

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

**Dinâmica populacional histórica e contemporânea de *Chrysodeixis
includens* (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil**

Cleane de Souza Silva

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

**Piracicaba
2020**

Cleane de Souza Silva
Engenheira Agrônoma

Dinâmica populacional histórica e contemporânea de *Chrysodeixis includens*
(Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

Piracicaba
2020

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

Silva, Cleane de Souza

Dinâmica populacional e contemporânea de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil / Cleane de Souza Silva - -versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011-- Piracicaba, 2020.

101 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Falsa-medideira-da-soja 2. Filogeografia 3. Fluxo gênico 4. Estrutura populacional 5. Adaptação 6. Flutuação populacional I. Título

À Deus;

Aos meus pais, Antônio (In memoriam) e Maria Salete, meus exemplos de amor, dedicação e perseverança;

À minha avó, Maria Isabel (In memoriam), que perdi durante a caminhada;

As minhas irmãs, Clarete e Cléia, por todo amor, carinho, amizade e conselhos;

Aos meus sobrinhos, Saulo, Antunes e Felipe, pela amizade, parceria, momentos de distração com muitos risos, conselhos e ajuda;

À Rogério Machado Pereira, pelo amor, companheirismo e incentivos incondicionais;

Aos meus amigos, companheiros de toda a caminhada;

Dedico e agradeço.

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” /Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) pela oportunidade do doutorado em Entomologia;

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia por todo o suporte e qualificação;

Ao professor Alberto Soares Corrêa, pela confiança, orientação, oportunidades durante esse período em seu laboratório, profissionalismo ensinado e amizade ao longo desses anos de convívio;

Ao Dr. Erick Cordeiro, pelos conselhos, ensinamentos e auxílio com as análises usadas nesta tese;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia pelos ensinamentos;

Aos Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de estudo e suporte financeiro ao projeto;

À empresa Monsanto do Brasil Ltda, pelo suporte financeiro e com coletas de material biológico para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos laboratórios de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP e de Análise Genética e Molecular - CBMEG da UNICAMP, pela receptividade e auxílio no desenvolvimento e geração dos resultados apresentados nesta tese;

Aos colegas do Laboratório de Ecologia Molecular de Artropódes (ESALQ/USP), Dayana Sousa, Frederico Nanini, Patricia Soares, Petra Ferronato, Frederico Hickmann, Tamara Moraes, Daniela Maggio e Rosely Pereira pelo trabalho em grupo, momentos de descontração e suporte emocional durante toda a condução deste trabalho;

À Laura, minha parceira de doutorado e bancada, de quem tenho aprendido e compartilhado muito neste tempo e convívio, dentro e fora do laboratório, e a quem espero ter sempre como amiga;

Aos amigos, Rogério Pereira, Karla Sombra, Ranyse Querino, Natália Leite e Frederico Hickmann pela colaboração com coletas de material usados nos estudos;

À técnica do Laboratório de Ecologia Molecular de Artrópodes (ESALQ/USP), Ma. Cristina Marquesini, pela amizade, ensinamentos e suporte durante todo o projeto;

Ao amigo Leandro Marquesini pela colaboração no transporte das amostras;

Aos estagiários do Laboratório de Ecologia Molecular de Artropódes (ESALQ/USP): Victória Rossetti, Beatriz Pires, Larissa Muniz, Matheus Aurélio, Felipe Carmezini, Lucas Ardiani e André Charkani pela amizade e ajuda durante a execução deste trabalho;

À bibliotecária Eliana Maria da Biblioteca Central (ESALQ/USP) pelo auxílio na formatação deste trabalho;

Aos colegas do curso de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Entomologia pelo agradável convívio durante as disciplinas;

À toda a minha família pelo apoio;

Por fim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
Referências	15
2. FILOGEOGRAFIA E DEMOGRAFIA MOLECULAR DE <i>Chrysodeixis includens</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NO BRASIL.....	21
Resumo.....	21
Abstract	22
2.1. Introdução.....	22
2.2. Material & Métodos.....	24
2.3. Resultados	26
2.4. Discussão.....	36
2.5. Considerações finais	38
Referências.....	39
3. ESTRUTURA GENÉTICA E FLUXO GÊNICO DE <i>Chrysodeixis includens</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) INFERIDA POR MARCADORES SNPS NO BRASIL.....	43
Resumo.....	43
Abstract	44
3.1. Introdução.....	45
3.2. Material & Métodos.....	46
3.3. Resultados	50
3.4. Discussão.....	55
3.5. Considerações finais	56
Referências.....	57
4. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA A FALSA-MEDIDEIRA-DA-SOJA (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)	61
Resumo.....	61
Abstract	61
4.1. Introdução.....	62
4.2. Material & Métodos.....	63
4.3. Resultados	65

4.4. Discussão.....	69
4.5. Considerações finais	71
Referências.....	71
5. DINÂMICA POPULACIONAL TEMPORAL DE <i>Chrysodeixis includens</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E ASSOCIAÇÃO COM HOSPEDEIROS EM QUATRO REGIÕES BRASILEIRAS.....	75
Resumo.....	75
Abstract	76
3.1. Introdução.....	76
3.2. Material & Métodos.....	79
3.3. Resultados	81
3.4. Discussão.....	93
4.5. Considerações finais.....	95
Referências.....	96
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	101

RESUMO

Dinâmica populacional histórica e contemporânea de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) no Brasil

Dentre as várias espécies de lepidópteros que acometem os cultivos agrícolas no Brasil, as espécies pertencentes a subfamília Plusiinae recebem grande destaque pelos severos danos que promovem as plantas cultivadas. Entre essas espécies, *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidae), popularmente conhecida como lagarta-falsa-medideira, recebe maior destaque pelo seu grande número de hospedeiros e pelos frequentes surtos populacionais relatados desde o início dos anos 2000. Essa condição elevou o status dessa espécie a uma praga-chave em culturas como a soja e o algodão. São diversas as hipóteses para explicar os surtos populacionais de *C. includens*. Porém informações sobre a demografia, fluxo gênico, e a estrutura genética de *C. includens* são escassas no Brasil e a falta delas podem comprometer futuros estudos para suprimir as populações deste inseto-praga. Nesse contexto, nossos objetivos gerais foram utilizar marcadores moleculares (mitocondriais, SSR e SNPs), isótopos estáveis de Carbono e um marcador bioquímico (heliocídio H) para inferir a história demográfica e a dinâmica populacional de *C. includens* nas regiões brasileiras e em diferentes hospedeiros, conseguindo assim, obter informações sobre os eventos evolutivos que moldaram e, ainda, moldam as atuais populações de *C. includens* no Brasil. Ao analisar dois fragmentos de genes mitocondriais e marcadores SNPs obtivemos uma baixa diversidade nucleotídica, relações haplotípicas recentes e indicação de recente expansão demográfica e espacial das populações de *C. includens*. A estimativa do tempo de início da expansão demográfica foi de 300 anos. Além disso, os marcadores SNPs e microsatélites estimaram uma inicial estruturação genética no espaço e por hospedeiros (soja e algodão) de *C. includens*. As análises de SNPs sob seleção indicaram 109 loci candidatos sob seleção positiva quando avaliamos todas as populações, dos quais podemos destacar genes associados ao metabolismo digestivo e resistência a pesticidas e plantas geneticamente modificadas que expressam proteína Bt, demonstrando que as populações de *C. includens* estão sob processo de seleção promovido pela atual paisagem agrícola brasileira e principalmente pela soja. Por fim, o estudo temporal da flutuação populacional de *C. includens* em quatro regiões indicaram uma ampla variação no número de mariposas capturadas semanalmente com forte associação a presença de cultivos de soja. Os marcadores de isótopos estáveis de Carbono C_{13} e do marcador bioquímico para algodão indicaram que *C. includens* alimentam-se exclusivamente de plantas com mecanismo fotossintético tipo C3 e que algodão é um hospedeiro importante para manutenção das populações de *C. includens*. Não houve a presença de indivíduos com associação positiva para o biomarcador para algodão nas outras três regiões brasileiras (MT, PR e RS). Os índices de F_{ST} baseados nos marcadores de microsatélites apontam uma estrutura espacial entre algumas subpopulações de *C. includens*. Por fim, o marcador bioquímico para algodão reforça a hipótese de recente expansão geográfica e baixa capacidade de dispersão de *C. includens* entre as regiões brasileiras.

Palavras-chave: Falsa-medideira-da-soja; Filogeografia; Fluxo gênico; Estrutura populacional; Adaptação; Flutuação populacional.

ABSTRACT

Historical and contemporary population dynamics of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil

Among the numerous species of Lepidoptera that affect the Brazilian crops, the Plusiinae subfamily species have great prominence due to the severe damages that promote to cultivated plants. Among these species, *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidae), popularly known as soybean looper, has a large number of hosts with many reports of population outbreaks since the early 2000s. These traits raised the status of this species to a key pest in crops such as soybean and cotton. There are several hypotheses to explain these population outbreaks of *C. includens*. However, information about demographics, gene flow, genetic structure, and genetic diversity of *C. includens* are rare in Brazil and the lack of them may affect future studies of suppressing the natural populations of this insect pest. In this context, our general objectives were to use molecular markers, stable carbon isotopes and a biochemical marker (heliocide H) to infer the demographic history and population dynamics of *C. includens* in different Brazilian regions and different hosts, thereby obtaining information on the evolutionary events that have shaped and, still, shaping the current populations of *C. includens* in Brazil. We analysed two fragments of mitochondrial genes and SNPs markers which obtained low nucleotide diversity, a recent haplotypic relationships, and indication of recent demographic and spatial expansion of the populations of *C. includens* in Brazil. The estimated time for expansion was approximately 300 years. In addition, despite being weak, the SNPs and microsatellite markers estimated an initial genetic structure in space and by hosts (soybean and cotton) of *C. includens*. The analysis of SNPs indicated 109 candidate loci under positive selection when we evaluated all populations, of which we can highlight genes associated with digestive metabolism, pesticides and plants genetically modified to express the Bt protein resistance, demonstrating that the *C. includens* populations are under a strong selection process promoted by the current agricultural landscape. Finally, a temporal study of the *C. includens* population fluctuation in four Brazilian regions indicated a wide variation in the number of moths captured weekly associated with the presence of soybean crops. The stable isotope markers of Carbon C13 and the biochemical marker for cotton indicated that *C. includens* feeds exclusively on plants with type C3 photosynthetic mechanism and cotton is an important host for *C. includens* populations at Luiz Eduardo Magalhães in Bahia. There were no more individuals with a positive association for the cotton biomarker in the other three Brazilian regions. F_{ST} indices based on microsatellite markers indicated a spatial genetic structure among some subpopulations of *C. includens*. Finally, the biochemical marker for cotton reinforces our hypothesis of recent expansion and low dispersion capacity of *C. includens* among Brazilian regions.

Keywords: Soybean looper, Phylogeography; Gene flow; Population structure; Adaptation; Population fluctuation.

1. INTRODUÇÃO

Dentro da ordem Lepidoptera, a família Noctuidae destaca-se por ser uma das mais diversas, com cerca de 21.000 espécies de ampla distribuição mundial e com grande ocorrência na região tropical (Fujihara *et al.*, 2011). São espécies, que em sua maioria, evidenciam-se pela relação com diversos ambientes e recursos, sendo algumas consideradas pragas agrícolas de extrema importância econômica (Holloway *et al.*, 1992). As mariposas, desta família, possuem tamanhos variados, desde muito grandes, chegando a 30 cm, até microlepidópteros com menos de 15 mm de envergadura. Além de possuírem diversos tipos de coloração: parda, cinza, amareladas e com presença de manchas (Holloway *et al.*, 1992; Fujihara *et al.*, 2011).

Entre os lepidópteros da família Noctuidade, a subfamília Plusiinae recebe destaque por apresentar como principal característica apenas três pares de pernas abdominais desenvolvidas nas formas jovens, um par em cada um dos segmentos 5, 6 e 10. E por isso, as lagartas fazem um looper à medida que se locomovem, como se estivesse medindo palmos (Eichlin and Cunningham, 1978; Sosa-Gómez *et al.*, 2010). Plusiinae é uma subfamília com um pequeno número de espécies dentro da família Noctuidae (são estimadas 400 espécies), no entanto possui distribuição em todo o mundo (Goater *et al.*, 2003).

Uma dessas espécies é *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidae), popularmente conhecida como lagarta-falsa-medideira, considerada praga de plantas economicamente importantes como soja, algodão, tabaco, feijão, girassol e diversas hortaliças (Herzog, 1980). Atualmente, sabe-se que *C. includens* utiliza como hospedeiro cerca de 174 plantas pertencentes a 39 famílias. No Brasil, são registradas 26 destas plantas hospedeiras que garante a sobrevivência e persistência dessa espécie ao longo de todas as estações do ano, mesmo na ausência de extensos cultivos agrícolas (Specht *et al.*, 2015).

Os adultos de *C. includens* são mariposas com asas dispostas de forma inclinada, com aproximadamente 35 mm de envergadura. Essas asas são de coloração escura, com duas manchas prateadas brilhantes na parte central do primeiro par de asas, e as asas posteriores são de coloração marrom (Gallo *et al.*, 2002; Sosa-Gómez *et al.*, 2010). As fêmeas depositam seus ovos de forma isolada na face abaxial das folhas. Esses ovos são de formato globular, medindo aproximadamente 0,5 mm de diâmetro e apresentam coloração clara que tendem a escurecer próximo a eclosão, sendo o desenvolvimento embrionário de aproximadamente 5 dias (Peterson, 1964; Mascarenhas and Pitre, 1997; Barrionuevo *et al.*, 2012).

As larvas de *C. includens*, ao eclodirem, são de coloração verde-clara, com listras longitudinais brancas e pontuações pretas espalhadas ao corpo. A duração do período imaturo

da lagarta-falsa-medideira é de aproximadamente 23 dias, atingindo aproximadamente 45 mm de comprimento, com uma média de seis instares larvais até formar a pupa, que ocorre em uma teia com período pupal de 7 a 9 dias até a emergência dos adultos. O ciclo de vida completo de *C. includes* leva um período de aproximadamente 43 dias (Sosa-Gómez *et al.*, 2010; Barrionuevo *et al.*, 2012).

A distribuição de *C. includens* se estende do norte da América do Norte ao sul da América do Sul (Herzog, 1980; Alford and Hammond, 1982). No hemisfério norte, especialmente nos Estados Unidos, as populações de *C. includens* apresentam comportamento migratório, habitando em regiões tropicais e subtropicais entre o Equador e o Trópico de Câncer durante o inverno (como sul da Flórida e do Texas, nos EUA), nessas regiões os adultos se reproduzem o ano todo (Mason *et al.*, 1989). No Brasil, *C. includens* pode ser encontrada regularmente e com diferentes densidades populacionais em todo o seu território (Marsaro Junior *et al.*, 2010; Specht *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2017). No entanto, informações sobre o padrão de migração são escassas para essa espécie no Brasil, deixando a possibilidade de ampla capacidade de dispersão da espécie como hipótese para o recente aumento populacional de *C. includens* (Palma *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2017).

Até a década de 90, *C. includens* ocorria em baixa densidade populacional na cultura da soja, sendo considerada uma praga secundária que exigia poucas medidas de controle. No entanto a partir dos anos 2000, aumentos expressivos nas populações dessa praga começaram a ganhar maior importância, elevando seu status para uma praga-chave (Guedes *et al.*, 2011; Moscardi *et al.*, 2012). São diversas as hipóteses usadas para explicar estes surtos populacionais de *C. includens*. Entre elas a mais citada, mas ainda não plenamente testada, é a baixa ocorrência de agentes naturais de controle, principalmente do fungo *Metarhizium rileyi* (Ascomycota: Clavicipitaceae), gerada pelo excesso a aplicação de defensivos químicos não seletivos para o controle da ferrugem-da-soja e outras pragas agrícolas (Stansly and Orellana, 1990; Sosa-Gómez *et al.*, 2003).

Outra hipótese é a forte expansão de áreas agrícolas no Brasil, onde a paisagem de alguns biomas vem sendo alterada, propondo uma conversão do habitat nativo para o agrícola e conseqüentemente maior disponibilidade de alimento (Spehar, 1995; Fearnside, 2001). Até o início dos anos 70 a cultura da soja se restringia ao sul do Brasil, porém os avanços nos métodos de cultivo e a disponibilidade de novas tecnologias e variedades, permitiram a expansão dessa cultura para novas fronteiras, ocupando e fragmentando novos biomas, como o Cerrado e mais recentemente a Floresta Amazônica (Klink, 1994; Spehar, 1995; Klink, 1995; Camargo, 2001). Além disso, o efeito da sobreposição de áreas de cultivo de soja e algodão, de acordo com

Burleiger (1972), pode diminuir a eficiência do controlador biológico e aumentar aspectos como longevidade, oviposição e frequência de cópulas, quando foi fornecido o néctar das flores de algodoeiro para adultos de *C. includens*.

Para o manejo integrado de pragas (MIP) conhecimentos sobre a estrutura populacional e o fluxo gênico entre populações podem fornecer informações importantes para o manejo eficiente e sustentável de pragas agrícolas (Scott *et al.*, 2005; Enderby *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2013; Leite *et al.*, 2014; Corrêa *et al.*, 2017; Ferronato *et al.*, 2019; Bakovic *et al.*, 2019). Estudos sobre a estrutura populacional bem como sobre fluxo gênico podem estimar o grau de isolamento e a troca de material genético entre populações de uma determinada espécie, ao longo do tempo e do espaço, fornecendo uma estimativa da taxa de invasão ou recolonização de determinada área, e ainda inferir linhagens diferenciadas e isoladas que ocupam diferentes culturas (Pashley, 1986; Martel *et al.*, 2003; Busato *et al.*, 2004; Soares *et al.*, 2018; Corrêa *et al.*, 2019). No entanto, as informações sobre a demografia, estrutura e a diversidade genética, da falsa-medideira-da-soja são escassas no território brasileiro e em todo o continente Americano.

A diversidade genética de uma espécie corresponde a variação hereditária encarregada das diferenciações fenotípicas dos indivíduos de uma população, garantindo a espécie potencial adaptativo aos efeitos ambientais, como mudanças climáticas, predação, competição, patologias e fatores abióticos diversos (Amos and Harwood, 1998). Enquanto que a estrutura genética se refere a distribuição da variabilidade genética nas populações, e sua manutenção ocorre devido a interação entre fatores ecológicos (sistema reprodutivo, a distribuição espacial, o tamanho efetivo e a dispersão) e fatores evolutivos (seleção natural, deriva genética, mutação e fluxo gênico) (Hamrick, 1989; Brown, 1990). O fluxo gênico promove uma mudança na frequência dos alelos causada pelo movimento dos alelos entre populações de uma mesma espécie, e atua promovendo a homogeneidade genética (Slatkin, 1985; Futuyma, 1992).

Neste contexto, o uso de marcadores moleculares tem se revelado uma importante e eficiente ferramenta para quantificar a diversidade genética e o fluxo gênico existentes entre e dentro das populações de insetos. O uso das sequências de DNA mitocondrial (mtDNA) tornou-se nos últimos anos o método mais comum para uma ampla gama de aspectos de investigações taxonômicas, populacionais e evolutivas em animais (Lunt *et al.*, 1996). Esse uso se vale pelas características deste marcador, como alta taxa de substituições de bases, facilidade de isolamento, cópia única e herança uni parental (Arias, 2003). Essas são características vantajosas por permitirem a reconstrução de linhagens evolutivas sem que haja interferência

dos efeitos da hereditariedade biparental e da recombinação existente no DNA nuclear (Pakendorf and Stoneking, 2005).

Outro marcador que se destaca em estudos de estrutura genética de insetos são os microssatélites. Embora originalmente projetados para pesquisas em seres humanos, a análise por microssatélites tornou-se uma ferramenta poderosa para pesquisas em animais (Schlötterer *et al.*, 1991). Por serem marcadores codominantes, eles fornecem mais informação genética por *locus* e possibilitam inferir a heterozigosidade de uma população. Além disso, apresentam vantagens como alta taxa de mutação e reprodutibilidade (Ferreira and Grattapaglia, 1998; Oliveira *et al.*, 2006). Marcadores microssatélites são utilizados em estudos com lepidópteros pragas para investigar estrutura genética, padrões de hibridização e fluxo gênico entre populações (Endersby *et al.*, 2006; Domingues *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2017; Arias *et al.*, 2019).

Contudo, populações altamente conectadas e/ou recentemente divergentes de tamanhos efetivos grandes, muitas vezes mostram fraca diferenciação genética, diminuindo assim o poder de ferramentas genéticas para definir unidades de gestão e atribuições de indivíduos à sua origem (Allendorf *et al.*, 2010). A promessa das tecnologias NGS (Sequenciamento de Nova Geração) para identificar regiões genômicas divergentes entre populações que anteriormente acreditava-se ser em grande parte não diferenciada, é uma perspectiva empolgante tanto para aumentar nosso conhecimento sobre divergência adaptativa quanto para identificar marcadores úteis para a designação populacional de indivíduos (Ackerman *et al.*, 2011).

Um dos métodos de NGS é a Genotyping-by-sequencing (GBS), que aumenta o poder de genotipagem de SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), coletando simultaneamente milhões de sequências de leitura curta para cada indivíduo e melhorando a cobertura da sequência por *locus* através da redução da complexidade do genoma com minimização de custos. É uma abordagem promissora para estudos populacionais, e outras aplicações, em diversos organismos (Elshire *et al.*, 2011). Os SNPs ou polimorfismo de nucleotídeo único são originados de mutações pontuais na cadeia de nucleotídeos como as transições e transversões (Turchetto-Zolet *et al.*, 2017). São abundantes e amplamente distribuídos nos genomas, podendo estar presentes em praticamente todos os *loci* gênicos, o que representa grande vantagem nas análises genéticas (Perkel, 2008). A partir de dados de SNPs é possível identificar variações e associações entre estrutura genética de uma determinada praga com seu hospedeiro, além de inferir a origem e o fluxo gênico de uma espécie (Elshire *et al.*, 2011).

Neste contexto o uso de marcadores mitocondriais e nucleares podem auxiliar no conhecimento sobre origem, demografia, diversidade genética e fluxo gênico de *C. includens* no Brasil, permitindo desbravar pistas para responder questões sobre a origem dos surtos populacionais, a dinâmica populacional no espaço e em diferentes hospedeiros e a capacidade adaptativa dessa espécie no agroecossistema brasileiros. Dessa forma, nosso objetivo geral foi inferir a dinâmica populacional histórica e contemporânea de *C. includens* em diferentes regiões brasileiras e em diferentes hospedeiros.

Referências

- Ackerman, M.W., Habicht, C., Seeb, L.W., 2011. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) under diversifying selection provide increased accuracy and precision in mixed-stock analyses of sockeye salmon from the Copper River, Alaska. *Transactions of the American Fisheries Society*, 140, 865–881.
- Alford, A. R., Hammond Junior, A. N., 1982. Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae), populations in Louisiana soybeans ecosystems as determined with looplure-baited traps. *Journal of Economic Entomology*, Lanham. 75, 4, 647-650.
- Allendorf, F.W., Hohenlohe, P.A., Luikart, G., 2010. Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, 11, 697–709.
- Amos, W., Harwood, J., 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 353, 1366, 177–186.
- Arias, M.C., Francisco, F.O., Silvestre, D., 2003. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. In *Apoidea Neotropica* (G.A.R. Mello & I. Alves-dos-Santos, eds.). Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 305-309.
- Arias, O., Cordeiro, E., Corrêa, A.S., Domingues, F.A., Guidolin, A.S., Omoto, C., 2019. Population genetic structure and demographic history of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): implications for insect resistance management programs. *Pest Management Science*, 75 (11), 2948-2957.
- Bakovic, V., Schuler, H., Schebeck, M., Feder, J. L., Stauffer, C., Ragland, G. J., 2019. Host plant-related genomic differentiation in the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (L., 1758) (Diptera: Tephritidae). *Molecular Ecology*.

- Barrionuevo, M.J., Murúa, M.G., Goane, L., Meagher, R., Navarro, F., 2012. Life table studies of *Rachiplusia nu* (Guenée) and *Chrysodeixis* (= *Pseudoplusia*) *includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) on artificial diet. Fla. Entomol. 95, 944–951.
- Brown, A. H. D., 1990. Genetic characterization of plant mating systems. In: Brown, A. H. D.; Clegg, M. T.; Kahler, A. L.; Weir, B. S. (Ed.). Plant populations genetics, breeding and genetic resources. Sunderland: Sinauer Associates. 145-162 p.
- Burleigh, J.G., 1972. Population dynamics and biotic controls of the soybean looper in Louisiana. Environmental Entomology, 1, 290-294.
- Busato, G.R., Grutzmacher, A.D., Oliveira, A.C., Vieira, E.A., Zimmer, P.D., Kopp, M.M., Bandeira, J.D., Magalhães, T.R., 2004. Analysis of the molecular structure and diversity of *Spodoptera frugiperda* (JE smith) (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to the corn and rice crops in Rio Grande do Sul State, Brazil. Neotropical Entomology, 33, 709-716.
- Camargo, A.J.A., 2001. Insect diversity in cultivated areas and nature reserves: considerations and recommendations. (Diversidade de insetos em áreas cultivadas e reserva legal: considerações e recomendações.) Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento - Embrapa Cerrados, 1:27.
- Corrêa, A.S.; Vinson, C. C.; Braga, L.S.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, L. O. 2017. Ancient origin and recent range expansion of the maize weevil *Sitophilus zeamais*, and its genealogical relationship to the rice weevil *S. oryzae*. Bulletin of Entomological Research, v. 107, p. 9-20.
- Corrêa, A.S.; Cordeiro, E.M.G.; Omoto, C. 2019. Agricultural insect hybridization and implications for pest management. Pest Management Science, v. 75, p. 2857-2864.
- Domingues, F.A., Silva-Brandão, K.L., Abreu, A.G., Perera, O.P., Blanco, C.A., Consoli, F.L., Omoto, C., 2012. Genetic Structure and Gene Flow Among Brazilian Populations of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). Journal of Economic Entomology, 105, 6, 2136 -2146.
- Eichlin, T. D., Cunningham, H. B., 1978. The Plusiinae (Lepidoptera: Noctuidae) of America North of Mexico, emphasizing genitalic and caterpillar morphology. Technical Bulletin 1567. U. S. Department of Agriculture, Washington, DC.
- Elshire, R.J., Glaubitz, J.C., Sun Q., Poland, J.A., Kawamoto, K., Buckler, E.S., Mitchell, S.E., 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. Plos One, 6(5): e19379.

