of America**, College Park, v. 86, n.2, p. 189–197, 1993.

MANTRAGOLO, W.J.R.; CRUZ, I.; DELLA LUCIA, T.M.C. Densidade populacional de *Helicoverpa zea* (Boddie) (Lepidoptera: Noctuidae) nas fases de ovo, larva e adulto em milho. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 21-28, 1998.

MARTIN, T.; OCHOU, O. G.; HALA-N'KLO, F.; VASSAL, J. M.; VAISSAYRE, M. Pyrethroid resistance in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hubner) in West Africa. **Pest Management Science**, Sussex, v. 56, n. 6, p. 549–554, 2000.

MASTRANGELO, T.; PAULO, D.; BERGAMO, L.; MORAIS, E.; SILVA, M.; BEZERRA-SILVA, G.; AZEREDO-ESPIN, A. Detection and Genetic Diversity of a Heliiothine Invader (Lepidoptera: Noctuidae) From North and Northeast of Brazil. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 107, n. 3, p. 970-980, 2014.

MATHENGE, C.W.; HOLFORD, P.; HOFFMANN, J. H.; ZIMMERMANN H.G.; SPOONER-HART, R.N.; BEATTIE, G.A.C.. Hybridization between *Dactylopius tomentosus* (Hemiptera: Dactylopiidae) biotypes and its effects on host specificity. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 100, n. 3, p. 331–8, 2010.

MILLER, S. G.; HUETTEL, M. D.; DAVIS, M. B.; WEBER, E. H.; WEBER, L. A. Male sterility in *Heliothis virescens* x *H. subflexa* backcross hybrids. Evidence of abnormal mitochondrial transcripts in testes. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 203, n.3, p. 451-461, 1986.

MURÚA, M.G.; SCAROLA, F.S.; NAVARRO, F.R.; CAZADO, L.E.; CASMUZ, A.; VILLAGRÁN, M.E.; LOBOS, E.; GASTAMINZA, G. First record of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 97, n. 2, p. 854-856, 2014.

NASERI, B.; FATHIPOUR, Y.; MOHARRAMIPOUR, S.; HOSSEININAVEH, V. Comparative reproductive performance of *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae) reared on thirteen soybean varieties. **Journal of Agricultural Science and Technology**, Mandeville, v. 13, n. 1, p. 17-26, 2011.

NASREEN, A.; MUSTAFA, G. Biology of *Helicoverpa armigera* (Hubner) reared in laboratory on natural diet. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Deira, v. 3, p. 1668-1669, 2000.

NAIR, R.; KALIA, V.; AGGARWAL, K. K.; GUJAR, G.T. Variation in the cadherin gene sequence of Cry1Ac susceptible and resistant *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and the identification of mutant alleles in resistant strains. **Current Science**, Bangalore, v. 104, p. 215-223, 2013.

NAVARRO, R. V. Comportamiento de emergencia y reproducción del gusano del jojoto (*Heliothis zea* Boddie). *Agronomía Tropical*, Maracay, v. 37, p. 55-61, 1987.

NORTH AMERICAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. **Detection of old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Puerto Rico**. 2014. Disponível em <<http://www.pestalert.org/oprDetail.cfm?oprID=600>>. Acesso em: 24 nov. 2015.

PERERA, O. P.; ALLEN, K. C.; JAIN, D. Rapid Identification of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) Using Ribosomal RNA Internal Transcribed Spacer 1. **Journal of Insect Science**, Tucson, v. 15, n. 1, p. 155, 2015.

POGUE, M. A new synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiation of adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliethinae). **Annals of Entomology Society of America**, College Park, v. 97, n. 6, p. 1222-1226, 2004.

POGUE, M.G. Revised status of *Chloridea* Duncan and (Westwood), 1841, for the *Heliothis virescens* species group (Lepidoptera: Noctuidae: Heliethinae) based on morphology and three genes. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 38, n. 3, p. 523-542, 2013.

PRICE, C.S. Conspecific sperm precedence in *Drosophila*. **Nature**, New York, v. 388, n. 6643, p. 663-666, 1997.

RABELING, C.; SCHULTZ, T. R.; PIERCE, N. E.; BACCI, M. A Social Parasite evolved reproductive isolation from its fungus-growing ant host in sympatry. **Current Biology**, London, v. 24, n. 17, p. 2047-2052, 2014.

RASOOL, A.; JOUÛEN, N.; LORENZ, S.; ELLINGER, R.; SCHNEIDER, B.; KHAN, S. A.; HECKEL, D. G. An independent occurrence of the chimeric P450 enzyme CYP337B3 of *Helicoverpa armigera* confers cypermethrin resistance in Pakistan. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 53, p. 54-65, 2014.

RIDLEY, M. **Evolução**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed; 2006. 752 p.

RUMMEL, D. R.; LESER, J. F.; SLOSSERS, J. E.; PUTERKA, G. J.; NEEB, C. W.; WALKER, J. K.; BENEDICT, J. H.; HEILMAN, M. D.; NAMKEN, L. N.; NORMAN, J. W.; YOUNG, J. H. Theory and tactics of *Heliothis* population management. USDA. **Cultural Biology Control Bulletin**, Oklahoma, v.316, 1986. 38 p.