- Endersby, N.M., Mckechnie, S.W., Ridland, P.M., Weeks, A.R., 2006. Microsatellites reveal a lack of structure in Australian populations of the diamondback moth, *Plutalla xylostella* (L.). *Molecular Ecology*, 15, 107-118.
- Ferreira, M.E., Grattapaglia, D., 1998. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Embrapa-CENARGEN, Brasília. 220p.
- Fearnside, P. M., 2001. Soybean cultivation as a threat to the environment in Brazil. *Environmental Conservation* 28, 23-38.
- Ferronato, P., Woch, A. L., Soares, P. L., Bernardi, D., Botton, M., Andrezza, F., ... & Corrêa, A. S., 2019. A phylogeographic approach to the *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) invasion in Brazil. *Journal of Economic Entomology*, 112(1), 425-433.
- Fujihara, R.T., Forti, L.C., Almeida, M. C., Baldin, E.L.L., 2011. Insetos de importância econômica: Guia ilustrado para identificação de famílias. Botucatu: Editora FEPAF, 391.
- Futuyma, D.J., 1992. *Biologia evolutiva*. 2. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 631.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C., 2002. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba: FEALQ, 920.
- Goater, B., Ronkay, L., Fibiger, M., 2003. *Noctuidae Europaeae. Catocalinae, Plusiinae*, vol. 10. Entomological Press, Sorø
- Guedes, J.V.C., Stecca, C.S., Rodrigues, R.B., Bigolin, M., 2011. Nova dinâmica. *Cultivar Grandes Culturas*. 139, 24-26.
- Hamrick, J.L., 1989. Isozymes and analysis of genetic structure in plant populations. In: Soltis, D.E., Soltis, P. *Isozymis and analysis of genetic structure in plant populations*. New York: Chapman and Hall. 87-105.
- Herzog, D.C., 1980. Sampling soybean looper on soybean. In: Kogan, M., Herzog, D.C. (Eds.), *Sampling Methods in Soybean Entomology*. Springer Verlag, New York, pp. 141–162.
- Holloway, J. D., Bradley, J. D., Carter, D. J., 1992. *II E Guides to Insects of Importance to Man*. 1. Lepidoptera. London, The Natural History Museum, 263.
- Klink, C. A., Macedo, R. H., Mueller, C. C., 1994. Cerrado: Processo de ocupação e implicações para a conservação e utilização da sua diversidade biológica. Brasília, Brazil: World Wide Fund for Nature (WWF-Brasil): 104.
- Klink, C.A., 1995. *De Grão em Grão: O Cerrado Perde Espaço*. Brasília, Brazil: World Wide Fund for Nature (WWF-Brasil): 66.

- Leite, N. A., Alves-Pereira, A., Corrêa, A. S., Zucchi, M. I., Omoto, C., 2014. Demographics and genetic variability of the new world bollworm (*Helicoverpa zea*) and the old world bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. *PloS one*, 9(11): e113286.
- Leite, N.A., Correa, A.S., Michel, A.P., Alves-Pereira, A., Pavinato, V.A.C., Zucchi, M.I., Omoto, C., 2017. Pan-American Similarities in Genetic Structures of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) With Implications for Hybridization. *Environmental Entomology*, 146(4):1024-1034.
- Lunt, D.H., Zhang, D.X., Szymura, J.M., Hewitt, G.M., 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol. Biol.* 5:153–65.
- Marsaro Junior, A.L., Pereira, P.R.V.S., Silva, W.R., Griffel, S.C.P., 2010. Flutuação populacional de insetos-praga na cultura da soja no estado de Roraima. *Revista Acadêmica. Ciências Agrárias e Ambientais*, São José dos Pinhais. 8, 71-76.
- Martel, C., Réjasse, A., Rousset, F., Bethenod, M. T., Bourguet, D., 2003. Host plant associated genetic differentiation in Northern French populations of the European corn borer. *Heredity*, 90, 141-149.
- Mascarenhas, R.N., Pitre, H.N., 1997. Oviposition responses of soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae) to varieties and growth stages of soybeans. *Environmental Entomology*, 26, 76-83.
- Mason, L.J., Johnson, S.J., Woodring, J., 1989. Seasonal and ontogenetic examination of the reproductive biology of *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*, 18, 980-985.
- Moscardi, F., Bueno, A.F., Sosa-Gómez, D.R., Roggia, S., Hoffmann-Campo, C.B., Pomari, A. F., Corso, I.C., Yano, S.A.C., 2012. In: Hoffmann-Campo, B.C., Corrêa-Ferreira, B.S., Moscardi, F. Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga, Embrapa, 859.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R., Vieira, M. L. C., 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 2, 294-307.
- Oliveira, M. R. C., Correa, A. S., de Souza, G. A., Guedes, R. N. C., & de Oliveira, L. O. 2013. Mesoamerican origin and pre-and post-Columbian expansions of the ranges of *Acanthoscelides obtectus* Say, a cosmopolitan insect pest of the common bean. *PLoS One*, 8(7), e70039.
- Pakendorf, B., Stoneking, M., 2005. Mitochondrial DNA and Human Evolution. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 6: 165-183.

- Palma, J., Maebe, K., Guedes, J.V.C., Smagghe, G., 2015. Molecular Variability and Genetic Structure of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae), an Important Soybean Defoliator in Brazil. PLoS ONE 10(3): e0121260.
- Pashley, D.P., 1986. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex. Ann. Entomol. Soc. Am. 79: 898-904.
- Perkel, J., 2008. SNP genotyping: Six technologies that keyed a revolution. Nat Methods 5:575–575. doi: 10.1038/nmeth0608-575b
- Peterson, A., 1964. Egg types among moths of the Noctuidae. Florida Entomologist. 47, 71-100.
- Santos, S. R., Specht, A., Carneiro, E., Paula-Moraes, S. V., Casagrande, M. M., 2017. Interseasonal variation of *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the Brazilian Savanna. Revista Brasileira de Entomologia, 61(4), 294-299.
- Schlötterer, C., Amos, B., Tautz, D., 1991. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. Nature, 354:63-65
- Scott, K.D., Lawrence, N., Lange, C.L., Scott, L.J., Wilkinson, K.S., Merritt, M.A., Miles, M., Murray, D., Graham, G.C., 2005. Assessing moth migration and population structuring in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) at the regional scale: example from the darling downs, Australia. Journal of Economic Entomology, Lanham. 98, 6, 2210-2219.
- Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. Annual Review of Ecology and Systematics, Palo Alto.16, 393-430.
- Sosa-Gómez, D.R., Corrêa-Ferreira, B.S., Hoffmann-Campo, C.B., Corso, I.C., Oliveira, L.J., Moscardi, F., Panizzi, A.R., Bueno, A. F., Hirose, E., 2010. Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja. Londrina: Embrapa-CNPSO. 90 (Embrapa – CNPSO. Documentos, 269).
- Sosa-Gómez, D.R., Delpin, K.E., Moscardi, F., Nozaki, M.D.H., 2003. The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on soybean. Neotropical Entomology. 32, 287-291.
- Soares, P. L., Cordeiro, E. M. G., Santos, F. N. S., Omoto, C., Correa, A. S., 2018. The reunion of two lineages of the Neotropical brown stinkbug on soybean lands in the heart of Brazil. Scientific Reports, 8, 2496.

- Specht, A., Paula-Moraes, S.V., Sosa-Gómez, D.R., 2015. Host plants of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae, Plusiinae). *Revista Brasileira de Entomologia*. 59: 343–345.
- Spehar, C. R., 1995. Impact of strategic genes in soybean on agricultural development in the Brazilian tropical savannahs. *Field Crops Research*. 1, 141-146.
- Stansly, P.A., Orellanam, G.J., 1990. Field Manipulation of *Nomuraea rileyi* (Moniliales: Moniliaceae): Effects on Soybean Defoliators in Coastal Ecuador). *Journal of Economic Entomology*. 83(6): 2193-2195.
- Turchetto, C., Turchetto-Zolet, A.C., Passaia, G., Zanella, C.M., 2017. Marcadores genéticos baseados em DNA. In: Turchetto-Zolet, A.C., Turchetto, C., Zanella, C.M., Passaia, G., *Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto. 12-20.

2. FILOGEOGRAFIA E DEMOGRAFIA MOLECULAR DE *Chrysodeixis includens* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) NO BRASIL

*Dados publicados junto ao manuscrito: C.S. Silva; E.M.G. Cordeiro; J.B. Paiva; P.M. Dourado; R.A. Carvalho; G. Head; S. Martinelli; A.S. Correa. Population expansion and genomic adaptation to agricultural environments of the soybean looper, *Chrysodeixis includens*. EVOLUTIONARY APPLICATIONS. 2020

RESUMO

Dentre as pragas mais importantes da atualidade, *Chrysodeixis includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) vem se destacando pelo seu alto grau de polifagia e grande aumento populacional. Com o objetivo de conhecer a dinâmica histórica desta praga, nós sequenciamos dois marcadores mitocondriais para conduzir uma investigação filogeográfica de *C. includens*. Ao analisar os dois fragmentos concatenados obtivemos diversidade haplotípica e nucleotídica total de $Hd = 0,455$ e $\pi = 0,00048$, respectivamente. A maior diversidade haplotípica e nucleotídica de *C. includens* foi encontrada no bioma Cerrado $Hd = 0,621$ e $\pi = 0,00067$, seguido pela Mata Atlântica, $Hd = 0,505$ e $\pi = 0,00059$. O Bioma Caatinga apresentou diversidade nula, onde todos os locais de amostragem tinham um único haplótipo. As análises demográficas F_s de F_u , D de Tajima e *Mismatch distribution* indicaram uma recente expansão demográfica e espacial de *C. includens* no território brasileiro. Já a AMOVA apontou uma falta de estrutura genética entre as populações de *C. includens*. As redes de haplotipos geradas apresentaram uma topologia com formato de estrela, ou seja, um haplótipo central com alta frequência e com ampla distribuição geográfica (haplótipo H1), e haplotipos adicionais em baixas frequências, conectados ao haplótipo central por um único evento mutacional. Nós encontramos baixa diversidade genética, recente expansão populacional e falta de estrutura populacional de *C. includens* no Brasil, características que podem estar associadas a aberturas de fronteiras agrícolas em diferentes regiões brasileiras.

Palavras-chave: Filogeografia; Falsa-medideira-da-soja; Estrutura populacional; Expansão espacial

Phylogeography and Molecular Demography of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil

*Data published in the manuscript: C.S. Silva; E.M.G. Cordeiro; J.B. Paiva; P.M. Dourado; R.A. Carvalho; G. Head; S. Martinelli; A.S. Correa. Population expansion and genomic adaptation to agricultural environments of the soybean looper, *Chrysodeixis includens*. EVOLUTIONARY APPLICATIONS. 2020

ABSTRACT

Among the most important agricultural pests, *Chrysodeixis includens* Walker (Lepidoptera: Noctuidae) highlights by its high degree of polyphagy and high population density. In order to understand the historical dynamics of this pest, we sequenced two mitochondrial markers and we conducted a phylogeographic study of *C. includens* in Brazil. When analyzed two concatenated gene fragments, we obtained the haplotype and nucleotide diversity of $Hd = 0.455$ and $\pi = 0.00048$, respectively. The highest haplotype and nucleotide diversity of *C. includens* was found in Cerrado biome $Hd = 0.621$ and $\pi = 0.00067$, followed by the Brazilian Atlantic Forest, $Hd = 0.505$ and $\pi = 0.00059$. In Caatinga biome, we found a null diversity, where all sampling sites had a single mitochondrial haplotype. The demographic analyses Fu's F_s , Tajima D , and Mismatch distribution indicated a recent demographic and spatial expansion of *C. includens* in the Brazilian territory. AMOVA analysis suggested a lack of spatial genetic structure among the populations of *C. includens*. The haplotype networks presented a star-like topology, that is, a central haplotype with high frequency and wide geographical distribution (H1 haplotype), and additional haplotypes at low frequencies, connected to the central haplotype by a single mutational event. We figured out low genetic diversity, recent population expansion, and a lack of population structure for *C. includens* in Brazil, aspects that probably are associated with the advance of agricultural areas in different Brazilian regions.

Keywords: Phylogeography; Soybean looper; Population structure; Spatial expansion

2.1. Introdução

Nas últimas décadas a utilização de marcadores moleculares para estudos bioecológicos tem se tornado cada vez mais constantes e necessários na entomologia agrícola. Análises filogenéticas e filogeográficas com insetos têm permitido elucidar os processos evolutivos em todos os níveis de classificação dos organismos e explicar as divergências de diferentes linhagens de uma espécie (Emerson *et al.*, 1999). Além disso, estes estudos fornecem

informações sobre os efeitos do isolamento entre populações estimando seu grau e a troca de material genético entre populações ao longo do espaço e do tempo (Emerson *et al.*, 1999; Martel *et al.*, 2003).

Uma ferramenta útil como marcador para o estudo de genética de populações de insetos é o DNA mitocondrial (mtDNA) (Anderson *et al.*, 1981). O mtDNA é de fácil obtenção, isolamento e amplificação, tem origem haploide, sendo transmitido exclusivamente através do óvulo materno, apresentando assim, ausência de recombinação (permanece inalterado até que ocorra uma mutação) (Roderick, 1996). Além disso, os genes mitocôndrias apresentam uma única cópia, o que possibilita que as linhagens maternas possam ser traçadas ao longo do tempo e do espaço com bastante precisão.

Estudos evolutivos de populações de insetos pragas, utilizam o DNA mitocondrial para inferir as fontes e padrões de introdução de espécies (Downie, 2002) e determinar a variabilidade genética e o histórico demográfico das populações de insetos (Albernaz *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2013; Corrêa *et al.*, 2017; Soares *et al.*, 2018). Estudos como estes ajudam a inferir a história evolutiva das espécies e podem ajudar a construir uma base mais firme para as táticas de manejo. Entretanto, para algumas espécies economicamente importantes, como *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidae), a falsa-medideira-da-soja, existem escassez de informações sobre a diversidade genética e as forças demográficas que moldaram as populações dessa praga no território brasileiro. A exceção é um único trabalho publicado por Palma *et al.* (2015) utilizando marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) que avaliou a estrutura genética contemporânea entre populações de *C. includens* de diferentes estados brasileiros.

Chrysodeixis includens tem sido considerada um dos principais lepidópteros-praga da soja desde os anos 90, ocorrendo com uma alta frequência e intensidade em diferentes locais no Brasil (Sosa-Gómez *et al.*, 2010; Rolim *et al.*, 2013; Sosa-Gómez and Omoto, 2013). É um inseto encontrado em todas as Américas, e apesar do seu alto grau de polifagia, ocorre como espécie praga com maior regularidade em cultivos de soja na América do Sul (Lafontaine and Poole, 1991; Kidd and Orr, 2001; Baldin *et al.*, 2014; Barrionuevo and San Blás, 2015; Formentini *et al.*, 2015; Palma *et al.*, 2015; Specht *et al.*, 2015).

Desse modo, o objetivo principal deste estudo foi aplicar uma abordagem filogeográfica de *C. includens* oriundos dos diferentes biomas brasileiros e de diferentes hospedeiros (soja, feijão e algodão). Para isso, nós sequenciamos dois genes mitocondriais, *Citocromo c Oxidase Subunidade I* (COI) e *Citocromo c Oxidase Subunidade II* (COII), com intuito de caracterizar possíveis linhagens genéticas maternas e estimar a diversidade genética,

os parâmetros demográficos e a estrutura populacional desse inseto-praga em diferentes agroecossistemas brasileiros.

2.2. Material & Métodos

2.2.1. Coleta de populações de *C. includens*

A espécie modelo para o estudo, *C. includens*, foi coletada em 16 locais divididos entre três biomas brasileiros (Floresta Atlântica, Cerrado e Caatinga) em cultivos de soja, algodão e utilizando armadilhas de feromônios em áreas de feijão nas safras 2016/2017 (Tabela 2.1). Nos pontos amostrais, foram coletadas larvas (aproximadamente 800 larvas) em cultivos de soja e algodão que foram mantidas em laboratório até a fase adulta. Os adultos de *C. includens* foram armazenadas individualmente em tubos de plásticos com capacidade para 1,5ml, contendo álcool absoluto (devidamente identificadas) e mantidas em refrigeração a -20°C até a extração de DNA, onde selecionamos alguns indivíduos para este estudo.

2.2.2. Extração de DNA, amplificação e sequenciamento das amostras de *C. includens*

A extração do DNA genômico total foi realizada pelo método baseado na lise celular por CTAB adaptado ao descrito por Black and Duteau (1997). Onde na ocasião o tecido do tórax foi isolado em tubos de plástico de 1,5ml, macerado com adição de nitrogênio líquido e adicionado a estes tubos 500ul de tampão CTAB, 2,0ul de β -mercaptoetanol e 10ul de proteinase K (10mg/ml), por amostra. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 2 horas, adicionado 3ul de RNase por amostra, agitada em vortex e incubada em banho-Maria por 3 horas. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 13000rpm por 5 minutos e a estas amostras foram acrescentando 500ul de CIA e centrifugada por 13000rpm por 20 minutos, removido o sobrenadante para um novo tubo, adicionado 500ul de CIA, agitado em vortex e novamente centrifugada por 13000rpm por 20 minutos. Após esta etapa, foi removido novamente o sobrenadante para um novo tubo, onde foi adicionado álcool isopropílico gelado e após over night em freezer, centrifugado por 30 minutos a 13000rpm, e realizada 2 lavagens no pellet com 500ul de etanol 100%, cada lavagem. Após seco, o pellet foi ressuspendido com 50ul de água milliQ autoclavada. A qualidade e quantidade do DNA foi verificada através de gel de agarose (0,8% w/v).

Após a extração do DNA, os fragmentos de dois genes mitocondriais, *Citocromo c Oxidase Subunidade I* (COI) e *Citocromo c Oxidase Subunidade II* (COII), foram amplificados por reação em cadeia da Polimerase (PCR). Para a amplificação de um fragmento de ≈ 520 pb de COI utilizamos o iniciador J1514 (5' - GGTCACAAATCATAAAGATATTGG - 3') e N2175 (5' - TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA - 3'). Para o fragmento de ≈ 700 pb de COII, utilizamos os iniciadores Patrick (5' - CTAATATGGCAGATTATATGTAATGGA - 3') e Eva (5' - GAGACCATTACTTGCTTTCGATCATCT - 3'). Todos os primers foram publicados anteriormente por (Simon *et al.*, 1994).

As amplificações via PCR foram realizadas em volume total de 25 μ L, contendo DNA (50ng/ μ L); água ultrapura; tampão (10X); MgCl₂ (25 mM); dNTP (2,5mM); iniciadores *forward* e *reverse* (5 pmols) e Taq DNA polimerase (5U/ μ L). O programa de PCR consistiu de um passo de desnaturação inicial, seguido por 35 ciclos de desnaturação, emparelhamento e polimerização, com um passo de extensão final. Seguinte à amplificação, as alíquotas foram inspecionadas visualmente por meio de eletroforese em gel de agarose (1,5% w/v). A preparação dos produtos de PCR para sequenciamento, foi seguida de purificação de cada amostra usando as enzimas exonuclease I (*EXO*) e fosfatase alcalina de camarão (*SAP*), seguindo as especificações do fabricante. Os produtos de PCR foram submetidos a sequenciamento de Sanger no Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP.

De posse dos resultados do sequenciamento, inicialmente comparamos as sequências de COI no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e assim foi possível confirmar a identificação molecular da espécie *C. includens*. Os cromatogramas das sequências de COI e COII foram inspecionados e editados para 522 pb (acesso NCBI: MK256487 - MK256546) e 697 pb (acesso NCBI: MK256547 - MK256606), respectivamente, utilizando o aplicativo Sequencher 4.0.1 (Gene Codes Corp., Ann Arbor, MI, EUA). Em seguida as sequências foram analisadas de maneira isoladas (COI e COII) e concatenadas.

2.2.3. Análise de dados

Para sequências de COI, COII e sequencias concatenadas (COI-COII), utilizando o aplicativo DnaSP ver. 5 (Librado and Rozas 2009), calculamos os parâmetros de diversidade de haplótipos (Hd), que estima a probabilidade de amostrarmos dois haplótipos do total e estes serem diferentes, e diversidade nucleotídica (π), que representa o número médio de diferenças entre duas sequências retiradas ao acaso da amostra total. Além disso, uma rede de haplótipos

foi gerada usando o programa PopART (Leigh and Bryant, 2015) para reconstruir as relações genealógicas entre os haplótipos COI, COII e ambos concatenados.

Para as análises de expansão demográfica e de estrutura genética, nós utilizamos apenas os dois genes concatenados devido as características do DNA mitocondrial de eventos raros de recombinação. A hipótese de expansão demográfica foi testada usando os testes de neutralidade D de Tajima e F_s de Fu no Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.* 2006). Ambos os testes usaram 1.000 amostras aleatórias, usando simulações coalescentes e a opção "Inferir à distância" para "Definição de haplótipo". O índice de *Raggedness* (Harpending, 1994) e a soma dos desvios quadrados (Sum of Squared Deviations – SSD) foram calculados no Arlequin 3.1, sendo utilizada para validar o modelo de expansão (Excoffier and Schneider, 1999). A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada utilizando o aplicativo Arlequin 3.1 (Excoffier *et al.* 2006) com bootstrapping paramétrico (1000 repetições) e significância ao nível de 5% para testar a estrutura genética entre as populações de *C. includens*.

Adicionalmente, nós coletamos sequências de COI de *C. includens* do Barcode of Life Data System - BOLD (<http://boldsystems.org/index.php>, acessado em 12 de junho de 2018) e juntamos às sequências aqui produzidas para testar a hipótese de expansão demográfica recente de *C. includens* em toda as Américas. Assim nosso conjunto de dados foi formado pelas sequências COI de *C. includens* do nosso trabalho ($n = 61$), mais sequências COI adicionais do Brasil ($n = 20$), Argentina ($n = 8$), Bolívia ($n = 1$), Costa Rica ($n = 38$), EUA ($n = 18$), Canadá ($n = 2$), México ($n = 3$) e Peru ($n = 3$). Posteriormente, nós caracterizamos os haplótipos usando o DnaSP ver. 5 (Librado and Rozas, 2009) e construímos uma rede de haplótipos utilizando o software PopART (Leigh and Bryant, 2015).

2.3. Resultados

Para cada local, dois a seis indivíduos foram sequenciados para os dois genes mitocondriais (COI e COII) totalizando 61 indivíduos de *C. includens* coletados no Brasil. A diversidade haplótípica e nucleotídica para os fragmentos do gene COI foram de $H_d = 0,096$ e $\pi = 0,00019$, respectivamente. A maior diversidade haplótípica e nucleotídica foi encontrada no Bioma Mata Atlântica ($H_d = 0,274$ e $\pi = 0,00055$) seguido pelo Bioma Cerrado ($H_d = 0,064$ e $\pi = 0,00012$) (Tabela 2.1).

Quando analisamos os fragmentos de COII, encontramos uma diversidade haplótípica de $H_d = 0,380$ e nucleotídica de $\pi = 0,00065$ (Tabela 2.2). Enquanto nos dois fragmentos concatenados obtivemos diversidade haplótípica e nucleotídica de $H_d = 0,455$ e $\pi = 0,00048$,

respectivamente (Tabela 2.3). No entanto, nas análises dos fragmentos de COII e em fragmentos concatenados, a maior diversidade haplotípica e nucleotídica foi encontrada no bioma Cerrado ($Hd = 0,498$ e $\pi = 0,00091$ (COII), $Hd = 0,621$ e $\pi = 0,00067$ (COI-COII)), seguido pela Mata Atlântica, $Hd = 0,494$ e $\pi = 0,00079$ (COII), $Hd = 0,505$ e $\pi = 0,00059$ (COI-COII). Em todas as análises o Bioma Caatinga apresentou diversidade nula, onde todos os locais de amostragem tinham um único haplótipo.

Tabela 2.1. Medidas de diversidade genética para *C. includens* com base nas sequências do gene mitocondrial COI.

Local (Cidade, Estado)	Código	Hospedeiro	Número de haplótipos mtDNA	Diversidade		Latitude (S)	Longitude (W)
				haplotípica (Hd)	Nucleotídica (π)		
Bioma Mata Atlântica							
Coxilha, RS	RSCO	Soja	H1(12), H3, H4	0.274	0.00055	28°10'54"	52°44'46"
Itapiranga, SC	SCIT	Soja	H1(3)	0.000	0.00000	27°8'43"	53°43'53"
Pitanga, PR	PRPI	Soja	H1(3)	0.000	0.00000	24°17'23"	52°34'16"
Casa Branca, SP	SPCB	Soja	H1(3), H3, H4	0.700	0.00153	21°43'34"	47°09'09"
Bioma Cerrado							
Araguari, MG	MGAR	Soja	H1(30), H2	0.064	0.00012		
Sete Lagoas, MG	MGSL	Soja	H1(5)	0.000	0.00000	18°59'23"	47°33'52"
Campo Grande, MS	MSCG	Soja	H1(3)	0.000	0.00000	19°27'51"	44°10'38"
Chapadão do Sul, MS	MSCS	Algodão	H1(5)	0.000	0.00000	20°42'31"	54°30'03"
Mineiros, GO	GOMI	Soja	H1(3)	0.000	0.00000	18°44'54"	52°35'44"
Campo Verde, MT	MTCV	Algodão	H1(6)	0.000	0.00000	17°37'43"	52°36'52"
Campo Verde, MT	MTCV	Soja	H1(3), H2	0.500	0.00096	15°36'40"	55°14'05"
Bioma Caatinga							
Correntina, BA	BACO	Soja	H1(5)	0.000	0.00000	15°25'34"	54°48'05"
Correntina, BA	BACO	Algodão	H1(16)	0.000	0.00000		
Junqueiro, AL	ALJU	Feijão	H1(3)	0.000	0.00000	11°49'21"	46°10'52"
Russas, CE	CERU	Feijão	H1(3)	0.000	0.00000	13°40'39"	45°41'21"
Teresina, PI	PITE	Feijão	H1(2)	0.000	0.00000	9°51'58"	36°25'29"
Todas as Localidades							
			H1(58), H2, H3, H4	0.096	0.00019	4°55'28"	38°00'14"
			H1(2)	0.000	0.00000	5°02'21"	42°47'22"

Tabela 2.2. Medidas de diversidade genética para *C. includens* com base nas sequências do gene mitocondrial COII.

Local (Cidade, Estado)	Código	Hospedeiro	Número de haplótipos mtDNA	Diversidade		Latitude (S)	Longitude (W)
				haplotípica (Hd)	Nucleotídica (π)		
Bioma Mata Atlântica							
Coxilha, RS	RSCO	Soja	H1(10), H2(2), H9, H10	0.494	0.00079	28°10'54"	52°44'46"
Itapiranga, SC	SCIT	Soja	H1(3)	0.000	0.00000	27°8'43"	53°43'53"
Pitanga, PR	PRPI	Soja	H1(2), H10	0.666	0.00096	24°17'23"	52°34'16"
Casa Branca, SP	SPCB	Soja	H1(4), H9	0.400	0.00057	21°43'34"	47°09'09"
Bioma Cerrado							
Araguari, MG	MGAR	Soja	H1(22), H2, H3, H4(2), H5, H6(2), H7, H8	0.498	0.00091		
Sete Lagoas, MG	MGSL	Soja	H1(3), H3, H4	0.700	0.00115	18°59'23"	47°33'52"
Campo Grande, MS	MSCG	Soja	H1(3)	0.000	0.00000	19°27'51"	44°10'38"
Chapadão do Sul, MS	MSCS	Algodão	H1(4), H8	0.400	0.00057	20°42'31"	54°30'03"
Mineiros, GO	GOMI	Soja	H1(2), H7	0.666	0.00191	18°44'54"	52°35'44"
Campo Verde, MT	MTCV	Algodão	H1(5), H2	0.333	0.00048	17°37'43"	52°36'52"
Campo Verde, MT	MTCV	Algodão	H1(3), H4	0.500	0.00072	15°36'40"	55°14'05"
Campo Verde, MT	MTCV	Soja	H1(2), H5, H6(2)	0.800	0.00143	15°25'34"	54°48'05"
Bioma Caatinga							
Correntina, BA	BACO	Soja	H1(16)	0.000	0.00000	11°49'21"	46°10'52"
Correntina, BA	BACO	Algodão	H1(3)	0.000	0.00000	13°40'39"	45°41'21"
Junqueiro, AL	ALJU	Feijão	H1(2)	0.000	0.00000	9°51'58"	36°25'29"
Russas, CE	CERU	Feijão	H1(6)	0.000	0.00000	4°55'28"	38°00'14"
Teresina, PI	PITE	Feijão	H1(2)	0.000	0.00000	5°02'21"	42°47'22"
Todas as Localidades							
			H1(48), H2(3), H3, H4(2), H5, H6(2), H7, H8, H9, H10	0.380	0.00065		

Tabela 2.3. Medidas de diversidade genética para *C. inclusans* com base nas sequências concatenadas dos genes mitocondriais COI-COII.

Local (Cidade, Estado)	Código	Hospedeiro	Número de haplótipos mtDNA	Diversidade		Latitude (S)	Longitude (W)
				haplotípica (Hd)	Nucleotídica (π)		
Bioma Mata Atlântica			H1(10), H2, H10, H11, H12	0.505	0.00059		
Coxilha, RS	RSCO	Soja	H1(3)	0.000	0.00000	28°10'54"	52°44'46"
Itapiranga, SC	SCIT	Soja	H1(2), H2	0.666	0.00055	27°8'43"	53°43'53"
Pitanga, PR	PRPI	Soja	H1(2), H12	0.666	0.00055	24°17'23"	52°34'16"
Casa Branca, SP	SPCB	Soja	H1(3), H10, H11	0.700	0.00098	21°43'34"	47°09'09"
Bioma Cerrado			H1(19), H2(2), H3(3), H4, H5, H6, H7(2), H8, H9	0.621	0.00067		
Araguari, MG	MGAR	Soja	H1(3), H3, H4	0.700	0.00066	18°59'23"	47°33'52"
Sete Lagoas, MG	MGSL	Soja	H1(2), H3	0.666	0.00055	19°27'51"	44°10'38"
Campo Grande, MS	MSCG	Soja	H1(4), H9	0.400	0.00033	20°42'31"	54°30'03"
Chapadão do Sul, MS	MSCS	Algodão	H1, H2, H8	1.000	0.00164	18°44'54"	52°35'44"
Mineiros, GO	GOMI	Soja	H1(5), H2	0.333	0.00027	17°37'43"	52°36'52"
Campo Verde, MT	MTCV	Algodão	H1(2), H3, H5	0.833	0.00082	15°36'40"	55°14'05"
Campo Verde, MT	MTCV	Soja	H1(2), H6, H7(2)	0.800	0.00082	15°25'34"	54°48'05"
Bioma Caatinga			H1 (16)	0.000	0.00000		
Correntina, BA	BACO	Soja	H1(3)	0.000	0.00000	11°49'21"	46°10'52"
Correntina, BA	BACO	Algodão	H1(3)	0.000	0.00000	13°40'39"	45°41'21"
Junqueiro, AL	ALJU	Feijão	H1(2)	0.000	0.00000	9°51'58"	36°25'29"
Russas, CE	CERU	Feijão	H1(6)	0.000	0.00000	4°55'28"	38°00'14"
Teresina, PI	PITE	Feijão	H1(2)	0.000	0.00000	5°02'21"	42°47'22"
Todas as Localidades			H1(45), H2(3), H3(3), H4, H5, H6, H7(2), H8, H9, H10, H11, H12	0.455	0.00048		

As sequências do gene *Citocromo c Oxidase subunidade I* (COI) geraram 4 haplótipos, onde o haplótipo H1 foi recuperado em 95% dos indivíduos, apresentando ampla distribuição, com presença em todos os locais de amostra. Enquanto os haplótipos H2, H3 e H4 apresentaram baixa frequência e ocorreram apenas uma vez em nosso conjunto de dados (*singletons*) (Figura 2.1).

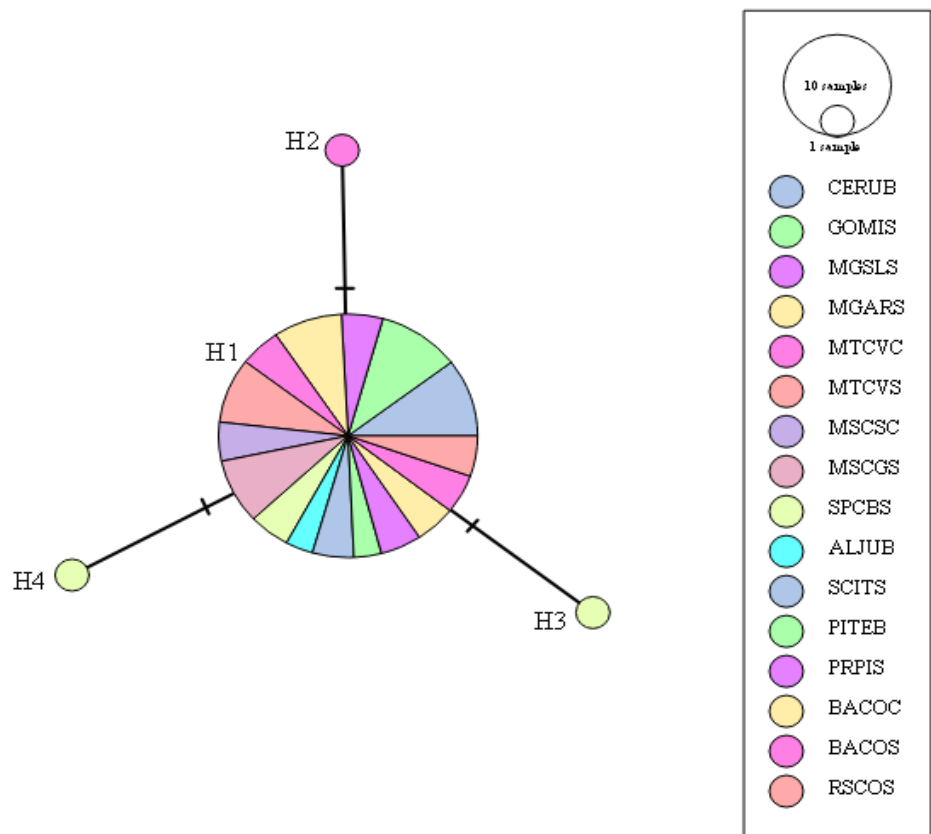


Figura 2.1. Rede de haplótipos de mtDNA de *C. includens* com base em um fragmento de 522 pb do gene COI. O tamanho do círculo é proporcional à frequência do haplótipo na população amostrada (legenda ao lado). As marcas de hachura representam o número de etapas de mutação que separam dois haplótipos e as cores indicam a origem das sequências.

Nas análises do gene *Citocromo c Oxidase subunidade II* (COII), foram gerados 10 haplótipos com constituição parecida ao COI, onde o haplótipo H1 apresentou maior frequência em todos os locais amostrados, sendo recuperado em 78,7% dos indivíduos. Seis haplótipos eram singletons enquanto três haplótipos (H2, H4 e H6) apresentaram baixa frequência, com presença apenas nos biomas Mata Atlântica e Cerrado (Figura 2.2).

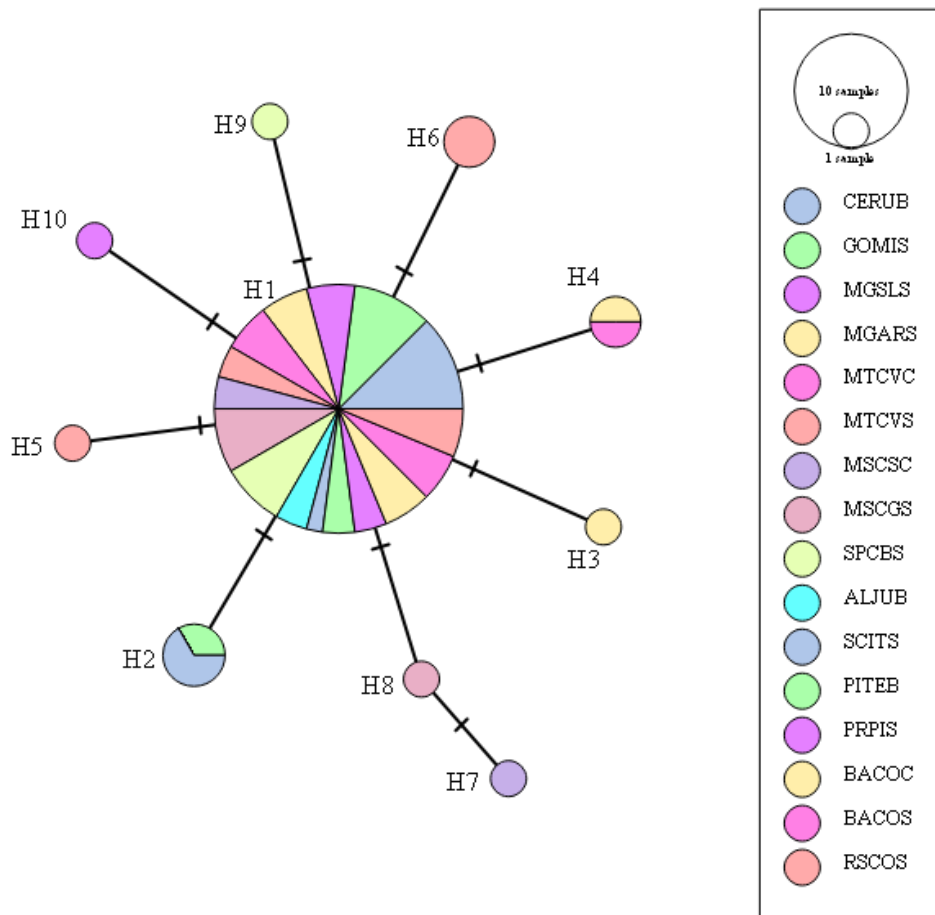


Figura 2.2. Rede de haplótipos de mtDNA de *C. includens* com base em um fragmento de 697 pb do gene COII. O tamanho do círculo é proporcional à frequência do haplótipo na população amostrada (legenda ao lado). As marcas de hachura representam o número de etapas de mutação que separam dois haplótipos e as cores indicam a origem das sequências.

Ao analisar os dois fragmentos (COI-COII) concatenados, encontramos 12 haplótipos seguindo a mesma constituição dos genes separados. A maior frequência apresentada pelo haplótipo H1 foi recuperada em 73,8% dos indivíduos, e apresentou grande distribuição, com presença em todos os locais amostrados. Oito haplótipos eram singletons e três haplótipos de baixa frequência (H2, H3 e H7) foram majoritariamente encontrados no bioma Cerrado (Figura 2.3).

As três redes mitocondriais apresentaram uma topologia com formato de estrela, ou seja, um haplótipo central com alta frequência e com ampla distribuição geográfica (haplótipo H1), e haplótipos adicionais em baixas frequências, conectados ao haplótipo central por um único evento de mutação.

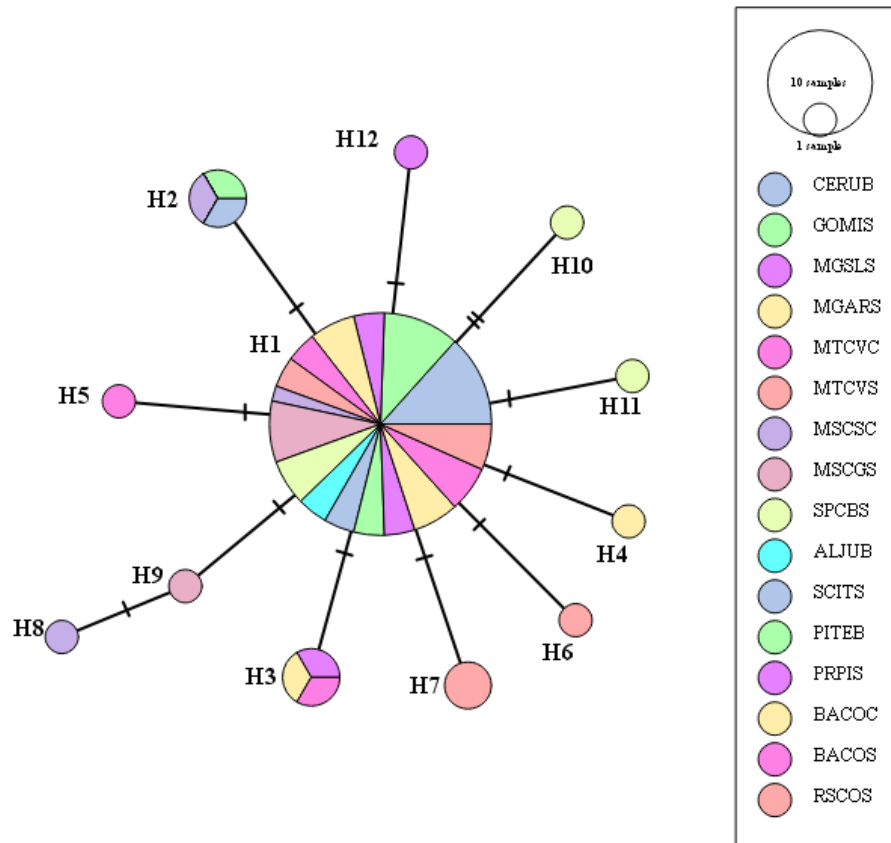


Figura 2.3. Rede de haplótipos de mtDNA de *C. includens* com base em um fragmento de 1219 pb dos genes COI e COII concatenados. O tamanho do círculo é proporcional à frequência do haplótipo na população amostrada (legenda ao lado). As marcas de hachura representam o número de etapas de mutação que separam dois haplótipos e as cores indicam a origem das sequências.

Os testes de neutralidade apresentaram valores negativos de D de Tajima ($D = -2,21$; $p < 0,001$) e F_u 's F_s ($F_s = -12,16$; $p < 0,001$) para os dois fragmentos concatenados, indicando uma expansão demográfica sob evento recente de *C. includens* no Brasil. Tanto a análise de distribuição de incompatibilidade usando modelo de expansão espacial (SSD) ($SSD = 0,0002$; $p = 0,60$), quanto o índice de *Raggedness* ($Raggedness = 0,1090$, $p = 0,60$), resultaram em um ($P > 0,05$), corroborando com os resultados de expansão demográfica recente, apresentados pelos testes de neutralidade.

A análise de variância molecular (AMOVA) com os genes concatenados sugeriu uma falta de estrutura genética das populações de *C. includens* amostradas (Tabela 2.4). Em outras palavras, as diferenças dentro das populações foram responsáveis por quase toda a variação genética de *C. includens* no Brasil $0,28\%$; $\Phi_{ST} = 0,019$ (Tabela 2.4).

Tabela 2.4. Análise da variância molecular (AMOVA) para a estrutura genética de populações de *C. includens* (Lepidoptera: Noctuidae) do Brasil com base nas sequências de fragmentos de genes concatenados do *Citocromo c Oxidase Subunidade I* (COI) e do *Citocromo c Oxidase Subunidade II* (COII).

Fontes de Variação	d.f.	Componentes de Variação	Variação Percentual	Índice de fixação (p-value)
Entre Populações	14	0,00553	1,90	$\Phi_{ST} = 0,019$
Dentro das populações	46	0,28551	98,10	
Total	60	0,29104		

A análise conjunta todas as nossas sequências de COI junto as sequencias das Américas de *C. includens* extraídas do banco de dados, confirmou a baixa diversidade haplotípica de *C. includens* em todo o continente. Foi constatada a presença de apenas 14 haplótipos sendo o haplótipo H1 o mais frequente encontrado em 92,8% dos indivíduos analisados (Tabela 2.5). A rede de haplótipo também demonstrou uma topologia com formato de estrela, ou seja, um haplótipo central com alta frequência e com ampla distribuição geográfica (haplótipo H1) e 13 haplótipos adicionais em baixas frequências, conectados ao haplótipo central por um único evento de mutação (Figura 2.4).

Tabela 2.5. Número de haplótipos de *C. includens* (Lepidoptera: Noctuidae) coletados no GenBank em oito países diferentes do continente americano com base em um fragmento de 522 pb do gene COI. A frequência de cada haplótipo entre as amostras (n > 1) é dada entre parênteses.

Local	Haplotipos (n)*	Número do BOLD
Argentina	H1(7), H2	ARMOT129-12; ARMOT187-12; ECPD519-14; LEPPA1129-14; LEPPA1141-14; MOTAR192-12; MOTAR197-12; MOTAR206-12
Brazil	H1(74), H3, H4, H5, H6, H7	GBGL12665-13; GBGL12666-13; GBGL12667-13; GBGL12668-13; GBGL12669-13; GBGL12670-13; GBGL12672-13; GBGL12673-13; GBGL12674-13; GBGL12675-13; GBGL12676-13; LEMMZ135-10; LEMMZ136-10; LEMMZ137-10; LEMMZ138-10; LEMMZ374-10; LEMMZ375-10;
Bolivia	H1	NOCJB053-08
Peru	H1(3)	LNAUP106-13; LNAUP107-13; NOCJB052-08
Costa Rica	H1(59), H8, H9, H10, H11	BLPAA312-06; BLPAA727-06; BLPAA848-06; BLPAB056-06; BLPAB057-06; BLPAB093-06; BLPAF765-07; BLPAF924-07; BLPCC493-08; BLPCC493-08; BLPCD637-08; BLPDK1887-09; BLPDU205-11; BLPDU206-11; BLPDU207-11; BLPDU520-11; BLPDU802-11; BLPDV008-11; BLPDV009-11; LOCRA264-06; MHAUB696-05; MHAUB697-05; MHAUB698-05; MHAUB699-05; MHAUB700-05; MHAUB701-05; MHAUB702-05; MHAUB703-05; MHAUB704-05; MHAUB705-05; MHAUG100-07; MHAUG678-07; MHAUG679-07; MHAUG680-07; MHAUG681-07; MHAUG682-07; MHAUG683-07; MHMXA782-06; MHMXA818-06; MHMXE344-06; MHMXI418-07; MHMXM101-07; MHMXM170-07; MHMXM171-07; MHMXM172-07; MHMXM173-07; MHMXM174-07; MHMXM175-07; MHMYC2167-09; MHMYH812-10; MHMYH813-10; MHMYL3084-11; MHMYL3269-11; MHMYL3281-11; MHMYL3282-11; MHMYL3283-11; MHMYL3411-11; MHMYL3504-11; MHMYM006-11; MHMYM085-11; MHMYM140-11; MHMYO207-11;
México	H1(2)	GMMAH010-15; GMMCS002-15; LPYPB275-08
USA	H1(19), H12, H13	LGSMG611-07; LGSMG612-07; LGSMG613-07; LILLA916-11; LILLA958-11; LILLB064-11; LNC849-06; LNCB071-06; LOCBF3743-14; LOCBF4241-14; LOCBF4242-14; LOFLB770-06; LPOKA1032-09; LPOKA343-08; LPOKA567-09; LPOKA628-09; LPOKA661-09; LPOKD407-09; LPOKD427-09; LPOKD432-09; LPOKD449-09;
Canadá	H1(4), H14	RDLQ426-07; SMTPO4162-15; SMTPR191-16; SMTPR7089-16; XAB463-04; XAH608-05;

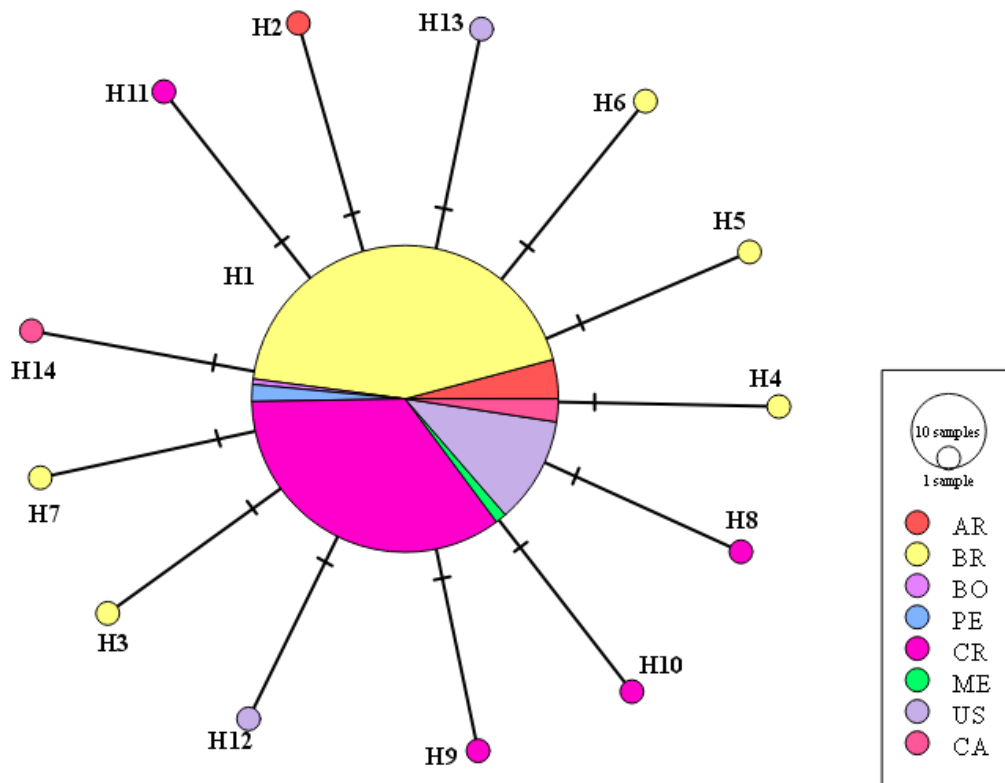


Figura 2.4. Rede de haplótipos de mtDNA de *C. includens* com base em um fragmento de 520 pb do gene COI. O tamanho do círculo é proporcional à frequência do haplótipo na população amostrada (legenda ao lado). As marcas de hachura representam o número de etapas de mutação que separam dois haplótipos e as cores indicam a origem das sequências. Argentina (AR), Brasil (BR), Bolívia (BR), Peru (PE), Costa Rica (CR), México (ME), Estados Unidos (USA), e Canadá (CA).

2.4. Discussão

Aqui aplicamos uma abordagem filogeográfica para entender a dinâmica populacional histórica de *C. includens* no território brasileiro. Para isso, nós utilizamos o sequenciamento de fragmentos de dois genes mitocondriais, COI e COII, reconhecidamente úteis para esse tipo de inferência. Ao analisar o fragmento do gene mitocondrial COI, nós encontramos uma baixa diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica de *C. includens* em todas as localidades amostradas. Essa diversidade, apesar de ser também muito baixa, foi 3x maior quando analisamos o fragmento do gene COII. Os dois genes concatenados geraram 12 haplótipos mitocondriais para *C. includens*, sendo o haplótipo H1 presente em 45 indivíduos que correspondem a aproximadamente 74% dos indivíduos amostrados. Essa baixa diversidade foi surpreendente e não é comumente relatada em estudos filogeográficos com outros lepidópteros-praga nativos na América do Sul (Albernaz *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2014; Arias

et al., 2019). A excessão encontrada na literatura é para a traça-do-tomateiro, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae), que recentemente invadiou o continente Europeu, Asiático e Africano, onde estudos filogeográficos revelaram um único haplótipo mitocondrial para o gene Citocromo c Oxidase Subunidade I em todo o território brasileiro (Desneux *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2018).

Essa baixa diversidade de *C. includens* gerou uma rede de haplótipo com a formato estrela para os dois genes e para os mesmos concatenados, o que representa uma composição bastante simplificada, onde um único haplótipo central liga todos os demais haplótipos por uma única ou poucas mutações nucleotídicas (Avice, 2000). Esse formato de rede de haplótipo sugere uma recente expansão populacional e demográfica de *C. includens* no território brasileiro, também sugerido pelos valores negativos e significativos dos testes de neutralidade D de Tajima e Fs de Fu (Tajima, 1989; Fu, 1997). Alternativamente, esse padrão de diversidade, a relação genética entre haplótipos e os testes de neutralidade também poderiam indicar recentes eventos de seleção purificadora nas populações de *C. includens* no Brasil. No entanto, esse padrão foi observado utilizado-se genes de evolução neutra que são fracamente afetados por eventos de seleção comuns no ambiente agrícola como aplicação de inseticidas ou adaptação a hospedeiros em uma curta amplitude de tempo.