SANCHEZ, L.; DUBENDORFER, A. Development of imaginal discs from lethal hybrids between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila mauritiana*. **Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology**, Berlin, v. 192, n. 1, p. 48–50, 1983.

SAVOLAINEN, V.; ANSTETT, M.-C.; LEXER, C.; HUTTON, I.; CLARKSON, J.J.; NORUP, M.V.; POWELL, M.P.; SPRINGATE, D.; SALAMIN, N.; BAKER, W.J. Sympatric speciation in palms on an oceanic island. **Nature**, New York, v. 441, n. 7090, p. 210–213, 2006.

SCHLUTER, D. Ecology and the origin of species. **Trends in Ecology & Evolution**, Berkeley, v. 16, n. 7, p. 372–380, 2001.

SERVICIO NACIONAL DE CALIDAD Y SANIDAD VEGETAL Y DE SEMILLAS. **Senave en alerta tras ingreso de peligrosa plaga agrícola**. Disponível em <<http://www.abc.com.py/edicion-imprensa/economia/senave-en-alerta-rasingreso-de-peligrosa-plaga-agricola-629240.html>>. Acesso em: 24 nov. 2015.

SHULL, G.H. What Is heterosis. **Genetics**, Pittsburgh, v. 33, p. 439–446, 1948.

SOUZA, J. C.; REIS P. R. Principais pragas do tomate para mesa: bioecologia, dano e controle. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 24, p. 79-92, 2003.

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

TABATA, J.; ISHIKAWA, Y. Genetic basis to divergence of sex pheromones in two closely related moths, *Ostrinia scapularis* and *O. zealis*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, n. 5, p. 1111–1124, 2005.

TAY, W.T.; SORIA, M.F.; WALSH, T.; THOMAZONI, D.; SILVIE, P.; BEHERE, G.T.; ANDERSON, C.; DOWNES, S. A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **PLoS One**, Berkeley, v. 8, n. 11, p. e80134, 2013.

TOKUMARU, S.; ABE, Y. Interspecific hybridization between *Liriomyza sativae* (Blanchard) and *L. trifolii* (Burgess) (Diptera : Agromyzidae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 40, n. 4, p. 551–555, 2005.

TURELLI, M.; BARTON, N. H. .; COYNE, J. A. Theory and speciation. **Trends in Ecology and Evolution**, Berkeley, v. 16, n. 7, p. 330–343, 2001.

WADE, M. J.; PATTERSON, H.; CHANG, N. W.; JOHNSON, N. A. Postcopulatory, prezygotic isolation in flour beetles. **Heredity**, London, v. 72, n. 23, p. 163–167, 1994.

WALSH, T.; DOWNES, S.; GASCOYNE, J.; JAMES, W.; PARKER, T.; ARMSTRONG, J.; MAHON, R. Dual Cry2Ab and Vip3A resistant strains of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa punctigera* (Lepidoptera: Noctuidae); tsting linkage between loci and monitoring of allele frequencies. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 107, n. 4, p. 1610-1617, 2014.

WANG, H.; FANG, Y.; WANG, L.; ZHU, W.; JI, H.; WANG, H.; XU, S.; SIMA, Y. Heterosis and differential gene expression in hybrids and parents in *Bombyx mori* by digital gene expression profiling. **Scientific Reports**, New York, v. 5, p. 8750, 2015.

WU, K.M.; LU, Y.H.; FENG, H.Q.; JIANG, Y.Y.; ZHAO, J.Z. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton. **Science**, Washington, v. 321, n. 5896, p. 1676-1678, 2008.

XUE, H. J.; MAGALHÃES, S.; LI, W. Z.; YANG, X. K. Reproductive barriers between two sympatric beetle species specialized on different host plants. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 22, n. 11, p. 2258–2266, 2009.

YANG, Y.; LI, Y.; WU, L. Current status of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* after 15 years of Bt cotton planting in China. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 106, n. 1, p. 375–381, 2013.

ZHAO, C. J.; HAN, G. C.; QIN, Y. H.; WU, C. Differentiating among horse (*Equus caballus*), donkey (*Equus asinus*) and their hybrids with combined analysis of nuclear and mitochondrial gene polymorphism. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v. 122, n. 4, p. 285–288, 2005a.

ZHAO, X. . C.; DONG, J. F.; TANG, Q. B.; et al. Hybridization between *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae): development and morphological characterization of F1 hybrids. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 95, n. 5, p. 409–416, 2005b.

ZALUCKI, M.P.; MURRAY, D.A.H.; GREGG, P. C.; FITT, G. P.; TWINE, P. H.; JONES, C. Ecology of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *H. punctigera* (Wallengren) in the inland of Australia: larval sampling and host plant relationships during winter and spring. **Australian Journal Zoology**, Victoria, v. 42, p. 329–346, 1994.