A análise de *Mismatch Distribution* (SSD e Ragdness index) apontaram uma recente expansão espacial de *C. includens* no território brasileiro, apesar de ser uma espécie nativa do continente Americano. Provavelmente, isso se deve a expansão de cultivos agrícolas em todo território brasileiro e mais recentemente para todo o bioma Cerrado e partes do Bioma Amazônico. Com destaque para a cultura da soja que recentemente alcançou 35 milhões de hectares plantados em todas as regiões brasileiras e com expansão contínua em toda a América do Sul, substituindo ambientes nativos por áreas agrícolas. Isso tem criado um ambiente propício para o aumento no número efetivo de mariposas, e a expansão populacional demográfica e espacial de *C. includens* no Brasil aqui reportadas.

Também observamos uma ausência de estrutura genética nas populações de *C. includens* no Brasil. A ausência de estrutura genética para *C. includens*, também foi observado com marcadores nuclares, produzidos pela técnica de ISSR, no estudo desenvolvido por Palma *et al.* (2015). A ausência de estrutura genética utilizando marcadores nucleares foi justificada no trabalho de Palma *et al.* (2015) pelo alto fluxo gênico entre as populações de *C. includens* no Brasil. Apesar de não podermos descartar completamente o alto fluxo gênico entre as populações de *C. includens*, uma estrutura genética panmítica não é esperada em populações nativas de uma espécie, visto que, acasalamento entre indivíduos mais próximos

geograficamente são esperados permitindo a fixação de alelos em diferentes regiões. Assim, nossa hipótese de recente expansão populacional parece ser mais plausível e a falta de estrutura seria dada principalmente pelo curto período de tempo, após a expansão populacional e espacial, para fixação de alelos em diferentes regiões geográficas brasileiras, seja por ação de seleção ou por deriva genética (Gonçalves *et al.*, 2019).

Recente expansão populacional e falta de estrutura genética utilizando marcadores mitocondriais foram também reportadas em outros lepidópteros-praga no Brasil (Albernaz *et al.*, 2012; Leite *et al.*, 2014; Pantoja-Gomez *et al.*, 2019; Arias *et al.*, 2019). Esse padrão comum relatado para essas espécies pode ser justificado (i) pela recente expansão territorial da agricultura brasileira em todas as regiões do país, aumentando a disponibilidade de recurso e consequentemente o tamanho populacional da espécie, (ii) a grande capacidade de dispersão desses insetos e (iii) eventos de colonização e recolonização de áreas agrícolas seguindo o calendário de plantio das culturas. No caso específico de *C. includens*, não podemos deixar de destacar a cultura da soja, um ótimo hospedeiro para a espécie, que ocupa grandes extensões territoriais do sul ao norte da América do Sul.

2.5. Considerações Finais

Nosso estudo teve sucesso em sequenciar dois genes mitocôndrias de populações de *C. includens* oriundas de diferentes regiões brasileiras. Os genes mitocôndrias apontaram uma baixa diversidade genética de *C. includens* em todas as regiões brasileiras. Além disso, nossa abordagem filogeográfica apontou uma recente expansão populacional demográfica e espacial e consequente falta de estrutura genética espacial de *C. includens* no Brasil. A baixa diversidade genética e a homogeneidade entre as populações de *C. includens* devido a recente expansão populacional traz um cenário nebuloso sobre a adaptação desses insetos em diferentes regiões brasileiras, uma vez, que não conseguimos prever quais alelos serão fixados e a capacidade adaptativa da espécie em um cenário de ampla expansão de cultivos agrícolas no território brasileiro.

Referências

- Albernaz, K.C., Silva-Brandão, K.L., Fresia, P., Cônsoli, F.L., Omoto, C., 2012. Genetic variability and demographic history of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Brazil inferred by mtDNA sequences. *Bulletin of Entomological Research*. 102, 333-343.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I.G., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 290, 457-465.
- Arias, O., Cordeiro, E., Corrêa, A.S., Domingues, F.A., Guidolin, A.S., Omoto, C., 2019. Population genetic structure and demographic history of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): implications for insect resistance management programs. *Pest Management Science*, 75 (11), 2948-2957.
- Avise, J.C., 2000. *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press
- Baldin, E.L.L., Lourenção, A.L., Schlick-Souza, E.C., 2014. Outbreaks of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) in common bean and castor bean in São Paulo State, Brazil. *Bragantia*, 73(4), 458-465.
- Barrionuevo, M. J., San Blas, G., 2015. Redescription of immature stages of the soybean looper (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae). *The Canadian Entomologist*, 148(03), 247–259.
- Black, W. C., Duteau, N. M., 1997. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. In: Crampton, J. M., Beard, C. B., Louis, C. *The molecular biology of insect disease vectors: a methods manual*. London: Chapman & Hall. 361-373.
- Carvalho, G.A., Corrêa, S. A., Oliveria, L. O., Chediak, M., Siqueira, H. A., Guedes, R. N. C., 2018. Wolbachia strains, and lack of genetic diversity and parthenogenesis in Brazilian populations of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Applied Entomology*, 142, 905-910.
- Corrêa, A.S.; Vinson, C. C.; Braga, L.S.; Guedes, R.N.C.; Oliveira, L. O. 2017. Ancient origin and recent range expansion of the maize weevil *Sitophilus zeamais*, and its genealogical relationship to the rice weevil *S. oryzae*. *Bulletin of Entomological Research*, 107, 9-20.
- Desneux, N., Wajnberg, E., Wyckhuys, K.A.G., Burgio, G., Arpaia, S., Narváez-Vasquez, C. A., Gonzalez-Cabrera, J., Ruescas, D. C., Tabone, E., Frandon, J., Pizzol, J., Poncet, C., Cabello, T., Urbaneja, A., 2010. Biological invasion of European tomato crops by *Tuta*

- absoluta: ecology, geographic expansion and prospects for biological control. *Journal of Pest Science*, 83, 197- 215.
- Downie, D. A., 2002. Locating the sources of an invasive pest, grape phylloxera, using a mitochondrial DNA gene genealogy. *Molecular Ecology*, 11(10), 2013–2026.
- Emerson, B.C., Oromí, P., Hewitt, G.M., 1999. MtDNA phylogeography and recent intra-island diversification of Canary Island *Calathus* beetles (Carabidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 13, 149–158.
- Excoffier, L., Schneider, S., 1999. Why hunter-gatherer populations do not show signs of Pleistocene demographic expansions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(19), 10597–10602.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2006. ARLEQUIN. Ver 3.1. An integrated software package for population genetic data analysis. Computational and Molecular Population Genetic Lab, University of Bern, Bern, Switzerland.
- Formentini, A. C., Sosa-Gómez, D. R., Paula-Moraes, S. V., Barros, N. M., Specht, A., 2015. Lepidoptera (Insecta) associated with soybean in Argentina, Brazil, Chile and Uruguay. *Ciência Rural*, 45, 12, 2113-2120.
- Fu, Y.-X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147, 915-925
- Gonçalves, R. M., Mastrangelo, T., Rodrigues, J. C. V., Paulo, D. F., Omoto, C., Corrêa, A. S., De Azeredo-Espin, A. M. L., 2019. Invasion origin, rapid population expansion, and the lack of genetic structure of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) in the Americas. *Ecology and Evolution*, 9, 7378-7401.
- Harpending, H., 1994. Infertility and forager demography. *American Journal of Physical Anthropology*, 93(3), 385–390.
- Kidd, K.A., Orr, D.B., 2001. Comparative feeding and development of *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) on kudzu and soybean foliage. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94, 219-225.
- Lafontaine, J.D., Poole, R.W., 1991. Noctuoidea (part): Plusiinae. In: Hodges, R.W., Davis, D.R., Dominic, T., Ferguson, D.C., Franclemont, J.G., Munroe, E.G., Powell, J.A. (Eds.), *The Moths of America North of Mexico*, fasc.25.1. Allen Press Lawrence. 1–182.
- Leigh, J.W., Bryant, D., 2015. PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6(9):1110–1116.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25, 1451-1452.

- Martel, C., Réjasse, A., Rousset, F., Bethenod, M. T., Bourguet, D., 2003. Host plant associated genetic differentiation in Northern French populations of the European corn borer. *Heredity*, London, 90. 141-149.
- Leite, N.A., Alves-Pereira, A., Corrêa, A.S., Zucchi, M.I., Omoto, C., 2014. Demographics and Genetic Variability of the New World Bollworm (*Helicoverpa zea*) and the Old World Bollworm (*Helicoverpa armigera*) in Brazil. *PLoS ONE* 9, e113286.
- Librado, P. and Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452.
- Oliveira, M. R. C., Corrêa, A. S., Souza, G. A., Guedes, R. N. C., Oliveira, L. O., 2013. Mesoamerican Origin and Pre- and Post-Columbian Expansions of the Ranges of *Acanthoscelides obtectus* Say, a Cosmopolitan Insect Pest of the Common Bean. *PLoS One*, 8, e70039.
- Palma, J., Maebe, K., Guedes, J. V. C. G., Smagghe, G., 2015. Molecular Variability and Genetic Structure of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae), an Important Soybean Defoliator in Brazil. *Plos One* 10, 1371.
- Pantoja-Gomez, L. M., Corrêa, A. S., de Oliveira, L. O., & Guedes, R. N. C., 2019. Common Origin of Brazilian and Colombian Populations of the Neotropical Coffee Leaf Miner, *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). *Journal of Economic Entomology*, 112 (2), 924-931.
- Roderick, G. K., 1996. Geographic structure of insect populations: Gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual Review of Entomology*, 41, 325-352.
- Rolim, A.A.S.G., Yano, S.A.C., Specht, A., Andrade, C.G.T.D.J., Sosa-Gómez, D.R. 2013. Morphological and molecular characterization of the eggs of some noctuid species associated with soybean in Brazil. *Annual Entomological Society America*, 106, 643–651.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994. Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87, 651–701.
- Soares, P. L., Cordeiro, E. M. G., Santos, F. N. S., Omoto, C., Correa, A. S., 2018. The reunion of two lineages of the Neotropical brown stink bug on soybean lands in the heart of Brazil. *Scientific Reports* 8, 2496.
- Sosa-Gómez, D.R., Corrêa-Ferreira, B.S., Hoffmann-Campo, C.B., Corso, I.C., Oliveira, L.J., Moscardi, F., Panizzi, A.R., Bueno, A. F., Hirose, E., 2010. Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja. Londrina: Embrapa-CNPSO. 90.

- Sosa-Gómez, D.R., Omoto, C., 2013. Resistência a inseticidas e outros agentes de controle em artrópodes associados à cultura da soja. In: Hoffmann Campo, C.B., Corrêa-Ferreira, B.S., Moscardi, F. (Eds.), Soja: Manejo Integrado de Insetos e outros Artrópodes-praga, Embrapa, Brasília. 673-723.
- Specht, A., Paula-Moraes, S.V., Sosa-Gómez, D.R., 2015. Host plants of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae, Plusiinae). Revista Brasileira de Entomologia. 59, 343–345.
- Tajima, F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123:585-595.

3. ESTRUTURA GENÉTICA E FLUXO GÊNICO DE *Chrysodeixis includens* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) INFERIDA POR MARCADORES SNPS NO BRASIL

*Dados publicados junto ao manuscrito: C.S. Silva; E.M.G. Cordeiro; J.B. Paiva; P.M. Dourado; R.A. Carvalho; G. Head; S. Martinelli; A.S. Correa. Population expansion and genomic adaptation to agricultural environments of the soybean looper, *Chrysodeixis includens*. *EVOLUTIONARY APPLICATIONS*. 2020

RESUMO

Atualmente a utilização de marcadores moleculares possibilita a investigação da dinâmica de populações de insetos em condições de campo, revelando mudanças sutis nos padrões adaptativos das espécies. *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) é uma espécie praga de grande importância para o agronegócio brasileiro, no entanto, pouco se sabe sobre os processos adaptativos em andamento e sua relação com a dinâmica populacional desta espécie e os seus surtos populacionais. Dessa forma, nós utilizamos uma abordagem genômica para produzir um grande número de marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) e assim investigar a dinâmica populacional contemporânea e os eventos adaptativos de *C. includens* em áreas cultivadas no Brasil. Nós coletamos insetos em 12 locais no Brasil com foco em dois diferentes hospedeiros, soja e algodão, e aplicamos a técnica Genotyping by Sequencing para obter 3.503 SNPs. Encontramos uma baixa variação na diversidade nucleotídica ($\pi = 0,234-0,256$), na heterozigosidade observada ($H_O = 0,167-0,185$) e no coeficiente de endogamia ($F_{IS} = 0,162$ a $0,251$) entre as populações de *C. includens*. A análise de EBSP confirma uma recente expansão demográfica com início datado em ~ 300 anos. O F_{ST} par-a-par indica baixa estruturação populacional, com inicial isolamento por distância ($r = 0,30$; $p = 0,06$). No entanto, o resultado mais impactante foi a significativa, apesar de também inicial, estruturação por hospedeiro para *C. includens* coletadas em soja e algodão nas regiões da BA e MT. O aplicativo LOSITAN produziu 109 loci candidatos sob seleção positiva quando avaliamos todas as populações, dos quais podemos destacar genes associados ao metabolismo digestivo e resistência a pesticidas e plantas geneticamente modificadas para expressar a proteína Bt. Nossos resultados apontaram para uma recente expansão demográfica e uma fraca estrutura genética geográfica de *C. includens*. No entanto, uma consistente estruturação por hospedeiro foi observada. Por fim, o avanço e a intensificação dos cultivos agrícolas tem promovido seleção de alelos em populações de *C. includens* associados a herbívoros, defesa contra patógenos e supostamente resistência a agroquímicos e plantas Bt. Compreender como os processos adaptativos moldam a trajetória evolutiva das populações de pragas dificilmente impedirá a transformação contínua das populações naturais, mas pode nos guiar na busca por melhores ferramentas de monitoramento e manejo de pragas em sistemas agrícolas tropicais.

Palavras-chave: Falsa-medideira-da-soja; SNPs; Estrutura genética; Adaptação a hospedeiro

**Genetic structure and gene flow of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae)
inferred by SNPs markers in Brazil**

*Data published in the manuscript: C.S. Silva; E.M.G. Cordeiro; J.B. Paiva; P.M. Dourado; R.A. Carvalho; G. Head; S. Martinelli; A.S. Correa. Population expansion and genomic adaptation to agricultural environments of the soybean looper, *Chrysodeixis includens*. EVOLUTIONARY APPLICATIONS. 2020

ABSTRACT

Currently, the use of molecular markers enabled the investigation of insect populations' dynamics in field conditions, revealing subtle changes in the adaptive patterns of species. *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) is a pest species of great importance for Brazilian agriculture. However, we do not know about the adaptive processes and its relationship with the population dynamics and population outbreaks of this species. Here, we use a genomic approach to produce a large number of SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) markers and, thus, we investigated the contemporary population dynamics and adaptive events of *C. includens* in cultivated areas in Brazil. We collected insects from 12 sites in Brazil with a focus on two different hosts, soybean and cotton, and applied the Genotyping by Sequencing tool to obtain 3.503 SNPs. We found low variation in nucleotide diversity ($\pi = 0.234-0.256$), observed heterozygosity ($H_o = 0.167-0.185$), and inbreeding coefficient ($F_{IS} = 0.162$ to 0.251) among the populations of *C. includens*. The EBSP analysis confirmed a recent demographic expansion of *C. includens* dated to ~ 300 years. The paired F_{ST} indicates low population structure, with initial isolation by distance ($r = 0.30$, $p = 0.06$). However, the most striking result was the significant, although initial, structuring by host for *C. includens* larvae collected in soybean and cotton crops from BA and MT regions. The LOSITAN software produced 109 candidate loci under positive selection when we evaluated all populations, of which we can highlight genes associated with digestive metabolism, resistance to pesticides and plants genetically modified to express the *Bt* protein. The results pointed to a recent demographic expansion and a weak geographical genetic structure of *C. includens*. However, consistent structuring by the host was observed. Finally, the advance and intensification of agricultural crops have promoted the selection of alleles in populations of *C. includens* associated with herbivores, defense against pathogens and pesticide and *Bt* plants resistance. Understanding how adaptive processes shape the evolutionary trajectory of pest populations will hardly prevent the continuous transformation of natural populations, but it can guide us in the search for better pest monitoring and management tools in tropical agricultural systems.

Keywords: Soybean looper; SNPs; Genetic structure; Host adaptaton

3.1. Introdução

Conseguir identificar mudanças demográficas, fluxo gênico e mudanças adaptativas em populações de insetos, pode ajudar a entender a dinâmica histórica e atual dos surtos populacionais de uma praga (Lu *et al.*, 2010; Corrêa *et al.*, 2019). Nos agroecossistemas, mudanças na dinâmica ecológica e populacional das espécies pragas são rapidamente percebidas, entretanto os reflexos dessas dinâmicas nos parâmetros evolutivos são dificilmente quantificados e caracterizados, o que poderia ajudar a prever surtos futuros de pragas agrícolas (Altieri, 1999; Cavender- Bares *et al.*, 2009).

Em países como o Brasil, onde nos últimos 50 anos a agricultura sofreu forte expansão e intensificação em áreas anteriormente ocupadas por vegetação natural, causando inúmeras transformações nesse ambiente, os cenários de mudanças ecológicas e evolutivas podem ser muito complexos (Arvor *et al.*, 2012). O panorama atual é de homogeneidade agrícola com a utilização de variedades de culturas precoces e em grandes escalas territoriais possibilitando até três safras em um único ano agrícola. Esse cenário oferece para muitas espécies de insetos-praga uma sucessão de hospedeiros adequados em grande escala, causando rápida evolução de características como a expansão do número de espécies de hospedeiros, adaptação a fatores abióticos e resistência a inseticidas e plantas geneticamente modificadas (Andrade *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2017).

No entanto, surtos populacionais nem sempre vêm das mudanças da paisagem agrícola, fatores como eventos filogenéticos recentes, fluxo gênico e deriva genética também podem dificultar a detecção de sinais precoces de adaptação local. O fluxo gênico, por exemplo, é uma forte força de combate à deriva genética e à seleção natural (Slatkin, 1987). Enquanto a seleção direcional muda rapidamente as frequências alélicas médias para a adaptação local, o fluxo gênico tem o efeito oposto e muda continuamente as frequências alélicas da população para níveis abaixo do ideal (Lenormand, 2002).

A falsa-medideira-da-soja, *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidae: Plusiinae), em décadas anteriores ao século XXI, era descrita como uma praga de pequena importância no território brasileiro, visto que poucas vezes atingia os níveis de dano econômico e de controle nas culturas agrícolas (Guedes *et al.*, 2011; Moscardi *et al.*, 2012). No entanto, nas últimas décadas esta praga tem ganhado destaque nas culturas da soja, algodão, feijão e em algumas olerícolas por ser relatada em elevados níveis populacionais tornando-se uma grande preocupação para os produtores em muitas regiões produtoras do país (Moscardi *et al.*, 2012; Specht *et al.*, 2015). Esse aumento populacional constantemente é associado com a

expansão do cultivo da soja para regiões centrais e norte do Brasil, impacto negativo de defensivos químicos sobre inimigos naturais, as recentes mudanças climáticas e a melhoria da adaptação de *C. includens* a cultivos de soja e algodão (Burleiger, 1972; Porter *et al.* 1991; Spehar, 1995; Camargo, 2001; Sosa-Gomez *et al.*, 2003; Bueno *et al.* 2013; Panizzi, 2013).

Chrysodeixis includens é conhecida como uma espécie altamente polífaga, mas ainda há pouca ou nenhuma informação sobre a história de sua ocupação e expansão na América do Sul e no restante do continente Americano (Herzog, 1980; Alford and Hammond, 1982; Specht *et al.*, 2015). Assim, as rotas de dispersão histórica e a atual dinâmica de migração/dispersão e o fluxo gênico sobre as populações desse inseto-praga não são completamente conhecidas. Palma *et al.* (2015), em estudos utilizando marcadores ISSR reportam falta de estrutura e amplo fluxo gênico entre populações dessa praga no Brasil. No entanto, pouco se sabe sobre os processos adaptativos em andamento e sua relação com a dinâmica populacional de *C. includens* e os seus surtos populacionais em diversas áreas agrícolas no Brasil. Dessa forma, nós utilizamos uma abordagem de genoma reduzido utilizando a técnica de GBS (Genotyping by Sequencing) para produzir um grande número de marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) e assim investigar a dinâmica populacional contemporânea e os eventos adaptativos de *C. includens* em áreas cultivadas no Brasil.

Nossos objetivos específicos foram: (1) Avaliar a diversidade genética, os eventos de expansão populacional e mensurar a estruturação das populações de *C. includens* em importantes áreas agrícolas do Brasil; e (2) testar se eventos de seleção estão ocorrendo em diferentes regiões e em diferentes cultivos de soja e algodão no Brasil.

3.2. Material & Métodos

3.2.1. Coleta e extração de DNA de *C. includens*

Os exemplares de *C. includens* foram coletados em doze regiões produtoras de feijão, soja e algodão no Brasil durante a safra 2016-2017 (Tabela 3.1). As coletas foram realizadas de duas formas: buscas ativas de larvas (coletadas aproximadamente 800 larvas por local amostrado) ou utilizando armadilhas de feromônio para captura de insetos adultos. Quando coletadas na fase larval, estas foram mantidas até ao estágio adulto em condições de laboratório, onde 30 insetos foram individualizados em tubos com capacidade para 1,5 ml contendo álcool absoluto e armazenados a -20°C até o processamento das amostras.

A extração do DNA dos insetos foi realizada usando o protocolo de extração de CTAB (2%) adaptado (Black and Duteau, 1997). O controle de qualidade da extração de DNA foi

realizado pela inspeção visual em gel de agarose (0,8% p/v), seguida pelos métodos espectrofotométrico e fluorométrico. As amostras foram testadas em um espectrofotômetro NanoDrop para verificar a presença de contaminantes e a integridade do DNA, seguido de um teste Qubit para estimar a concentração de DNA em cada amostra.

Tabela 3.1. Informações geográficas e hospedeiros das populações de *C. includens*.

Local (Cidade, estado)	Código	Hospedeiro	Latitude (S)	Longitude (W)
Coxilha, RS	RSCO	Soja	28°10'54''	52°44'46''
Pitanga, PR	PRPI	Soja	24°17'23''	52°34'16''
Casa Branca, SP	SPCB	Soja	21°43'34''	47°09'09''
Campo Grande, MS	MSCG	Soja	20°42'31''	54°30'03''
Araguari, MG	MGAR	Soja	18°59'23''	47°33'52''
Mineiros, GO	GOMI	Trap/soja	17°37'43''	52°36'52''
Campo Verde, MT	MTCV	Algodão	15°36'40''	55°14'05''
Campo Verde, MT	MTCV	Soja	15°25'34''	54°48'05''
Correntina, BA	BACO	Soja	11°49'21''	46°10'52''
Correntina, BA	BACO	Algodão	11°49'21''	46°10'52''
Russas, CE	CERU	Trap/feijão	4°55'28''	38°00'14''
Teresina, PI	PITE	Trap/feijão	5°02'21''	42°47'22''

3.2.2. Preparação e sequenciamento da biblioteca de GBS

Com as amostras de DNA, duas bibliotecas contendo 75 amostras cada (150 insetos no total), oriundas dos 12 locais selecionados (Tabela 3.1), foram construídas pela empresa EcoMol Consultoria e Projetos (Piracicaba, Brasil) usando o protocolo GBS descrito por Elshire *et al.*, (2011). Para estas bibliotecas dividimos as amostras em dois grupos que foram uniformizados de acordo com a quantidade de DNA (75 amostras com 15 ul de 15ng/ul e 75 amostras com 40ul de 5ng/ul). Inicialmente, foi testada a clivagem do DNA das amostras com as enzimas PstI e ApeKI, seguindo o protocolo do fabricante (New England BioLabs®). A enzima PstI (CTGCAG) gerou fragmentos mais uniformes e homoganeamente distribuídos, e consequentemente foi a enzima escolhida para essa espécie. Os adaptadores foram projetados anteriormente usando a ferramenta GBS Barcode Generator (Deena Bioinformatics), levando em consideração a sequência do código de barras, a fim de maximizar o equilíbrio das bases

em cada posição do conjunto definido. Para realizar a reação de ligação, reidratamos todas as amostras em 6 mL de soluções adaptadoras e incubamos a 22 °C por 2 horas em mistura de ligação com DNA ligase T4 (New England BioLabs®). Todas as amostras foram reunidas e purificadas usando o QIAquick PCR Purification Kit® (Qiagen). A amplificação por PCR foi realizada utilizando iniciadores específicos para sequenciação usando a plataforma Illumina. A purificação por PCR foi realizada usando o kit de purificação por PCR Agencourt AMPure XP® (Beckman Coulter). Os produtos de PCR foram quantificados por PCR quantitativo usando o KAPA Library Quantification Kit (KAPA Biosystems). A biblioteca foi agrupada em cluster usando o TruSeq SR Cluster Kit v3-cBot-HS no equipamento cBOT (Illumina) e sequenciada no Centro de Genômica Animal da ESALQ / USP usando o Illumina TruSeq SBS Kit v3-HS no seqüenciador Illumina HiSeq2500 (Illumina, San Diego) (leituras de extremidade única de 100 bp) no Laboratório de Biotecnologia Animal da USP / ESALQ.

3.2.3. Análise de dados de GBS

Inicialmente desmultiplexamos as sequências, igualamos para 90 pb e filtramos de acordo com os valores das pontuações de Phred usando *process-radtags* no software Stacks 2.1 (Catchen *et al.*, 2013). Prosseguimos com a análise usando os principais módulos disponíveis no Stacks em uma abordagem *de novo*. Na primeira etapa, as leituras foram usadas para construir RAD loci (restriction site-associated DNA marker loci) usando *ustacks* para formar loci putativos presentes em cada arquivo de amostra. Nesta fase, há dois parâmetros críticos, o número mínimo de leituras brutas para formar um alelo putativo ($m = 3$) e o número de incompatibilidades permitidas entre as pilhas para fundi-las em um alelo único ($M = 4$). Em seguida Stacks cria um catálogo contendo *loci* no *cstacks*, usando 4 como o número de incompatibilidades permitidas entre *loci* ($n = 4$) e correspondendo *loci* encontrados em cada indivíduo no catálogo usando *sstacks*.

Por fim, usamos o *population module* para filtrar os dados ausentes, mantendo apenas os locais presentes em 80% ou mais indivíduos dentro de uma população putativa ($r = 0,8$) e ~ 80% ou mais entre as populações putativas ($p = 8$). O ponto de corte da menor frequência do alelo foi fixado em 0,05 e o valor máximo heterozigidade observada limitada a 50%. O conjunto de dados resultantes foram salvos como arquivos VCF, Genepop e STRUCTURE e convertidos para outros formatos usando o PGDSPIDER 2.0 quando necessário (Lischer and Excoffier, 2012).

3.2.4. História demográfica

A reconstrução da história demográfica de *C. includens* foi feita usando o método multi-locus Extended Bayesian Skyline plot (EBSP) implementado no software BEAST versão 1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012; Bouckaert *et al.*, 2014). Devido à falta de estrutura genética encontrada nas análises preliminares, nós selecionamos aleatoriamente 50 sequências (SNPs) neutras de uma população simples e agrupada, para realizar a análise de reconstrução demográfica (Calderón *et al.*, 2016).

As análises de modelo de substituição nucleotídica e modelo de relógio foram vinculadas, enquanto as de árvore permaneceram desassociadas. O modelo de substituição HKY foi implementado porque nos permitiu trabalhar com menos parâmetros. Um modelo estrito de relógio foi implementado usando uma taxa de mutação fixa no genoma de 2.9×10^{-9} mutações / local / geração. A taxa de mutação foi selecionada com base em organismos semelhantes, pois nenhum valor está disponível para esta espécie (El-Shehawi and Elseehy, 2016; Oppold and Pfenninger, 2017). Assumimos que a espécie tem 10 gerações por ano. O comprimento da cadeia de 100 milhões de gerações amostradas a cada 4.000 estados e um burn-in de 20% foram implementadas em três execuções independentes. Os resultados foram inspecionados no Tracer, e examinado posteriormente o ESS (tamanho efetivo da amostra) e a convergência entre as execuções.

3.2.5. F_{ST} , Estrutura genética e fluxo gênico

Avaliamos a estruturação genética usando o software STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). Foi utilizado um burn-in inicial de 1.5×10^5 , seguido 5×10^5 de interações de cadeia de Monte Carlo Markov (MCMC) usando 10 repetições para cada valor de K sem informações prévias da população. As análises foram realizadas de $K = 1$ a $K = 14$, permitindo correlação alélica e um modelo de mistura. O número mais provável de clusters foi determinado usando o método Evanno implementado no STRUCTURE HARVESTER 0.6.93 (Earl and vonHoldt, 2012). Os resultados do STRUCTURE foram calculados usando CLUMPP (Jakobsson and Rosenberg, 2007) e visualizados usando DISTRUCT (Rosenberg, 2004).

A diferenciação pareada entre os locais de amostragem foi estimada com base na estimativa imparcial do Φ_{ST} (Weir and Cockerham, 1984). Um heatmap foi produzido para ilustrar os valores do F_{ST} usando o pacote R, *RColorBrewer*. Para testar a correlação entre distância genética e distância geográfica, foi realizado um teste de Mantel incluindo uma matriz

de comparação pareada com 10.000 permutações, usando R libraries, o *ecodista* (Goslee and Urban, 2007) e *ade4* (Dray and Dufour, 2007).

3.2.6. Identificação de outlier e análise de seleção natural

O software LOSITAN foi usado para detectar os *loci* putativos que estavam sob seleção natural. O método implementado no LOSITAN simula a distribuição conjunta entre F_{ST} e heterozigosidade (H_e) sob neutralidade (Antao *et al.*, 2008), assumindo o modelo de migração em ilha com marcadores neutros. Qualquer *locus* com F_{ST} maior ou menor que a distribuição neutra (outlier) é considerado candidato por estar sob pressão seletiva (Beaumont and Nichols, 1996).

O F_{ST} neutro médio foi calculado usando 100.000 simulações com um intervalo de confiança de 0,99 e uma taxa de descoberta falsa (FDR) de 0,01. Para garantir parâmetros de detecção mais rigorosos, selecionamos as opções ‘force mean F_{ST} ’ e ‘neutral mean F_{ST} ’. Também usamos uma abordagem bayesiana que estimava a probabilidade posterior de um determinado *locus* estar sob seleção, contrastando essa suposição com o modelo neutro. Uma segunda análise foi implementada no BayeScan v2.1 (Foll and Gaggiotti, 2008). Nas duas análises, locais de amostragem foram contrastados, exceto as áreas de algodão (BACOC e MTCVC) que se sobrepunham parcialmente no tempo e no espaço com áreas de soja (BACOS e MTCVS). Contrastes entre locais de soja e os locais do algodão foram realizados separadamente. Os *loci* putativos sob seleção foram utilizados em consultas na plataforma BLASTx no banco de dados NCBI usando Blast2GO (Götz *et al.*, 2008). Ontologias com valor eletrônico $< 1 \times 10^{-6}$ foram consideradas para anotação.

3.3. Resultados

As duas bibliotecas GBS sequenciadas produziram um total de 784.309.732 reads (fragmentos). Após as etapas de desmultiplexação e filtragem de qualidade, 696.980.827 leituras foram retidas (~ 89%). Um total de 315.667 *loci* foram genotipados, com uma cobertura média por amostra de 106,3 X ($DP = 29,5$ X) e mínima e máxima de 14,0 X e 182,0 X, respectivamente. Depois que os dados ausentes foram filtrados, 2.173 locais variantes dos quais de 1.453 *loci* polimórficos foram retidos para análise posterior.

Em nossas análises não foram detectados alelos privados (ou seja, alelos exclusivos de uma população) no conjunto de dados. Além disso, identificamos uma faixa estreita de valores para diversidade de nucleotídeos ($\pi = 0,234-0,256$), heterozigosidade observada ($H_O = 0,167-$

0,185) e coeficiente de endogamia ($F_{IS} = 0,162$ a $0,251$) nos 12 locais (Tabela 3.2). O menor valor para diversidade genética foi encontrado no MTCVC durante o cultivo do algodão e o mais alto no CERUB, em cultivos de feijão.

Tabela 3.2. Resumo das estatísticas genéticas considerando apenas posições variantes nas populações de *C. includens* avaliadas usando marcadores SNP: heterozigiosidade observada (H_o), heterozigiosidade esperada (H_e), coeficiente de endogamia de Wright (F_{IS}) e diversidade de nucleotídeos (π)

Códigos	H_o	H_e	F_{IS}	π
RSCO	0,174	0,240	0,247	0,248
PRCM	0,167	0,236	0,243	0,246
SPCB	0,171	0,238	0,239	0,249
MGAR	0,172	0,244	0,251	0,253
GOMI	0,181	0,239	0,222	0,249
MSCG	0,182	0,245	0,240	0,254
MTCVC	0,177	0,218	0,162	0,234
MTCVS	0,170	0,228	0,211	0,241
BACOC	0,171	0,219	0,182	0,236
BACOS	0,175	0,228	0,194	0,244
PIEB	0,178	0,237	0,218	0,247
CERU	0,185	0,245	0,217	0,256

* As estimativas de polimorfismo e de diversidade se referem apenas a posições variantes

A análise EBSP baseada em 50 sequências nucleares mostraram uma condição de recente expansão demográfica nas populações de *C. includens*. Com base na suposta calibração do relógio molecular ($2,9 \times 10^{-9}$ mutações / local / geração), a expansão começou há ~ 300 anos (Figura 3.1).

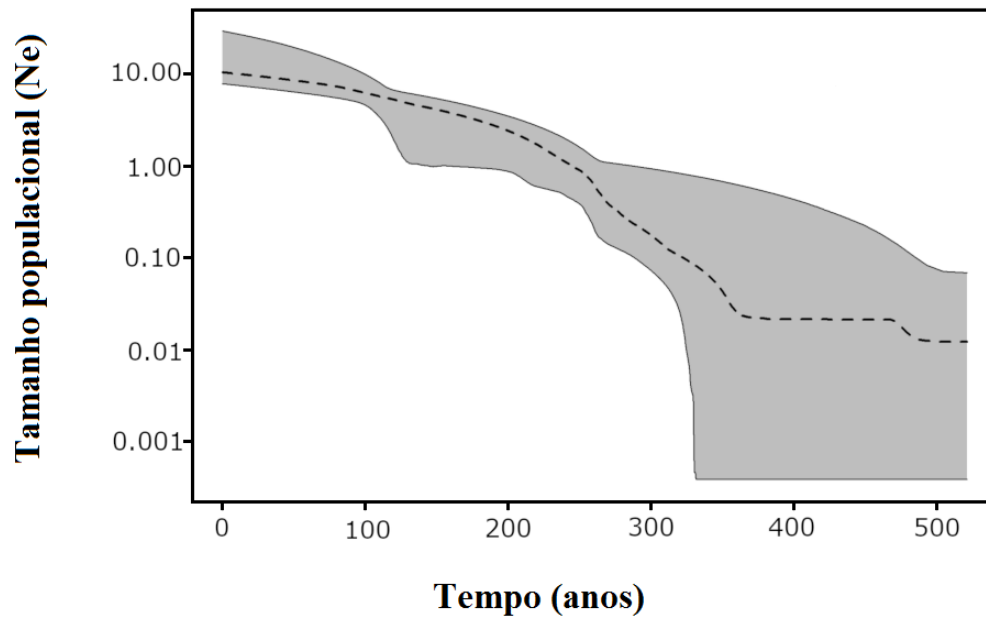


Figura 3.1. Gráfico Bayesian Skyline (BSP) mostrando dinâmica de tamanho populacional para *Chrysodeixis includens* no Brasil, com base em 50 marcadores SNP. O eixo y indica o tamanho efetivo da população (N_e) dimensionado pela taxa de mutação (μ) em função do tempo (anos). A linha pontilhada mostra a estimativa mediana da BSP e a área cinza mostra os limites superior e inferior de 95% da densidade posterior.

Com a análise de estrutura realizada pelo software STRUCTURE, observamos um baixo grau de diferenciação genética entre indivíduos de diferentes locais amostrados. Entretanto, um valor mais alto de K ($K = 4$) foi detectado pelo Método de Evanno (Earl & vonHoldt, 2012), embora as populações foram totalmente misturadas. Na figura podemos observar que cada listra corresponde a um indivíduo, mostrando presença de todas as constituições individuais em todas as populações (Figura 3.2).

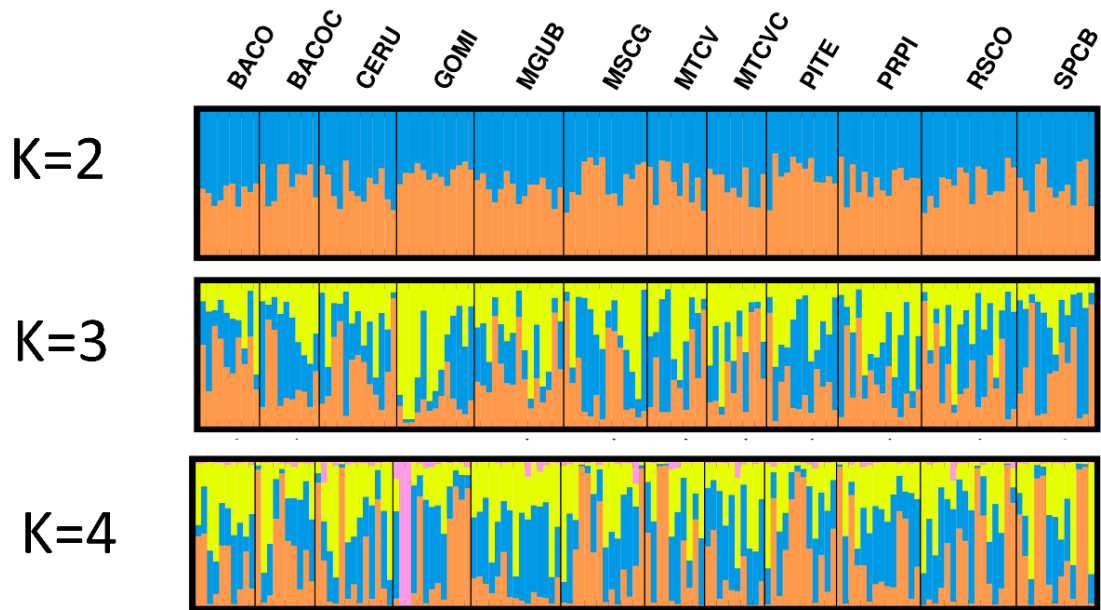


Figura 3.2. Análises de agrupamento baseadas em marcadores SNP e distribuição geográfica dos dois grupos bayesianos em 10 populações de *C. includens*. Ao longo do eixo x de cada gráfico, cada barra vertical representa uma amostra; ao longo do eixo y, o coeficiente de associação de uma amostra para um grupo bayesiano. O melhor valor para K ($K = 4$) foi calculado pelo método ΔK (Evanno et al., 2005). A análise da estrutura revela um padrão de mistura.

Valores baixos de F_{ST} aos pares foram observados em toda a faixa, confirmando um baixo nível de diferenciação genética entre os locais (isto é, intervalo de 0,022-0,036 e média de 0,028) (Figura 3.3A). Além disso, observamos uma separação consistente entre locais de coleta de acordo com regiões, onde amostras coletadas nas mesmas regiões foram mais semelhantes de acordo com os valores do F_{ST} (Figura 3.3B). No entanto, isolamento não significativo por distância ao nível de 5% foi detectado ($r = 0,30$, $p = 0,06$).

O afastamento do IBD foi causado principalmente pelos locais onde a soja e o algodão são produzidos e, portanto, o subconjunto de locais contendo as duas culturas (BACOC, BACOS, MTCVC e MTCVS) foi avaliado separadamente. Nessa análise, os locais amostrados foram agrupados de acordo com o hospedeiro e não com a localização geográfica (Figura 3.3C). No gráfico da estruturação, os indivíduos coletados em algodão não foram bem diferenciados daqueles coletados nos campos de soja, indicando mistura e um nível considerável de fluxo gênico (Figura 3.3D). Portanto, nossos dados mostram evidências de deriva genética, que diferenciam populações geograficamente distantes (por exemplo, isolamento por padrão de distância), e seleção natural quando contrastamos as áreas de soja e algodão.

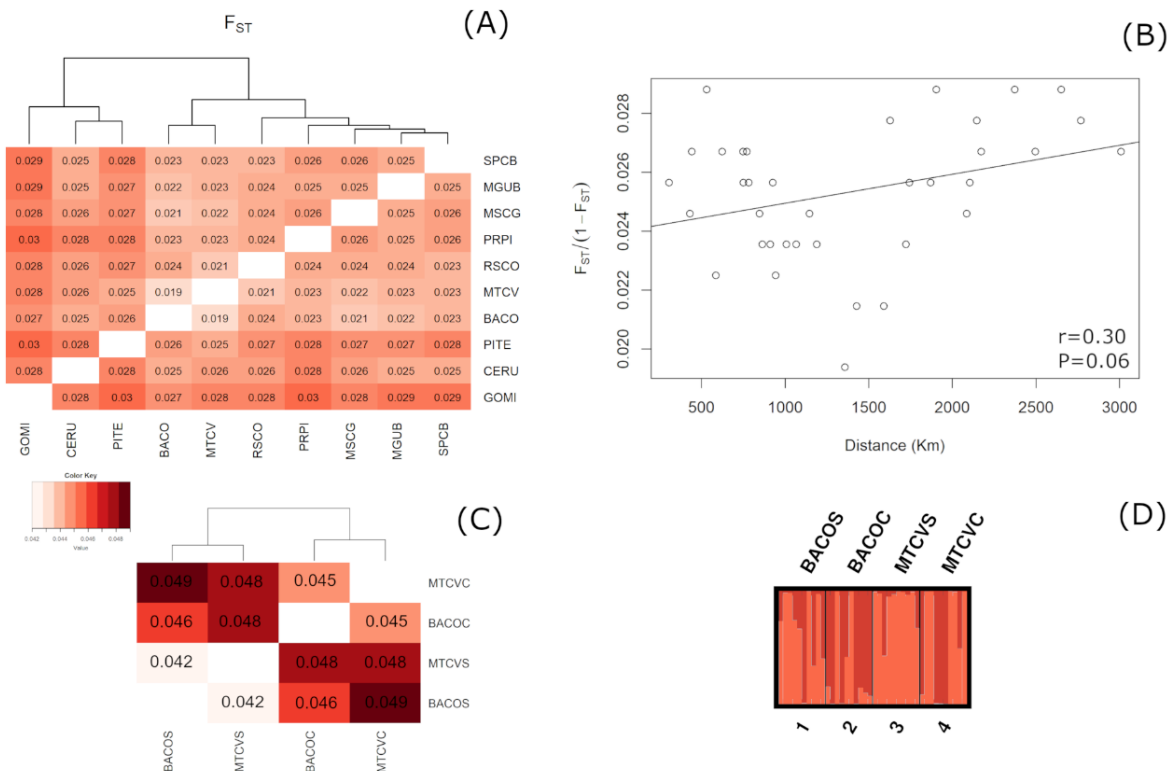


Figura 3.3. (A) Heatmap dos valores de F_{ST} aos pares de populações de *Chrysodeixis includens* baseadas em marcadores SNP. (B) A regressão analisa o teste de isolamento por distância (IBD) entre populações de *C. includens* baseadas em marcadores SNP. GOMI foi excluído desta análise. (C) Heatmap dos valores de F_{ST} aos pares de *C. includens* coletados em culturas de algodão e soja com base em marcadores SNP. (D) Análises de agrupamento baseadas em marcadores SNP de quatro populações de *C. includens* amostradas em dois hospedeiros (algodão e soja) e dois locais geográficos. Ao longo do eixo x de cada gráfico, cada barra vertical representa uma amostra; ao longo do eixo y, o coeficiente de associação de uma amostra para um grupo bayesiano. O melhor valor para K ($K = 2$) foi calculado pelo método ΔK (Evanno *et al.*, 2005).

O aplicativo Lositan produziu 44 *loci* candidatos sob seleção positiva dentre os 3.503 SNP analisados. Enquanto o BayeScan detectou 4 candidatos, todos presentes na lista de candidatos do Lositan. Os quatro *loci* compartilhados não foram encontrados em uma pesquisa no Blastx do NCBI. Dessa lista, 13 candidatos foram identificados com sucesso em pesquisa, 10 foram mapeados e 7 foram anotados. Entre os possíveis candidatos, um *loci* associado à atividade da glucuronosiltransferase foi reconhecido (UDP-glicosiltransferase).

Ao contrastar locais onde amostras de algodão e soja foram amostradas (ou seja, BACO e MTCV), o BayeScan encontrou sinais de seleção natural apenas no BACO. Um total de 43 *loci* candidatos sob seleção positiva foram identificados pelo Método BayeScan, dos quais 19 foram bem-sucedidos na identificação por Blastx, 4 mapeados e 2 anotados. Um dos *loci* anotado com sucesso está associado à proteólise (tipo serina Atividade de D-Ala-D-Ala

carboxipeptidase). Outro Blastx não anotado, os resultados incluíram aminotransferase, amidases e carboxipeptidase.

3.4. Discussão

Nossos resultados utilizando marcadores SNPs forneceram informações de baixa estruturação genética e baixo nível de diversidade genética entre as populações de *C. includens* amostradas neste estudo, apesar das diferenças marcantes nas condições ambientais e da grande distância geográfica entre os locais de coleta dos insetos. Esses dados corroboram com os resultados encontrados para os genes mitocondriais (capítulo 2) e reafirmam a hipótese de uma rápida expansão populacional dessa praga, uma vez que a grande maioria dos 3.503 marcadores utilizados foram considerados marcadores neutros e não estavam sob pressão de seleção, sendo marcadores ideais para este tipo de inferência. Utilizando uma abordagem bayesiana, nós também estimamos o início da expansão populacional de *C. includens* para aproximadamente 300 anos. Porém reconstruções demográficas necessitam de prudência em sua interpretação, dada a taxa de mutação inespecífica assumida em todo o genoma, assim dependendo do conjunto de SNPs utilizados podemos obter pequenas variações na estimativa do tempo de expansão demográfica (El-Shehawi and Elseehy, 2016; Oppold and Pfenninger, 2017).

Compreender como a diversidade genética é distribuída em todas as populações de uma espécie é fundamental para estudar os padrões de fluxo gênico e avaliar as tendências adaptativas. Ao saber como as populações são geneticamente estruturadas, nós podemos inferir com mais segurança quais fatores bióticos e abióticos podem ser responsáveis pelo isolamento ou pela falta isolamento de um pool genético específico (Slatkin, 1987; Avise, 1992). Em um contexto mais amplo, nosso objetivo era lançar uma luz sobre os eventos e processos adaptativos das populações de *C. includens* distribuídas de maneira contínua em todo o território brasileiro. Apesar do baixo nível de diversidade genética, podemos identificar sinais de uma baixa e recente diferenciação por distância e por hospedeiros (algodão e soja) entre as populações de *C. includens*. A desigualdade do habitat, a pressão de seleção e a distribuição de hospedeiros podem neutralizar o efeito do fluxo gênico, produzindo uma estruturação genética em escalas espaciais bastante finas (Mopper, 1996). No entanto, é difícil prever se a pequena diferenciação por hospedeiro aqui relatada aumentará ou será erodida pelo fluxo gênico a longo prazo nas populações de *C. includens*. Para isso é necessário um contínuo monitoramento das populações de *C. includens*, uma vez que estruturação por hospedeiro pode levar a diferentes tomadas de decisões no manejo de pragas.

Em nosso estudo, os campos de soja foram o tipo agrícola predominante em todas as paisagens, cobrindo até 50% da área total em alguns casos (por exemplo, PRPI e BACO). Entretanto, foi possível observar, baseado nos marcadores sob seleção, indícios de que a seleção natural está moldando as populações de *C. includens* no Brasil. O que nos leva a supor que esses processos adaptativos podem estar ligados à recente mudança no status de praga de *C. includens* nas últimas décadas.

A triagem de seleção natural detectou entre as proteínas que podem estar associadas com o manejo da resistência a pragas e insetos e adaptação do hospedeiro, uma proteína UDP-glicosiltransferase (detectada por LFMM e Lositan) sob seleção positiva. A UDP-glicosiltransferase participa da desintoxicação de xenobióticos vegetais (ou seja, gossipol) e inseticidas (Krempel *et al.*, 2016, Li *et al.*, 2017, Kaplanoglu *et al.*, 2017). A resistência a inseticidas piretróides vem sendo comprovada em estudos mais recentes (Stacke *et al.*, 2020).

A diferença entre insetos coletados de plantas de algodão e soja ficou evidente em apenas um dos dois locais de amostragem (BACOC), esse resultado pode ser explicado pela menor proporção de algodão no MTCVC. Para a seleção de hospedeiros, os resultados do Blast2GO revelaram que o comportamento alimentar associado com aminotransferase, amidases, carboxipeptidase e a carboxilase pode estar mudando. Estudos adicionais são necessários para reforçar a evidência de formação de raça relacionada ao hospedeiro e a importância funcional dos genes candidatos listados aqui.

3.5. Considerações Finais

De acordo com nossas análises de múltiplos loci conduzidos com marcadores SNPs, as populações de *C. includens* amostradas possuem uma recente expansão demográfica e uma fraca estrutura genética geográfica. No entanto, uma consistente estruturação por hospedeiro foi observada. Por fim, o avanço e a intensificação dos cultivos agrícolas, principalmente a soja, tem promovido seleção de alelos em populações de *C. includens* associados a herbívoros, defesa contra patógenos e supostamente resistência a agroquímicos, o que podem justificar os surtos populacionais dessa praga nas últimas décadas. Compreender como os processos adaptativos moldam a trajetória evolutiva das populações de pragas dificilmente impedirá a transformação contínua das populações naturais, mas pode nos guiar na busca por melhores táticas de monitoramento e manejo de pragas em sistemas agrícolas tropicais.

Referências

- Alford, A.R., Hammond Junior, A.N., 1982. Plusinae (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Louisiana soybeans ecosystems as determined with looplure-baited traps. *Journal of Economic Entomology* 75, 4:647-650.
- Altieri, M. A., 1999. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 19-31.
- Andrade, K., Bueno, A. F., Silva, D. M., Stecca, C. S., Pasini, A., Oliveira, M. C. N., 2016. Bioecological characteristics of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different hosts. *Austral Entomology*, 55, 449–454.
- Antao, T., Lopes, A., Lopes, R. J., Beja-Pereira, A., Luikart, G., 2008. LOSITAN: A workbench to detect molecular adaptation based on a Fst-outlier method. *BMC Bioinformatics*, 9, 323.
- Arvor, D., Meirelles, M., Dubreuil, V., Bégué, A., Shimabukuro, Y. E., 2012. Analyzing the agricultural transition in Mato Grosso, Brazil, using satellite-derived indices. *Applied Geography*, 32, 702-713.
- Awise, J. C., 1992. Molecular Population Structure and the Biogeographic History of a Regional Fauna: A Case History with Lessons for Conservation Biology. *Oikos*, 63, 62-76.
- Beaumont, M. A., Nichols, R. A., 1996. Evaluating Loci for Use in the Genetic Analysis of Population Structure. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 263(1377), 1619–1626.
- Black, W.C., Duteau, N.M., 1997. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. In: Crampton JM, Beard CB, Louis C. *The molecular biology of insect disease vectors: a methods manual*. London: Chapman & Hall 361-373.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C. H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A., Drummond, A. J., 2014. BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology*, 10, e1003537.
- Bueno, A. D. F., Panizzi, A. R., Corrêa-Ferreira, B. S., Hoffmann-Campo, C. B., Sosa-Gómez, D. R., Gazzoni, D. L., ... Roggia, S., 2013. Histórico e evolução do manejo integrado de pragas da soja no Brasil. *Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*. Embrapa, Brasília, 859.
- Burleigh, J.G., 1972. Population dynamics and biotic controls of the soybean looper in Louisiana. *Environmental Entomology*, 1, 290-294.
- Camargo, A.J.A., 2001. Insect diversity in cultivated areas and nature reserves: considerations and recommendations. (Diversidade de insetos em áreas cultivadas e reserva legal:

considerações e recomendações.) Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento - Embrapa Cerrados, 1:27.

- Calderón, L., Campagna, L., Wilke, T., Lormee, H., Eraud, C., Dunn, J. C., Rocha, G., Zehtindjiev, P., Bakaloudis, D. E., Metzger, B., Cecere, J. G., Marx, M., Quillfeldt, P., 2016. Genomic evidence of demographic fluctuations and lack of genetic structure across flyways in a long distance migrant, the European turtle dove. *BMC Evolutionary Biology*, 16, 237.
- Catchen, J., Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Amores, A., Cresko, W. A., 2013. Stacks: An analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*, 22, 3124–3140.
- Cavender-Bares, J., Kozak, K. H., Fine, P. V. A., Kembel, S. W., 2009. The merging of community ecology and phylogenetic biology. *Ecology Letters*, 12, 693–715.
- Corrêa, A.S., Cordeiro, E.M.G., Omoto, C. 2019. Agricultural insect hybridization and implications for pest management. *Pest Management Science*, v. 75, p. 2857-2864.
- Dray, S., Dufour, A.B. B., 2007. The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *Journal of Statistical Software*, 22, 1–20.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1969-1973.
- Earl, D.A., von Holdt, B.M., 2012. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4:359-361.
- El-Shehawi, A. M., Elseehy, M. M., 2016. Estimation of Genome Evolution Time by Mutation Rate. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 4, 172.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., Mitchell, S. E., 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, 6, e19379.
- Evanno, G., Regnauts, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Foll, M., Gaggiotti, O., 2008. A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: A Bayesian perspective. *Genetics*, 180, 977–993. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.092221>.
- Guedes, J.V.C., Stecca, C.S., Rodrigues, R.B., Bigolin, M., 2011. Nova dinâmica. *Cultivar Grandes Culturas* 139: 24-26.
- Goslee, S. C., Urban, D. L., 2007. The ecodist Package for Dissimilarity-based Analysis of Ecological Data. *Journal of Statistical Software*, 22, 1–19.

- Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Williams, T. D., Nagaraj, S. H., Nueda, M. J., Robles, M., Talón, M., Dopazo, J., Conesa, A., 2008. High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research*, 36, 3420–3435.
- Herzog, D.C., 1980. Sampling soybean looper on soybean. In: Kogan M, Herzog DC (Eds.), *Sampling Methods in Soybean Entomology*. Springer Verlag, New York, pp. 141–162.
- Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., 2007. CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23, 1801–1806.
- Kaplanoglu, E., Chapman, P., Scott, I. M., Donly, C., 2017. Overexpression of a cytochrome P450 and a UDP-glycosyltransferase is associated with imidacloprid resistance in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Scientific Reports*, 7, 1762.
- Krempl, C., Sporer, T., Reichelt, M., Ahn, S. J., Heidel-Fischer, H., Vogel, H., ... Joußen, N., 2016. Potential detoxification of gossypol by UDP-glycosyltransferases in the two Heliothine moth species *Helicoverpa armigera* and *Heliothis virescens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 71, 49-57.
- Lenormand, T., 2002. Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology and Evolution*, 17, 183–189.
- Li, X., Zhu, B., Gao, X., Liang, P., 2017. Over-expression of UDP-glycosyltransferase gene UGT2B17 is involved in chlorantraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.). *Pest Management Science*, 73, 1402-1409.
- Lischer, H. E. L., Excoffier, L., 2012. PGDSpider: An automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics*, 28, 298–299.
- Lu, Y., Wu, K., Jiang, Y., Xia, B., Li, P., Feng, H., ... Guo, Y., 2010. Mirid bug outbreaks in multiple crops correlated with wide-scale adoption of *Bt* cotton in China. *Science*, 328, 1151-1154.
- Mopper, S., 1996. Adaptive genetic structure in phytophagous insect populations. *Tree*, 11, 235-238.
- Moscardi, F., Bueno, A.F., Sosa-Gómez, D.R., Roggia, S., Hoffmann-Campo, C.B., Pomari, A.F., Corso, I.C., Yano, S.A.C., 2012. In: Hoffmann-Campo, B.C., Corrêa-Ferreira, B.S., Moscardi, F., *Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*, Embrapa, 859.
- Oppold, A. M., Pfenninger, M., 2017. Direct estimation of the spontaneous mutation rate by short-term mutation accumulation lines in *Chironomus riparius*. *Evolution Letters*, 1, 86-92.

- Palma, J., Maebe, K., Guedes, J.V.C., Smagghe, G., 2015. Molecular Variability and Genetic Structure of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae), an important Soybean defoliator in Brazil. PLoS ONE 10(3): e0121260.
- Panizzi, A. R., 2013. History and Contemporary Perspectives of the Integrated Pest Management of Soybean in Brazil. Neotropical Entomology, 42, 119-127.
- Porter, J. H., Parry, M. L., Carter, T. R., 1991. The potential effects of climatic change on agricultural insect pests. Agricultural and Forest Meteorology, 57, 221-240.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155: 945-959.
- Rosenberg, N. A., 2004. DISTRUCT: A program for the graphical display of population structure. Molecular Ecology Notes, 4, 137–138.
- Santos, S. R., Specht, A., Carneiro, E., Paula-Moraes, S. V., Casagrande, M. M., 2017. Interseasonal variation of *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the Brazilian Savanna. Revista Brasileira de Entomologia, 61, 294–299.
- Slatkin, M., 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science, 236, 787-792.
- Sosa-Gómez, D. R., Delpin, K. E., Moscardi, F., Nozaki, M. D. H., 2003. The impact of fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson epizootics and on populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) on soybean. Neotropical Entomology, 32, 287–291.
- Specht, A., Paula-Moraes, S.V., Sosa-Gómez, D.R., 2015. Host plants of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae, Plusiinae). Revista Brasileira de Entomologia 59: 343–345.
- Spehar, C. R., 1995. Impact of strategic genes in soybean on agricultural development in the Brazilian tropical savannahs. Field Crops Research. 1, 141-146.
- Stacke, R. F., Godoy, D. N., Halberstadt, S. A., Bronzatto, E. S., Giacomelli, T., Hettwer, B. L., Muraro, D. S., Guedes, G. V. C., Bernardi, O., 2020. Inheritance of lambda-cyhalothrin resistance, fitness costs and cross-resistance to other pyrethroids in soybean looper, *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae). Crop Protection.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358–1370.

4. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA A FALSA-MEDIDEIRA-DA-SOJA (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

* *Publicado em:* Silva, C. S., Cordeiro, E. M. G., & Corrêa, A. S. (2019). Isolation and Characterization of Microsatellite Markers for Soybean Looper (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Science*, 19(5), 22.

RESUMO

Chrysodeixis includens Walker (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das pragas mais severas com relatos de ataque em diversas culturas agrícolas nas Américas. Aqui, relatamos a construção de 13 marcadores microssatélites para *C. includens*. Todos os marcadores SSR foram polimórficos e não há evidência de desequilíbrio de ligação entre qualquer um dos *loci* para todas as populações estudadas. O número total de alelos por *locus* variou de 5 para L3, L9 e L11 a 26 para L6 e o número médio de alelos por *locus* considerando as três populações de *C. includens* variou de 2.333 para L3 a 14.666 para L6. Não foi encontrado desvio significativo de HWE em quatro *loci* para pelo menos uma das populações testadas (L3, L5, L9, L10), enquanto os demais *loci* não estavam em HWE. Os marcadores L6, L7, L8, L10, L11, L12 e L13 mostraram a frequência de alelos nulos $> 0,2$. As estatísticas F e a análise de STRUCTURE revelaram uma baixa estrutura populacional entre as populações de *C. includens* ($F_{ST} = 0,013$) e alta endogamia ($F_{IS} = 0,658$). Esperamos que os marcadores SSR aqui desenvolvidos se tornem ferramentas úteis para futuros estudos sobre a ecologia, demografia, dinâmica de hospedeiros e fluxo gênico de *C. includens*. Essas informações são cruciais para entender o status recente de *C. includens* como uma das principais pragas na América do Sul.

Palavras-chave: Marcadores SSR; Pragas agrícolas; Estrutura genética; Fluxo gênico; Surto de pragas

Isolation and Characterization of Microsatellite Markers for Soybean Looper (Lepidoptera: Noctuidae)

Published in: Silva, C. S., Cordeiro, E. M. G., & Corrêa, A. S. (2019). Isolation and Characterization of Microsatellite Markers for Soybean Looper (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Science*, 19(5), 22.

ABSTRACT

Chrysodeixis includens (Lepidoptera: Noctuidae) is one of the most severe pests reported to damage many crops in the Americas. Here, we reported the construction of 13 microsatellite markers for *C. includens*. All SSR markers were polymorphic and no evidence of linkage disequilibrium between any of the loci in any populations. The total number of alleles per locus varied from 5 for L3, L9, and L11 to 26 for L6 and the mean number of alleles per locus considering the three populations of *C. includens* ranged from 2,333 for L3 to 14,666 for L6. No significant deviation of HWE was found in four loci for at least one tested population (L3, L5, L9, L10), while the others were not in HWE. The markers L6, L7, L8, L10, L11, L12, and L13 showed the frequency of null alleles > 0.2 . The STRUCTURE and F statistics revealed low population structure among the populations of *C. includens* ($F_{ST} = 0.013$) and high inbreeding ($F_{IS} = 0.658$). We hope that the SSR markers here developed will become useful tools for future studies on ecology, demography, host dynamics, and gene flow of *C. includens*. This information are crucial to understand the recent status of *C. includens* as a key-pest in South America.

Keywords: SSR markers; Agricultural pest; Genetic structure; Gene flow; Pest outbreak

4.1. Introdução

A falsa-medideira-da-soja, *Chrysodeixis includens* (Walker, 1858), é uma das mais severas pragas agrícolas entre as espécies de lepidópteros-praga, atacando uma ampla variedade de culturas, que incluem soja, feijão, algodão e tomate (Baldin *et al.*, 2014, Specht *et al.*, 2015). Esta espécie polifága causa desfolhamento intenso e danos às estruturas reprodutivas, incluindo frutos já maduros (Herzog, 1980). *Chrysodeixis includens* é amplamente distribuída no hemisfério ocidental, do norte dos Estados Unidos até ao sul da Argentina (Kogan and Turnpseed, 1987). Historicamente, *C. includens* tem sido uma praga de importância secundária na agricultura brasileira, no entanto, nas duas últimas décadas, ocorreram numerosos surtos populacionais na cultura da soja na América do Sul, elevando *C. includens* ao status de praga principal para esta cultura (Specht *et al.*, 2015).

Surtos populacionais de *C. includens* foram associados a uso excessivo de fungicidas para controlar a ferrugem asiática da soja (*Phakopsora pachyrhizi*), que pode afetar negativamente fungos entomopatogênicos como *Metarhizium rileyi* (Ascomycota: Clavicipitaceae) e artrópodes benéficos que incluem predadores e parasitóides (Sosa-Gómez *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2018). Os surtos de *C. includens* também podem ter sido promovidos pelo avanço das fronteiras agrícolas para as regiões central e norte do Brasil, juntamente com

os sistemas intensivos de cultivo que fornecer alimento em abundância, alta pressão de seleção de inseticidas e hospedeiros cultivados, além disso, as grandes áreas agrícolas podem aumentar as conexões entre populações distintas geneticamente aumentando o potencial adaptativo das populações dessa espécie (Santos *et al.*, 2017, Soares *et al.*, 2018, Corrêa *et al.*, 2019, Stacke *et al.*, 2019). Essas hipóteses ainda não foram testadas e a falta de informações sobre a dinâmica histórica e contemporânea de populações de *C. includens* aumenta a dificuldade de responder a essas questões.

Estudo populacional de *C. includens*, utilizando marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), indicou baixa diversidade genética e alta similaridade genética entre populações de diferentes regiões brasileiras (Palma *et al.*, 2015). No entanto, os ISSRs são marcadores dominantes e apresentam problemas de reprodutibilidade, que podem afetar a inferência da estrutura genética e do fluxo gênico entre populações (McGregor *et al.*, 2000). Uma alternativa são marcadores microssatélites (SSRs), que são amplamente utilizados em estudos populacionais de plantas, animais e fungos. Esses marcadores são distribuídos em todo o genoma e possui características como codominância, multi-alélico, alta reprodutibilidade e transferibilidade entre espécies (Mason, 2015).

Marcadores SSR são constantemente utilizados para determinar a estrutura genética, o fluxo gênico e eventos de hibridação de várias espécies de lepidópteros-praga (A'Hara *et al.*, 2013, Wei *et al.*, 2013, Jing *et al.*, 2016, Leite *et al.*, 2016, Seymour *et al.*, 2016, Arias *et al.*, 2019). Assim, aqui nós desenvolvemos os primeiros marcadores microssatélites para *C. includens*, posteriormente avaliamos o polimorfismo desses marcadores e por último os validamos para estudos populacionais de *C. includens*.

4.2. Material & Métodos

4.2.1. Coleta e extração de DNA de *C. includens*

Para construção da biblioteca de SSR e posteriormente padronização das reações de amplificação dos marcadores SSR desenvolvidos, foram utilizados insetos oriundo da criação do Laboratório de Biologia de Insetos da USP/Esalq. Em seguida, para validar os marcadores SSR e estimar os índices de diversidade foram utilizados 72 insetos provenientes de três localidades brasileiras: Coxilha – RS (28°10'54"S; 52°44'46"W), Campo Verde - MT (15°25'34"S; 54°48'05" W) e Russas - CE (04°44'28"S; 38°00'14"W).

A extração do DNA genômico total foi realizada com o tórax de insetos adultos utilizando protocolo de CTAB adaptado de Black and Duteau (1997). Posteriormente, a qualidade e quantidade de DNA total foi checado em gel de agarose 0,8%.

4.2.2. Construção da biblioteca Microssatélites

A construção da biblioteca enriquecida de microssatélite foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Billotte *et al.*, (1999) no Laboratório de Análise Genética e Molecular - CBMEG da UNICAMP. Inicialmente o DNA genômico total foi digerido com as endonucleases de restrição *Afa I/Rsa I*, em seguida foi realizada a ligação de adaptadores Rsa21 e Rsa25 com posterior pré-amplificação via PCR dos fragmentos ligados. O enriquecimento da biblioteca de SSR foi realizada utilizando sondas biotinoladas, Biotina-III(CT)8 e Biotina-III(GT)8 (Promega). Posteriormente, os fragmentos enriquecidos foram clonados em vetor pGEM-T (Promega) e em seguida transformada, via eletroporação em XL1-Blue, *Escherichia coli* em célula competente (Stratagene). As bactérias transformadas com sucesso foram selecionadas utilizando o gene β -galactosidase e submetidas a crescimento overnight em meio 2YT-HMFM com ampicilina e tetraciclina.

Por último foram amplificados e sequenciados 96 clones utilizando os primers SP6 e T7 promoter em sequenciador automático modelo Genetic Analyzer 3500xL (Applied Biosystems). A qualidade das sequências obtidas foi observada no programa Sequencher 4.0.1 e a presença e ausência de regiões repetidas em tandem foi verificada utilizando o aplicativo WebSat (Martins *et al.*, 2009).

4.2.3. Desenho dos iniciadores, padronização das reações e genotipagem

Foram constatadas 16 sequências com presença de regiões repetidas em tandem. Os primers foram projetados com auxílio dos aplicativos WebSat (Martins *et al.*, 2009) e Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012) para as seguintes condições: produto de PCR com tamanho de 100 a 350 pb e temperatura de anelamento entre 55-60°C.

A padronização dos primers foi realizada em volume total de 15 μ L, contendo 50 ng de DNA; 10X (100mM Tris-HCl (pH 8,8) 500mM KCl, 1% Triton X-100, 1,5), dNTP (100 μ M de cada), 0,5mM de cada iniciador elaborado (R e F), 5 U/ μ l de Taq e MgCl₂ (25 mM), sendo o Magnésio ajustado de acordo com a necessidade da reação. As condições de amplificação para todos os 16 conjuntos de primers foram de 94 °C de desnaturação inicial, seguidos por 35 ciclos de 94 °C, 55 °C (havendo variação da temperatura de acordo com o primer) e 72 °C e uma

extensão final a 72 °C, usando termociclador modelo Verti thermal cycler (Applied Biosystems, California, USA). Seguinte amplificação, as alíquotas foram inspecionadas visualmente por meio de eletroforese em gel de agarose (2% w/v).

Baseado nos resultados preliminares, 15 primers foram selecionados e sintetizados com marcação de fluoróforos (FAN, NED, VIC e PET). Após nova padronização das reações, nós optamos por continuar com 13 conjuntos de primers agrupados em 4 reações de multiplex, sendo três delas contendo três conjuntos de primers (CI48-CI58-CI01, CI79-CI71-CI26, CI45-CI76-CI43) e uma contendo quatro conjuntos de primers (CI80-CI25-CI74-CI73), baseando-se no tamanho e no tipo do fluoróforo. As reações também foram realizadas em um volume total de 15 µL, contendo 50 ng de DNA; tampão 10X (100 mM Tris-HCl (pH 8,8) 500 mM KCl, 1% Triton X-100, 1,5), dNTP (100 µM de cada), 0,5 mM de cada iniciador elaborado (R e F), 5 U/ul de Taq e MgCl₂ (25 mM).

Para quantificação do polimorfismo de cada fragmento, 1 ul de produto de PCR das reações multiplex foi adicionado a 9,2 ul de formamida (Applied Biosystems) e 0,2 ul do GeneScan 500 Liz tamanho padrão (Applied Biosystems). A genotipagem dos SSRs foi realizada em sequenciador ABI 3500xL Genetic Analyser (Applied Biosystems). Os fragmentos foram marcados e editados usando o programa GeneMarker v.2.6.3 (SoftGenetics).

4.2.4. Análise de dados

O número de alelos por *locus*, a heterozigosidade observada (H_o), a heterozigosidade esperada (H_e) e o coeficiente de endogamia (F_{IS}) foram calculados usando o software GDA v. 1.1 (Lewis and Zaykin, 2001). O número de alelos privados, o teste de desequilíbrio de ligação, o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e a estatística F (Weir and Cockerham, 1984) foram estimados pelo software FSTAT (Goudet, 2001). A frequência de alelos nulos foi realizada usando o software FreeNA com a presença do alelo nulo inferido para frequência > 0,2 (Chapuis and Estoup, 2007).

Também estimamos a relação genética entre populações de *C. includens* usando uma abordagem Bayesiana com o software STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Realizamos 20 corridas independentes com 250.000 etapas de burn-in e 750.000 de MCMC. O número de clusters (k) testados variou de 1 a 6, conforme sugerido por Evanno *et al.*, (2005). O critério para estabelecer o melhor K foi o método ΔK estimado no Programa Structure Harvester (Earl and vonHoldt, 2012).

4.3. Resultados

Treze marcadores microssatélites foram construídos e genotipados para *C. includens*. Todos os marcadores SSR foram polimórficos com amplitude de fragmentos variando de 109 a 384 pb (Tabela 4.1). No entanto, os marcadores L1 e L4, embora polimórficos, apresentaram amplificação positiva para apenas 10% e 25% dos indivíduos testados, respectivamente. Assim, estes dois marcadores não foram utilizados nas análises subsequentes, devido ao elevado número de dados perdidos.

O número total de alelos por *locus* variou de 5 para L3, L9 e L11 a 26 para o *locus* L6 (Tabela 4.2). O número médio de alelos por *locus* considerando as três populações testadas de *C. includens* variou de 2.333 para L3 e 14.666 para L6 (Tabela 4.2). O número de alelos privados considerando as três populações e todos os 11 *loci* foi de 51, sendo 20 para Coxilha, 19 para Campo Verde e 12 para Russas. A heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) indicaram um excesso de homozigotos para todos os *loci* e populações de *C. includens* (Tabela 4.2)

Tabela 4.1. Característica dos 13 loci de microssatélites isolados para *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae).

Locus	Tamanho	Motivos †	Primers	Temperatura de Anelamento	Número de acesso Genbank
L1	236 bp *	(TG) ₇ + (GT) ₇	F - TGGCAACCAATGAAATGAAA R - ACTAGCTGTTGCCCGTGACT	58° C	MN204626
L2	384 bp (358 - 392)	(GT) ₈	F - TTTGTATGGCACCCATTGIG R - AAGCAGTGGACTGCAACAGA	62° C	MN204627
L3	209 bp (189 - 221)	(TG) ₆	F - CCTGGAGGTATAGGGTGGACT R - GCAATCAGGAATTACAGGGAAC	57° C	MN204628
L4	339 bp *	(AC) ₆	F - GAGTTCGAGGCCCTGTTTGAG R - GCGGTGAGTGGGACTTGATA	60° C	MN204629
L5	109 bp (99 - 137)	(AC) ₆	F - ATTTACGGCTTACGACAGG R - TGAACGAGCGAATTIACA	55° C	MN204630
L6	336 bp (304 - 374)	(TG) ₄ + (GT) ₁₁	F - AAGGCATAACACACCATTCG R - AACTGGCTCCTTATGCTGAA	62° C	MN204631
L7	260 bp (235 - 275)	(AC) ₅ + (CA) ₅	F - GGCAATGGTGTAAAGCAGGTT R - TTACGTAGATACCTCCTTTTAAAGT	58° C	MN204632
L8	273 bp (239 - 295)	(CA) ₆	F - GCAGAGGAGTTGGTTTGACC R - CAGCCACAAAAGGAAGGAA	62° C	MN204633
L9	222 bp (220 - 236)	(GT) ₆	F - AAATCCCAGATGCTCCTTCA R - CGGCCGTATGCCTACACGC	55° C	MN204634
L10	156 bp (142 - 173)	(ATC) ₅	F - AAGGCAAGGGAATGATGATG R - GAGACAAAGGCAGGAAGAT	62° C	MN204635
L11	217 bp (214 - 226)	(TG) ₅ + (CA) ₆	F - GCTCGTGACCCCTATTTCGAG R - GCGCCTATTGTCATCACTAT	58° C	MN204636
L12	359 bp (311 - 359)	(ACAT) ₇	F - TCCCCGAGAACCCACTCTATG R - GGAAAGAGGGCGTGACGTTTA	55° C	MN204637
L13	287 bp (286 - 334)	(GT) ₆	F - ATTTACGGCTTACGACAGG R - TGGTCTTCTCCGACGTTTTT	62° C	MN204638

* Baixa frequência de amplificação; † repetições de nucleotídeos em tandem.

Table 4.2. Estimativas de diversidade genética para cada loci microsatélites em três populações de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae)

População	Índices	L2	L3	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	Média
CERU	<i>A</i>	9	2	11	13	7	12	4	7	3	9	14	8,272
	<i>He</i>	0,879	0,198	0,882	0,899	0,865	0,903	0,167	0,836	0,427	0,848	0,924	0,712
	<i>Ho</i>	0,333	0,214	0,727	0,315	0,181	0,350	0,086	0,300	0,090	0,133	0,450	0,289
	<i>f</i>	0,627*	-0,083	0,179	0,654*	0,797*	0,618*	0,485	0,653*	0,791*	0,847*	0,519*	0,600*
	<i>Na</i>	0,192	0,000	0,082	0,299	0,354	0,282	0,115	0,274	0,247	0,380	0,242	
RSCO	<i>A</i>	11	1	15	15	6	12	4	5	4	6	13	8,363
	<i>He</i>	0,811	-	0,921	0,924	0,796	0,923	0,268	0,818	0,543	0,836	0,921	0,706
	<i>Ho</i>	0,400	-	0,666	0,200	0,000	0,222	0,125	0,272	0,166	0,000	0,187	0,203
	<i>f</i>	0,513*	-	0,281*	0,788*	1,000*	0,764*	0,540	0,677*	0,697*	1,000*	0,801*	0,715*
	<i>Na</i>	0,220	0,001	0,120	0,369	0,432	0,357	0,154	0,288	0,231	0,441	0,372	
MTCV	<i>A</i>	9	4	16	16	11	13	2	8	4	7	11	9,181
	<i>He</i>	0,853	0,483	0,895	0,926	0,887	0,921	0,119	0,923	0,547	0,869	0,910	0,758
	<i>Ho</i>	0,473	0,076	0,590	0,300	0,210	0,157	0,041	0,428	0,125	0,111	0,357	0,261
	<i>f</i>	0,451*	0,846*	0,345*	0,682*	0,767*	0,832*	0,656	0,555	0,775*	0,878*	0,616*	0,663*
	<i>Na</i>	0,282	0,267	0,145	0,317	0,350	0,390	0,119	0,235	0,247	0,391	0,279	
Mean/locus	<i>Ar</i>	14	5	18	26	15	17	5	9	5	11	17	
	<i>A</i>	9,666	2,333	14,000	14,666	8,000	12,333	3,333	6,666	3,666	7,333	12,666	8,606
	<i>He</i>	0,848	0,227	0,900	0,916	0,849	0,916	0,185	0,859	0,506	0,851	0,918	0,725
	<i>Ho</i>	0,402	0,097	0,661	0,271	0,130	0,243	0,084	0,333	0,127	0,081	0,331	0,251
	<i>f</i>	0,532	0,581	0,269	0,708	0,850	0,739	0,548	0,627	0,752	0,907	0,646	0,659

* *A*: número de alelos; *He*: heterozigosidade esperada; *Ho*: heterozigosidade observada; *f*: coeficiente de Endogamia; *Na*: frequência de alelos nulos; *Ar*: número total de alelos por locus.

* Coeficiente significativo do HWE ($P < 0,05$).

Não houve evidência de equilíbrio de ligação entre qualquer um dos *loci* em qualquer população, confirmando que eles podem ser usados como marcadores genéticos independentes. O teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg indicou que quatro *loci* estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg para pelo menos uma população testada (L3, L5, L9, L10), enquanto os outros não estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 4.2). Os marcadores L6, L7, L8, L10, L11, L12 e L13 apresentaram frequência de alelos nulos $> 0,20$.

A estatística F revelou uma baixa estrutura populacional entre as populações de *C. includens* ($F_{ST} = 0,013$) e alta endogamia ($F_{IS} = 0,658$ e $F_{IT} = 0,662$). A análise de STRUCTURE juntou os indivíduos de *C. includens* em quatro agrupamentos genéticos ($K = 4$), entretanto, ao comparar os agrupamentos considerando cada indivíduo, não foi identificada nenhuma estruturação genética de *C. includens* entre os locais amostrados (Figura 4.1).

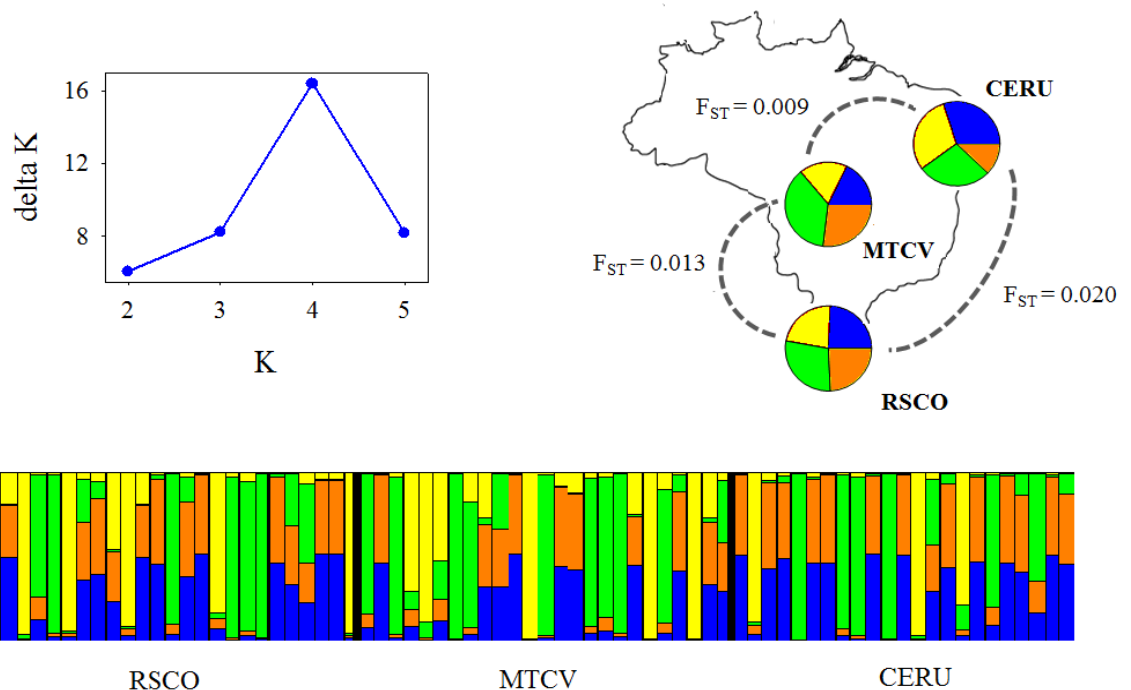


Figura 4.1. Padrão de estrutura genética baseado em 11 marcadores microssatélites de três populações de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae). Cada barra representa um indivíduo e as cores representam população putativa ($K = 4$). As atribuições médias do cluster em cada local são exibidas como gráficos de pizza. O F_{ST} foi estimado usando o software FreeNA (Chapuis and Estoup 2007).

4.4. Discussão

Marcadores microssatélites são extensivamente empregados em estudos genéticos de animais, plantas e fungos (Varshney *et al.*, 2005; Dutech *et al.*, 2007; Chapman *et al.*, 2009).

Neste estudo, nós desenvolvemos com sucesso os primeiros marcadores microssatélites para *C. includens*, uma das pragas mais severas relatada atacando diversas culturas agrícolas nas Américas. Os *loci* SSR segregam independentemente, são polimórficos e geraram um elevado número de alelos, mesmo aplicados em um número limitado de indivíduos, confirmando sua utilidade para estudos genéticos de *C. includens*. Dois marcadores (L1 e L4), apesar do baixo sucesso de amplificação, mostraram ser polimórficos e podem ser utilizados em trabalhos futuros, mas dependerão de uma melhor otimização das reações de amplificação (PCR). Outro traço interessante nesses marcadores moleculares foi o elevado número de alelos privados, 51 nos 11 marcadores SSR. Alelos privados são úteis para caracterizar a estrutura genética e o fluxo gênico de uma espécie (Slatkin, 1985).

As análises de heterozigosidade revelaram alta endogamia nas populações de *C. includens*, onde a heterozigosidade observada (H_o) foi significativamente menor que a heterozigosidade esperada (H_E). Essa alta endogamia está de acordo com o desvio significativo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e com a estimativa da presença de alelos nulos em alguns loci (Chakraborty *et al.*, 1992). Desvios de Equilíbrio de Hardy-Weinberg e presença de alelos nulos são recorrentes em estudos com SSRs em populações naturais de espécies da ordem Lepidoptera (mariposas e borboletas) e podem promover superestimação da diferenciação populacional (Chapuis and Estoup 2007; Chapuis *et al.*, 2008), o que aqui não ocorreu.

Huang *et al.*, (2016) sugerem que a frequência de um alelo nulo deve ser considerada individualmente para cada *locus* e que apenas os *loci* com um valor de frequência de alelo nulo $> 0,50$ devem ser excluídos. Em alguns estudos populacionais com pragas da família Noctuidae e com outras pragas agrícolas, poucas distorções foram observadas na estrutura genética e no fluxo gênico quando comparamos a análise usando loci SSR com frequência de alelos nulos $> 0,2$ ou excluindo eles (Endersby *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2017; Leite *et al.*, 2017). Este fato pode ser explicado pela alta homozigosidade natural e baixa estrutura genética desse inseto-praga, devido à sua alta capacidade de dispersão, recente expansão populacional e sucessivos eventos de (re) colonização em culturas agrícolas anuais.

As análises de F_{ST} e STRUCTURE indicaram a ausência de estrutura genética e alta similaridade genética entre as populações de *C. includens*, apesar da alta distância geográfica entre os locais amostrados. Duas hipóteses podem ser traçadas para essa semelhança genética entre populações, alto fluxo gênico (Palma *et al.*, 2015) e recente expansão geográfica em culturas agrícolas. Ambas as hipóteses devem ser melhor testadas para *C. includens* utilizando um maior número de subpopulações de pragas coletadas em diferentes regiões do Brasil e apoiadas por diferentes marcadores moleculares.

4.5. Considerações Finais

Esperamos que os marcadores SSRs aqui desenvolvidos se tornem ferramentas úteis para futuros estudos sobre a ecologia, demografia, dinâmica do hospedeiro e fluxo gênico de *C. includens*. Essas informações são cruciais para entender os recentes surtos populacionais de *C. includens* na América do Sul. Além disso, estudos da dinâmica populacional histórica e atual podem orientar estratégias de manejo integradas e sustentáveis dessa praga, bem como direcionar as aplicações de agrotóxicos e a implementação de culturas geneticamente modificadas a fim de prevenir e conter a evolução da resistência de *C. includens* a estas táticas de controle.

Referências

- A'Hara, S., Cottrell, J., 2013. Development and characterisation of ten polymorphic microsatellite markers for the pine-tree lappet moth *Dendrolimus pini* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Conserv. Genet. Resour.* 5: 1135–1137.
- Arias, O., Cordeiro, E., Corrêa, A. S., Domingues, F. A., Guidolin, A. S., Omoto, C., 2019. Population genetic structure and demographic history of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): implications for insect resistance management programs. *Pest Management Science*, 75: 2948–2957.
- Baldin, E. L. L., Lourenção, A. L., Schlick-Souza, E. C., 2014. Outbreaks of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) in common bean and castor bean in São Paulo State, Brazil. *Bragantia*, 73: 458-465.
- Billotte, N.; Lagoda, P.J.L.; Risterucci, A.M.; Baurens, F.C., 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, v.54, p.277-288.
- Black, W. C., Duteau, N. M., 1997. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. In: Crampton, J. M., Beard, C. B., Louis, C. *The molecular biology of insect disease vectors: a methods manual*. London: Chapman & Hall. P.361-373.
- Chakraborty, R., De Andrade, M., Daiger, S.P., Budowle, B., 1992. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing and their implications in forensic applications, *Annals of Human Genetics*, vol. 56 p. 45-57.
- Chapman, J. R., Nakagawa, S., Coltman, D. W., Slate, J., & Sheldon, B. C., 2009. A quantitative review of heterozygosity–fitness correlations in animal populations. *Molecular Ecology*, 18(13), 2746-2765.

- Chapuis, M. P., Estoup, A., 2007. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, v.24, n.3, p. 621–63.
- Chapuis, M. P., Lecoq, M., Michalakis, Y., Loiseau, A., Sword, G. A., Piry, S., & Estoup, A., 2008. Do outbreaks affect genetic population structure? A worldwide survey in *Locusta migratoria*, a pest plagued by microsatellite null alleles. *Molecular Ecology*, 17(16), 3640–3653.
- Corrêa, A. S., Cordeiro, E. M., Omoto, C., 2019. Agricultural insect hybridization and implications for pest management. *Pest Management Science*, 75: 2857–2864.
- Dutech, C., Enjalbert, J., Fournier, E., Delmotte, F., Barres, B., Carlier, J. ... & Giraud, T., 2007. Challenges of microsatellite isolation in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 44(10), 933–949.
- Earl, D.A., von Holdt, B.M., 2012. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4:359–361.
- Endersby, N. M., Hoffmann, A. A., Mckechnie, S. W., Weeks, A.R., 2007. Is there genetic structure in populations of *Helicoverpa armigera* from Australia? *Entomologia Experimentalis Et Applicata*, Dordrecht, v.122, n.3, p. 253–263.
- Evanno, G., Regnauts, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
- Goudet, J., 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). See <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- Herzog, D.C., 1980. Sampling soybean looper on soybean. In: Kogan, M., Herzog, D.C. (Eds.), *Sampling Methods in Soybean Entomology*. Springer Verlag, New York, pp. 141–162.
- Huang, K., Ritland, K., Dunn, D. W., Qi, X., Guo, S., & Li, B., 2016. Estimating relatedness in the presence of null alleles. *Genetics*, 202(1), 247–260.
- Jing, S., Zheng, B., Qiao, L., Zhang, K., Chen, G., Guo, S., Huang, X., Gao, Y., Zhang, L., Yuan, H., 2016. Characterization of eleven microsatellite markers for the tea geometrid *Ectropis obliqua* (Lepidoptera: Geometridae). *Appl. Entomol. Zool.* 51: 673–676.
- Kogan, M.; Turnipseed, S.G., 1987. Ecology and management of soybean arthropods. *Annual Review of Entomology*, v.32, p.507–538.

- Leite, N. A., Corrêa, A. S., Alves-Pereira, A., Campos, J. B., Zucchi, M. I., Omoto, C., 2016. Cross-species amplification and polymorphism of microsatellite loci in *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazilian cropping systems. *Genet. Molec. Res.* 15(2): gmr.15027890
- Leite, N.A., Correa, A.S., Michel, A.P., Alves-Pereira, A., Pavinato, V.A.C., Zucchi M.I., Omoto, C., 2017. Pan-American Similarities in Genetic Structures of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) With Implications for Hybridization. *Environ Entomol.* 1; 46(4):1024-1034.
- Lewis, P.O., Zaykin, D., 2001. Genetic Data Analysis (GDA), v. 1.1. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, Storrs.
- Martins, W. S., Lucas, D. C. S., Neves, K. F. S., Bertioli, D. J., 2009. WebSat - A web software for microsatellite marker development. *Bioinformatics.* 3(6): 282–283.
- Mason, A. S., 2015. SSR Genotyping, pp. 77–89 In J. Batley (ed.), *Plant genotyping*. Springer, New York, NY.
- McGregor, C. E., Lambert, C. A., Greyling, M. M., Louw, J. H., Warnich, L., 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. *Euphytica*, 113: 135-144.
- Palma, J., Maebe, K., Guedes, J.V.C., Smagghe, G., 2015. Molecular Variability and Genetic Structure of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae), an Important Soybean Defoliator in Brazil. *PLoS ONE* 10(3): e0121260.
- Pereira, R. R., Neves, D. V. C., Campos, J. N., Júnior, P. S., Hunt, T. E., Picanço, M. C., 2018. Natural biological control of *Chrysodeixis includens*. *Bull. Entomol. Res.* 108: 831-842.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Santos, S. R., Specht, A., Carneiro, E., Paula-Moraes, S. V., Casagrande, M. M., 2017. Interseasonal variation of *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the Brazilian Savanna. *Rev. Bras. Entomol.* 61:294–299.
- Seymour, M., Perera, O. P., Fescemyer, H. W., Jackson, R. E., Fleischer, S. J., Abel, C. A., 2016. Peripheral genetic structure of *Helicoverpa zea* indicates asymmetrical panmixia. *Ecol. Evol.* 6: 3198–3207.
- Slatkin, M., 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, 39(1), 53-65.
- Soares, P. L., Cordeiro, E. M. G., Santos, F. N. S., Omoto, C., Correa, A. S., 2018. The reunion of two lineages of the Neotropical brown stinkbug on soybean lands in the heart of Brazil. *Sci. Rep.* 8: 2496.

- Song, W., Cao, L. J., Wang, Y. Z., Li, B. Y., & Wei, S. J., 2017. Novel microsatellite markers for the oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) and effects of null alleles on population genetics analyses. *Bulletin of entomological research*, 107(3), 349-358.
- Sosa-Gómez, D. R., Delpin, K. E., Moscardi, F., Nozaki, M. H., 2003. The Impact of Fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson Epizootics and on Populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on Soybean. *Neotropical Entomology*, v.32(2), p.287-291.
- Specht, A. Paula-Moraes, S. V., Sosa-Gómez, D. R., 2015. Host plants of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae, Plusiinae). *Revista Brasileira de Entomologia*, v.59, p.343–345.
- Stacke, R. F., Giacomelli, T., Bronzatto, E. S., Halberstadt, S. A., Garlet, C. G., Muraro, D.S., Guedes, J. V. C., Bernardi, O., 2019. Susceptibility of Brazilian Populations of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) to Selected Insecticides. *Journal of Economic Entomol* v.112, p.1378–1387.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., Rozen, S. G., 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40, 1-12.
- Varshney, R. K., Graner, A., & Sorrells, M. E., 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology*, 23(1), 48-55.
- Wei, S.J., Shi, B.C., Gong, Y.J., Jin, G.H., Chen, X.X., Meng, X.F., 2013. Genetic structure and demographic history reveal migration of the diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) from the southern to northern regions of China. *PLoS ONE*, 8(4):e59654. Pmid: 23565158.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.

5. DINÂMICA POPULACIONAL TEMPORAL DE *Chrysodeixis includens* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) E ASSOCIAÇÃO COM HOSPEDEIROS EM QUATRO REGIÕES BRASILEIRAS

RESUMO

Os constantes surtos populacionais da falsa-medideira-da-soja, *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) nos cultivos de soja do Brasil são comumente associadas as mudanças na forma de cultivo e expansão dessa cultura para novos ambientes. Aqui, nós investigamos as explosões populacionais desse inseto-praga em quatro estados considerados importantes produtores de soja, em um período de 54 semanas. Insetos adultos foram coletados com auxílio de armadilhas de feromônio semanalmente. Posteriormente, nós analisamos as diferenças nos valores das taxas de Carbono $\delta^{13}\text{C}/\delta^{12}\text{C}$ presentes em plantas C3 e C4 e marcadores bioquímicos para algodão no intuito de investigar os hospedeiros de origem das mariposas capturadas. Por fim, com o uso de marcadores microssatélites, obtivemos informações sobre o fluxo gênico e a estrutura populacional no espaço e no tempo das subpopulações de *C. includens* coletadas em cada região. Um total de 31,017 insetos foram coletados nos quatro pontos no período de dezembro de 2014 a dezembro de 2015. O pico de captura das mariposas de *C. includens* em cada região variou entre 60 a 90 dias após o início do plantio da soja, com rápida diminuição na densidade populacional na ausência de cultivos de soja e algodão nas áreas. Os marcadores de isótopos estáveis de Carbono ($\delta^{13}\text{C}$) indicaram que todas as mariposas de *C. includens* são provenientes de larvas alimentadas em plantas tipo C3. Destas, 7,76% de mariposas de *C. includens* coletadas no total atestaram positivo para o marcador bioquímico heliocídio H, indicando que as larvas alimentaram-se de algodão e todas as mariposas foram coletadas em Luís Eduardo Magalhães - BA (BALM). Para todas as subpopulações analisadas, as médias de heterozigosidades observadas (H_o) variaram de 0,107 a 0,789, enquanto as médias de heterozigosidade esperadas (H_e) variaram de 0,141 a 0,933. Encontramos uma baixa estrutura populacional total ($F_{ST} = 0,015$), no entanto, as análises de F_{ST} par-a-par indicaram uma estruturação populacional inicial para região geográfica. Nossos dados indicam que a densidade populacional de *C. includens* está diretamente associada a cultura da soja e que as populações de *C. includens* tem baixa capacidade de dispersão entre regiões produtoras no Brasil, visto que, mariposas adultas com marcação bioquímica positiva para o algodão foram encontradas apenas em áreas com plantio de algodão. Assim, a baixa estruturação genética espacial encontrada em *C. includens* é devido a recente expansão demográfica das pragas associada a expansão geográfica de cultivos para as regiões mais ao Norte do Brasil.

Palavras-chave: Lepidoptera; Amplitude de hospedeiros; Isótopos estáveis; Estrutura genética; Microssatélites

Temporal Population Dynamics of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) and Association with hostes in four Brazilian Regions

ABSTRACT

The population outbreaks of the soybean looper, *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean crops in Brazil are commonly associated with changes in the form of cultivation and expansion of this crop to new environments. Here, we investigate the population density of this insect pest in four Brazilian states over a period of 54 weeks. We also analyzed differences in the values of carbon rates $\delta^{13}\text{C} / \delta^{12}\text{C}$ present in C3 and C4 plants and biochemical marker for cotton in order to investigate the larval hosts of origin of the captured moths. Finally, using microsatellite markers, we intend to obtain information on gene flow and population structure in space and time for *C. includens* subpopulations collected in each region. Total of 31,017 insects were collected at the four sites from December 2014 to December 2015. The peak of capture of *C. includens* moths in each region ranged from 60 to 120 days after soybean planting, with rapid decrease in population density in the absence of soybean and cotton crops in the areas. The stable carbon isotope markers ($\delta^{13}\text{C}$) indicated that all *C. includens* moths come from larvae fed on C3 type plants and only 7.76% of *C. includens* moths collected in total tested positive for the biochemical marker heliocide H, indicating that the larvae fed on cotton and all moths were collected in Luís Eduardo Magalhães. For all subpopulations analyzed, the observed heterozygosity (H_o) ranged from 0.107 to 0.789, while the expected heterozygosity (H_e) ranged from 0.141 to 0.933. We found a low global population structure ($F_{ST} = 0.015$), however, F_{ST} paired analyzes indicated an initial population structure for the geographic region. Our data indicate that the population density of *C. includens* is directly associated with soybean culture and that the populations of *C. includens* have low dispersion capacity between producing regions in Brazil, since adult moths with positive biochemical mark for cotton were found only in regions with cotton planted areas. Thus, the low spatial genetic structure found in *C. includens* should be to the recent demographic expansion of the pest associated with the geographical expansion of crops to the northern regions from Brazil.

Keywords: Lepidoptera; Ost range; Stable isotopes; Genetic sctructure, Crosatellites

5.1. Introdução

Em um agroecossistema é comum ocorrer adaptações que podem acarretar em mudança sensíveis na densidade populacional de uma espécie, promovendo o surgimento de novas pragas e a ocorrência de altas populações de pragas anteriormente consideradas

secundárias (Wallner, 1987). No início dos anos 2000, devido a diversas mudanças no sistema de cultivo da cultura da soja (Spehar, 1995; Camargo, 2001; Stansly and Orellana, 1990; Sosa-Gómez *et al.*, 2003), constantes surtos populacionais da falsa-medideira-da-soja, *Chrysodeixis includens*, foram observados em todo o Brasil, elevando o status dessa praga para uma das mais importantes pragas da cultura nos últimos anos (Moscardi *et al.*, 2012; Guedes *et al.*, 2011).

Chrysodeixis includens possui ocorrência em todo o continente Americano (Alford and Hammond, 1982), apresentando hábito migratório na América do Norte (Mason *et al.*, 1989; Harding, 1976). Recebe destaque pela alta polifagia, já que é capaz de alimentar-se de aproximadamente 39 famílias de plantas, entre as quais estão várias plantas de importância econômica (Specht *et al.*, 2015). Porém, apesar do alto grau de polifagia, é considerada praga-chave, principalmente, nas culturas da soja e algodão. No Brasil, pouco se sabe sobre a dinâmica populacional espacial e temporal de *C. includens*, uma vez que o inverno ameno não torna comum o comportamento de migração de espécies de insetos ao longo do ano. Além disso, a grande disponibilidade de hospedeiros não cultiváveis podem ser eficientes hospedeiros alternativos em determinados períodos do ano.

O cultivo de soja no Brasil atende a um calendário variável ao longo do território brasileiro, que depende principalmente da época de precipitação em cada região do país (Garcia *et al.*, 2007; Conab, 2015). Entretanto, em toda a época de plantio nas diferentes regiões brasileiras é possível encontrar, em alta densidade populacional, indivíduos de *C. includens* em condições de campo. No entanto, pouco se conhece sobre a flutuação populacional desta espécie dentro da paisagem agrícola, uma vez que os cultivos de soja são concentrados em determinados períodos do ano em cada região e podem ser cultivados em áreas próximas a cultivos de algodão, milho e hortaliças. Não existem estudos que inferem com precisão como os indivíduos presentes em uma determinada área se comportam na entressafra das culturas da soja e algodão e, posteriormente, qual é a origem geográfica dos indivíduos que infestam inicialmente os novos cultivos de soja e algodão. Nós podemos hipotetizar que esses indivíduos permaneçam em baixas densidades populacionais na área até uma disponibilidade maior de alimento, ou que podem dispersar/migrar para outras áreas e culturas retornando após a implementação do cultivo.

Uma das formas de se conhecer a dinâmica ecologia de uma espécie é o uso de isótopos estáveis de Carbono $\delta^{13}\text{C}$ (Gould *et al.*, 2002; Madeira *et al.*, 2014; Tsafack *et al.*, 2016; Seymour *et al.*, 2016). Este tipo de estudo é realizado tomando como base as diferenças nos valores das taxas de Carbono $\delta^{13}\text{C}/\delta^{12}\text{C}$ presentes em plantas C3 (como a soja, algodão herbáceo, amendoim e girassol) e C4 (como a cana-de-açúcar, milho e sorgo), já que essas plantas diferem no mecanismo de fixação de carbono e consequente na proporção de Carbono

$\delta^{13}\text{C}/\delta^{12}\text{C}$ fixado (Hyodo, 2015). Alguns marcadores bioquímicos também podem ser úteis, principalmente, para discriminar com maiores detalhes o conjunto de plantas alimentados dentro de cada grupo C3 ou C4. Por exemplo, estudos realizados com *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) utilizando marcadores de gossipol demonstram que os insetos adultos coletados em armadilhas de feromônio em áreas do entorno de cultivos de algodão não são oriundos da cultura do algodão e sim de áreas adjacentes (Head *et al.*, 2010).

Uma outra forma de analisar a dinâmica das populações de uma espécie é caracterizando a frequência alélica e o fluxo gênico entre suas populações putativas (Roderick, 1996; Seymour *et al.*, 2016). Baseado no fluxo de alelos e na fixação dos mesmos em uma determinada área, nós podemos inferir o quanto uma população é similar/diferente de outra população (Hamrick, 1983; Slatkin, 1987). O índice mais utilizado e eficiente para mensurar este tipo de estruturação é o índice de fixação (F_{ST}) implementado por Sewall Wright (1951, 1978). Esse índice infere o grau de endocruzamento dentro de uma subpopulação em relação ao total da população (todas as subpopulações combinadas). Assim quanto maior o F_{ST} , maior é o isolamento de uma determinada subpopulação em relação as demais subpopulações. No entanto, para garantir a eficiência desse índice, o marcador molecular deve ser eficiente em estimar a heterozigosidade dos loci genotipados nos indivíduos de cada subpopulação estudada. Dessa forma, os marcadores microssatélites (SSR) são marcadores bastante úteis para este tipo de estudo devido sua alta capacidade de detectar a heterozigosidade, visto que é um marcador que prospecta regiões do genoma (loci) que possuem uma ampla variação e consequente um grande número de alelos por *locus* (Ferreira and Grattapaglia, 1996).

Nesse contexto, aqui realizamos um levantamento da flutuação populacional semanal de *C. includens* em quatro regiões agrícolas no Brasil, ao longo de um período de 54 semanas (Dezembro de 2014 a Dezembro de 2015). Posteriormente, nós submetemos os indivíduos coletados de *C. includens* semanalmente, via armadilha de feromônio, a análise de isótopos estáveis estimando os valores de Carbono $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e a análise de marcador bioquímico para identificação do algodão, com intuito de acessar o grupo de hospedeiros em qual as larvas se alimentaram. Por último, nós aplicamos 11 marcadores microssatélites, desenvolvidos para *C. includens*, com o objetivo de estimar os parâmetros de diversidade genética, a estrutura populacional e o fluxo gênico de *C. includens* a cada trimestre por um período de 54 semanas dentro e entre quatro regiões produtoras de grãos no Brasil.

5.2. Material & Métodos

5.2.1. Coleta de *C. includens*

As coletas de *C. includens* foram realizadas em parcerias com a empresa Monsanto do Brasil Ltda de Dezembro de 2014 a Dezembro de 2015. Para estas coletas, duas armadilhas com feromônio acoplado as gaiolas de pano foram instaladas nas cidades de Não-me-toque – RS, Rolândia – PR, Sorriso – MT e Luís Eduardo Magalhães – BA (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Local de coleta dos indivíduos de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) em quatro regiões brasileiras no ano de 2015.

Cidade, Estado	Região agrícola	Coordenadas geográficas (latitude/logintude)
L. E. Magalhães, BA	Extremo Oeste Baiano	-11,9591 / -46,1191
Sorriso, MT	Norte Matograssense	-12,4624 / -55,6842
Rolândia, PR	Norte Central Paranaense	-23,3130 / -51,4913
Não-me-toque, RS	Noroeste Rio-Grandense	-28,3227 / -52,7125

Semanalmente os indivíduos foram contados para obter o número total de indivíduos coletados em cada armadilha. A flutuação populacional foi inferida utilizando a média de indivíduos coletados nas duas armadilhas semanalmente. Nós também coletamos no banco de dados *Kleffmann Group database AMIS® 2014/2015* (consultado em Novembro de 2018) a área plantada/ocupada com as culturas da soja e algodão em cada mês no período de coleta dos insetos nas regiões produtoras citadas na Tabela 5.1 (ver Figura 5.1) para correlacionar com a flutuação populacional e os dados de isótopos estáveis e biomarcador para algodão.

Um número máximo de 20 indivíduos, coletados por semana nas armadilhas descritas acima, foram liofilizados e armazenados em tubos tipo eppendorf de 2 mL para posteriormente serem utilizados nas análises de isótopos estáveis, marcador bioquímico para algodão e análise de marcadores moleculares.

5.2.2. Análise de isótopos estáveis e marcador bioquímico para algodão

A análise dos valores de Carbono $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e do marcador bioquímico para algodão foram mensuradas utilizando os tecidos das asas, torác e abdome das mariposas coletadas nos quatro pontos de amostragem descritos anteriormente. Todos os procedimentos de isótopos

estáveis e marcador bioquímico foram terceirizados e realizados pela empresa “Monsanto Company, St. Louis, MO”.

Na ocasião, as asas das mariposas liofilizadas foram embrulhadas em papel alumínio e inseridas em um reator de combustão a 950°C. O material foi completamente queimado em CO₂ para análise de $\delta^{13}\text{C}$. O gás CO₂ foi separado utilizando uma coluna de GC empacotada e depois acoplada em um fluxo contínuo através de um Thermo ConFlo IV em uma interface com o IRMS Thermo Delta V Plus (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) para análise de $\delta^{13}\text{C}$. Durante a análise de cada amostra, um gás de referência de altíssima pureza era introduzido através da interface ConFlo IV em um momento que não se sobreponha aos picos da amostra para controlar a variação do instrumento. Os valores de carbono $\delta^{13}\text{C}$ foram inferidos no pacote de software IRMS Isodat. Os padrões USGS40 e USGS41 (United States Geological Survey) com valores δ conhecidos foram utilizados para calcular os valores finais de $\delta^{13}\text{C}$ das amostras desconhecidas em cada ciclo de análise. A inclinação e o intercepto das curvas foram também utilizados para $\delta^{13}\text{C}$. As classificações dos indivíduos pela fonte alimentar foram realizadas de acordo com o protocolo de Gould *et al.* (2002). No qual separa as mariposas com valores entre -20 e -18% aquelas oriundas de lagartas alimentadas em plantas C3 e os valores entre -17 e -15% aquelas oriundas de lagartas alimentadas em plantas C4.

O marcador de algodão foi produzido a partir do heliocídio H, um metabólito secundário do algodão, por meio de extração com hidrólise ácida (see Dourado *et al.*, 2020). Um total de 135 indivíduos de *C. includens* criados em laboratório em diferentes hospedeiros, que incluíam algodão, foram testados utilizando esse método para padronização. Após a padronização, mariposas de *C. includens* coletadas semanalmente em condições de campo foram analisadas para determinar a associação com a cultura do algodão.

5.2.3. Extração de DNA, amplificação e genotipagem das amostras de *Chrysodeixis includens*

Para extração de DNA utilizamos aproximadamente 70 indivíduos selecionados por trimestre em cada um dos quatro pontos de coleta, totalizando 256 indivíduos, que melhor representaram a flutuação populacional da praga durante o ano de 2015. A extração do DNA genômico total foi realizada a partir da cabeça e duas pernas de cada inseto adulto com o método baseado na lise celular por CTAB adaptado de Black and Duteau (1997). Posteriormente, a qualidade e quantidade de DNA total foi checado em gel de agarose (0,8% w/v).

As amplificações foram realizadas individualmente utilizando 11 iniciadores previamente desenvolvidos para *C. includens*, seguindo o protocolo citado anteriormente no

capítulo anterior desta tese (Silva *et al.*, 2019). Após as amplificações, as alíquotas foram inspecionadas visualmente por meio de eletroforese em gel de agarose (2% w/v). As amostras que apresentaram resultados satisfatórios foram diluídas para 30ul e realizada a montagem das reações multiplex, como indicado pelo mesmo protocolo. A qualificação do polimorfismo dos fragmentos foi gerada no laboratório de Análise Genética e Molecular - CBMEG da UNICAMP em sequenciador ABI 3500xL Genetic Analyser (Applied Biosystems). O programa GeneMarker v.2.6.3 (SoftGenetics) foi utilizado para marcar e editar os fragmentos.

5.2.4. Análise dos marcadores microssatélites nos locais amostrados

O número de alelos por *locus*, a heterozigosidade observada (H_O), a heterozigosidade esperada (H_E) e o coeficiente de endogamia (F_{IS}) foram estimados utilizando o software GDA v. 1.1 (Lewis and Zaykin, 2001). O número de alelos privados, o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e a estatística F (Weir and Cockerham, 1984) foram obtidos utilizando o software FSTAT (Goudet, 2001). O aplicativo Arlequin 3.1. (Excoffier *et al.*, 2006) foi utilizado para gerar as Análises de Variância Molecular (AMOVA) testando a estrutura genética entre as subpopulações (dois níveis hierárquicos) e entre os pontos de coletas (três níveis hierárquicos). Nós também geramos no Arlequin os valores de F_{ST} par-a-par entre as subpopulações. Com auxílio do software R, construímos um heatmap para observação dos valores de F_{ST} e um cladograma de distância genética. Por último, nós também utilizamos o software STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) para estimar a relação genética entre indivíduos dentro e entre as subpopulações, testando o número de agrupamentos genéticos (k) de 2 a 19, conforme sugerido por Evanno *et al.* (2005). O critério para estabelecer o melhor K foi o método ΔK estimado no Programa Structure Harvester (Earl and vonHoldt, 2012).

5.3. Resultados

5.3.1. Flutuação populacional, isótopos estáveis e marcador bioquímico

Os cultivos de soja nos quatro locais amostrados de dezembro de 2014 a dezembro de 2015 (54 semanas), teve início entre os meses de setembro e outubro estendendo-se até abril e maio. A flutuação populacional de adultos de *C. includens* capturados nas armadilhas de feromônio começou a ser estimada a partir dos 45-90 dias após o início do cultivo da soja em todas as regiões amostradas. Os picos populacionais ocorreram a partir dos 60-120 dias após o plantio da cultura da soja, com declínio acentuado após esse período (Figuras 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4). Um total de 31,017 insetos foram coletados no período de dezembro de 2014 a novembro

de 2015. O maior número de indivíduos foram coletados em Rolândia - PR (PRRO), com um total de 13.219 indivíduos coletados nas 54 semanas. Enquanto Luís Eduardo Magalhães-BA (BALM), Sorriso- MT (MTSO) e Não-me-toque-RS (RSNM), apresentaram um total de 6.777, 8.094 e 2.927 indivíduos, respectivamente.

As estimativas dos valores de $\delta^{13}\text{C}$ e do marcador bioquímico foram realizadas em 2.626 indivíduos, dos quais todos possuíam valores $\delta^{13}\text{C}$ entre -20 e -18% sugerindo desenvolvimento em plantas com metabolismo C3 (como a soja, algodão herbáceo, amendoim e girassol) (Figuras 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5.). A partir dessa informação foi realizada a identificação com biomarcador derivado de algodão, nos 2.626 indivíduos, e constatamos que independente da população putativa, apenas 7,76 % de *C. includens* coletados eram oriundos da cultura do algodão, todos presentes em Luís Eduardo Magalhães - BA (BALM) (Figura 5.2).

A distribuição de *C. includens* coletados em Luís Eduardo Magalhães - BA (BALM) apresentou maior número de indivíduos na 1ª semana de coleta que ocorreu durante o mês de dezembro de 2014, período de cultivo da cultura da soja e algodão na região. No entanto, a partir da 4ª semana, o número de indivíduos coletados sofreu decréscimo e na 17ª semana (119 dias) voltou a aumentar, se mantendo estável até a 32ª semana (224 dias). Os indivíduos que possuíam algodão como hospedeiro inicial foram identificados apenas na amostragem de Luís Eduardo Magalhães, BA (BALM), e começaram a ser capturados em armadilha a partir da 13ª semana (91 dias), se mantendo até a 40ª semana (280 dias) (Figura 5.1). O pico de indivíduos de *C. includens* para Luís Eduardo Magalhães, BA (BALM), foi registrado 60 dias após o início do plantio da cultura da soja.

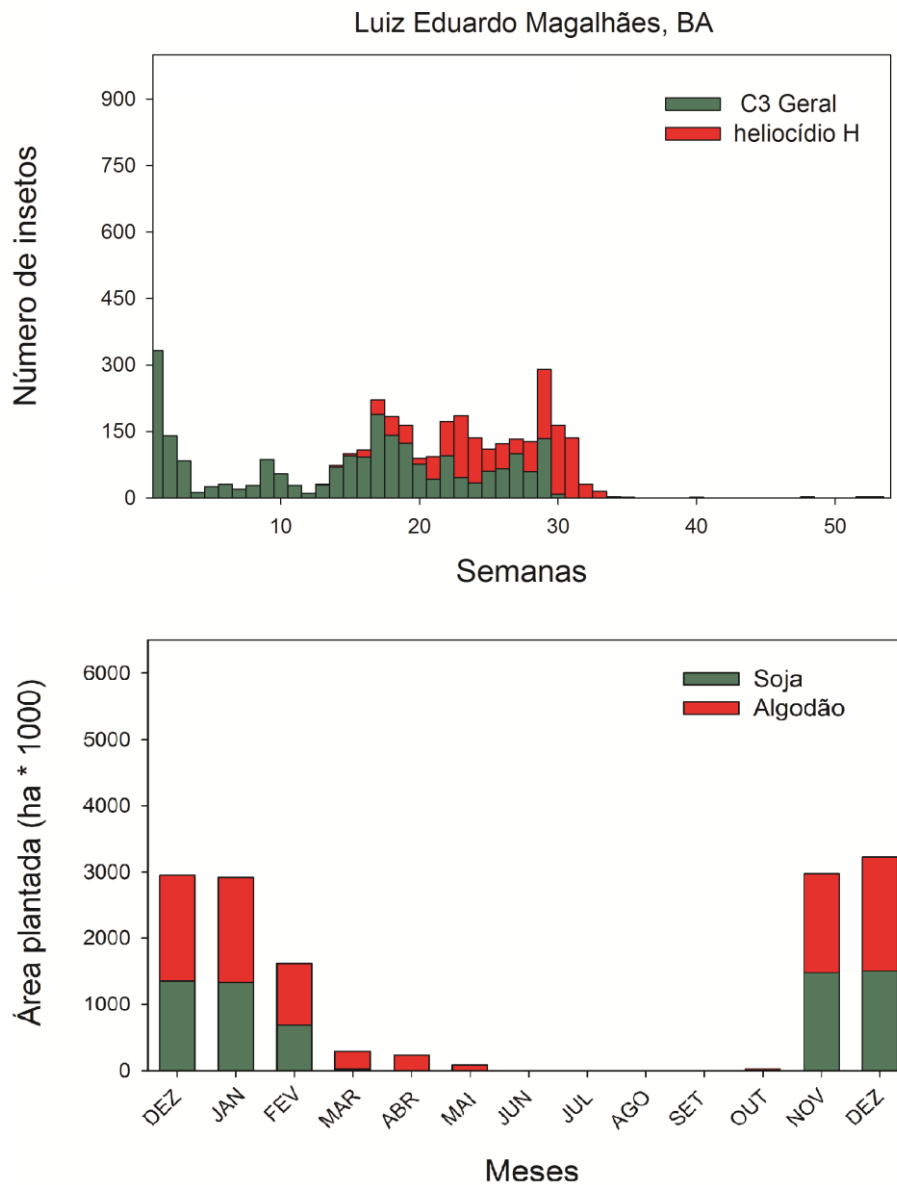


Figura 5.1. (A) Flutuação populacional de indivíduos de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) capturados com armadilhas de feromônio em Luís Eduardo Magalhães na Bahia. As cores das barras diferenciam indivíduos alimentados em plantas C3 (verde) e a cor vermelha indivíduos com detecção positivas para heliocídio H, um metabólito secundário do algodão (Vermelho). (B) Área plantada (ha * 1000) das culturas da soja e algodão de dezembro de 2014 a dezembro de 2015 na região do Extremo Oeste Baiano.

Em Sorriso-MT (MTSO) a distribuição de *C. includens* foi gradual e crescente de acordo com o início da safra 2014/2015 na região. Os maiores números de indivíduos foram coletados na 10^a e 11^a semanas (70-77 dias) após a instalação das armadilhas. A partir da 12^a semana, o número de indivíduos coletados sofreu uma redução (Figura 5.2). O pico de indivíduos de *C. includens* foi registrado 120 dias após o início do plantio da cultura da soja.

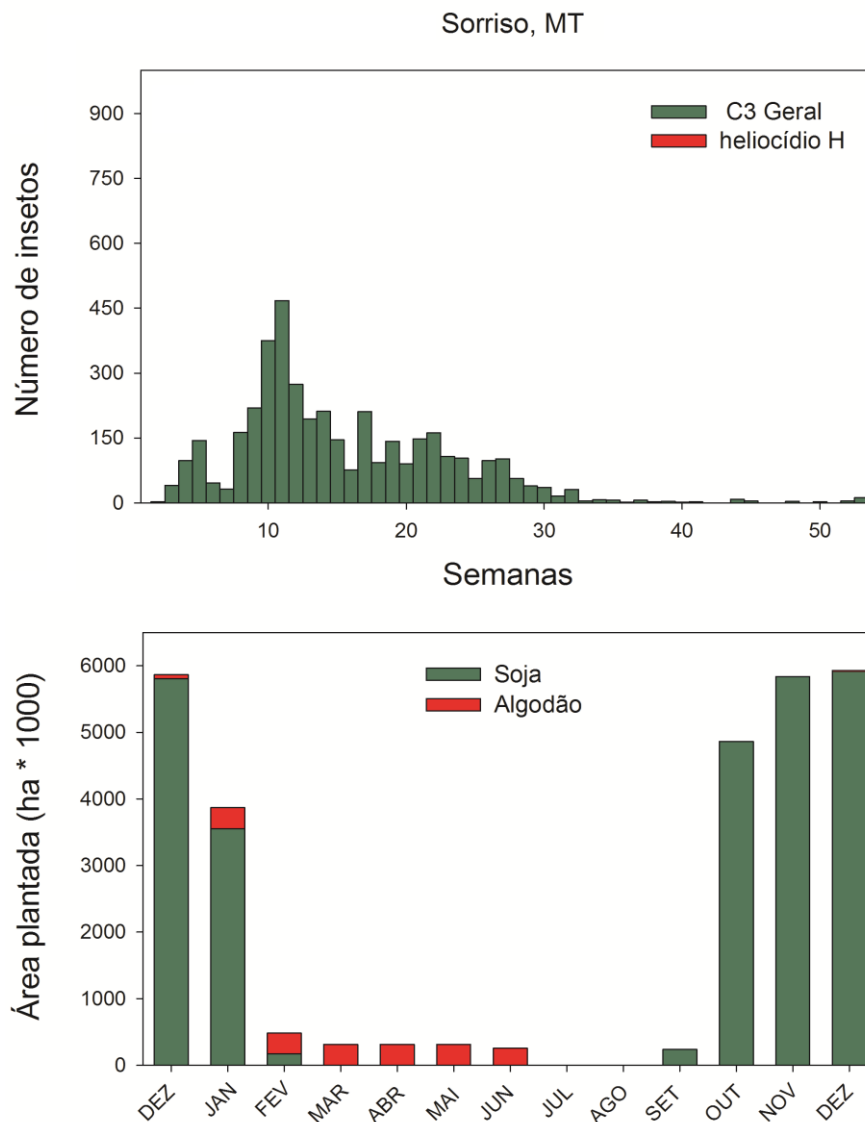


Figura 5.2. (A) Flutuação populacional de indivíduos de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) capturados com armadilhas de feromônio em Sorriso no Mato Grosso. As cores das barras diferenciam indivíduos alimentados em plantas C3 (verde) e a cor vermelha indivíduos com detecção positivas para heliocídio H, um metabólito secundário do algodão (Vermelho). (B) Área plantada (ha * 1000) das culturas da soja e algodão de dezembro de 2014 a dezembro de 2015 na região do Norte Matogrossense.

O maior número de *C. includens* coletado em Rolândia - PR (PRRO) foi na 6ª semana (42 dias) após o início do monitoramento. Essa flutuação populacional apresentou uma queda no número de indivíduos capturados, na 8ª semana (56 dias), e voltou a crescer na 9ª semana (63 dias). A partir da 19ª semana (133 dias) houve redução do número de indivíduos capturados, havendo uma forte diminuição de indivíduos coletados entre as 22ª e 25ª semanas. Os picos de coletas de indivíduos de *C. includens* foi registrado 100 dias após o início do plantio da cultura da soja.

Até 27^a semana, aproximadamente 270 dias após o plantio de soja, não houve uma diminuição drástica no número de insetos capturados. Esse fato pode ser justificado pelo desenvolvimento das larvas em hospedeiros alternativos (como o feijão, tomate e outras plantas dicotiledôneas), já que na 37^a semana houve um decréscimo acentuado no número de indivíduos capturados (Figura 5.3).

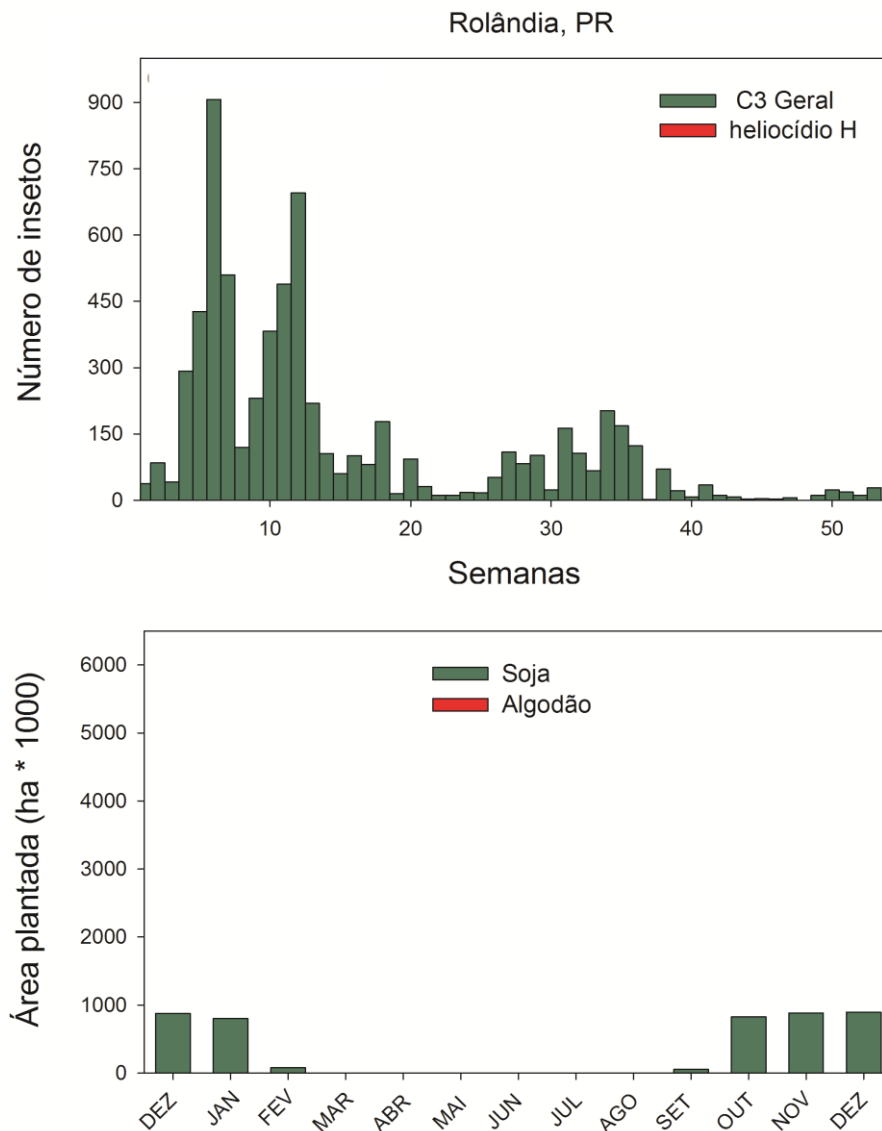


Figura 5.3. (A) Flutuação populacional de indivíduos de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) capturados com armadilhas de feromônio em Rolândia no Paraná. As cores das barras diferenciam indivíduos alimentados em plantas C3 (verde) e a cor vermelha indivíduos com detecção positivas para heliocídio H, um metabólito secundário do algodão (Vermelho). (B) Área plantada (ha * 1000) das culturas da soja e algodão de dezembro de 2014 a dezembro de 2015 na região do Norte Central Paranaense.

Em Não-me-toque- RS (RSNM) foi possível perceber um aumento no número de *C. includens* a partir da 7^a semana (49 dias) de coleta, período que coincide com 120 dias após o

plântio dos cultivos de soja na região. Os maiores números de indivíduos foram capturados da 13^a a 15^a semana (Março). A partir da 16^a o número de *C. includens* capturados diminuem significativamente e se mantem mínimos no restante do ano (Figura 5.4).

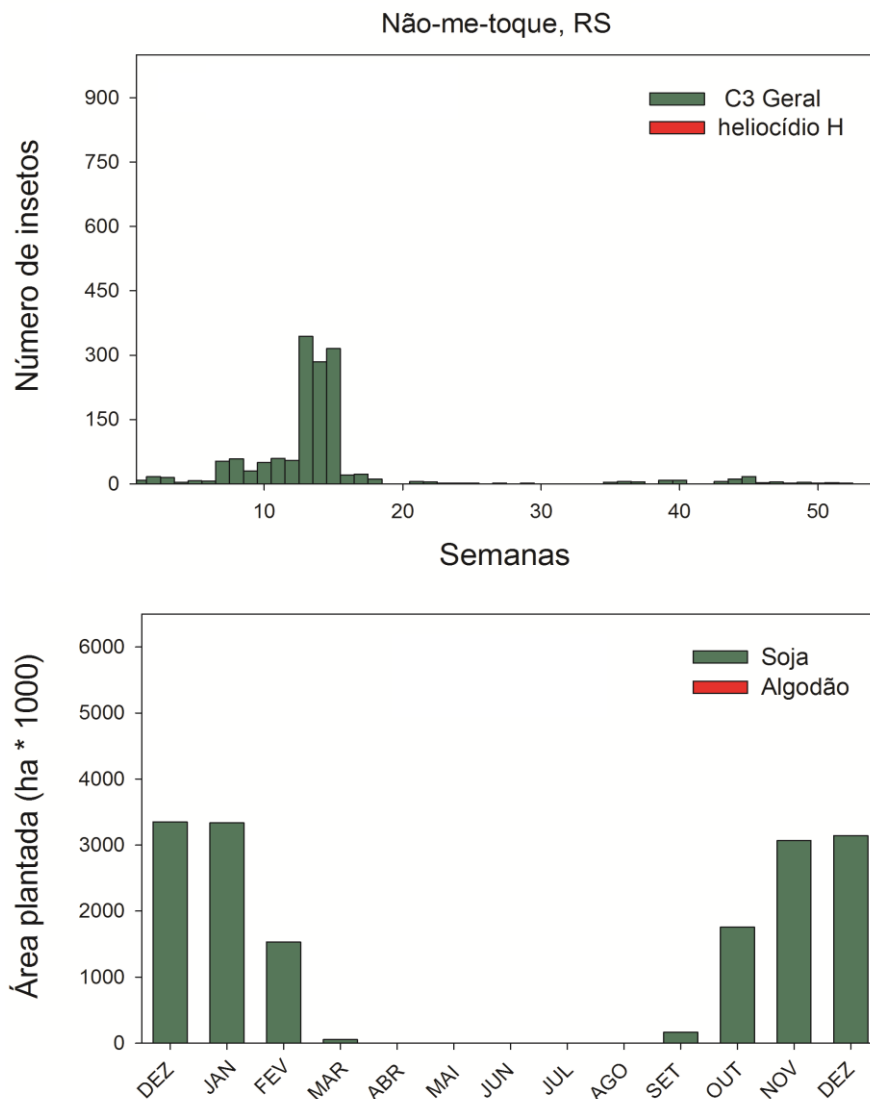


Figura 5.4. (A) Flutuação populacional de indivíduos de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) capturados com armadilhas de feromônio em Não-me-toque no Rio Grande do Sul. As cores das barras diferenciam indivíduos alimentados em plantas C3 (verde) e a cor vermelha indivíduos com detecção positivas para heliocídio H, um metabólito secundário do algodão (Vermelho). (B) Área plantada (ha * 1000) das culturas da soja e algodão de dezembro de 2014 a dezembro de 2015 na região do Noroeste Rio-Grandense.

5.3.2. Análises dos marcadores microssatélites nos locais amostrados

Os 256 indivíduos dos 16 locais amostrados apresentaram uma variação de alelos por locus de 0 para L3 e L6 a 19 para o locus L6. O valor de número médio de alelos por locus para

as 16 populações estudadas variou de 2,437 para o L11 a 12,937 para o L6 (Tabela 5.2). As médias de heterozigosidades observadas (H_o) em todos os *loci* variaram de 0,107 para L11 a 0,789 para L5, enquanto as médias de heterozigosidade esperadas (H_e) variaram de 0,141 para L11 a 0,933 para L6, indicando um número maior de homozigoto em todas as populações de *C. includens* estudadas (Tabela 5.2).

O número de alelos privados, considerando as 16 populações e todos os 11 *loci* foi de 41, sendo 10 para as populações coletadas em Luís Eduardo Magalhães - BA (BALM), 12 para populações coletadas em Sorriso - MT (MTSO), 14 para populações de Rolândia - PR (PRRO) e apenas 5 para todas as populações coletadas em Não-me-toque - RS (RSNM). Uma frequência de alelos nulos $> 0,20$ foram encontradas em quase todos os marcadores (L2, L3, L6, L7, L8, L9, L10, L12 e L13). O teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg indicou que todos os *loci* estavam em equilíbrio para todas as populações amostradas (Tabela 5.2).

Tabela 5.2. Estimativas da diversidade genética para *loci* de microsatélite em 16 subpopulações de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) coletadas em quatro regiões brasileiras

População	Índices	L2	L3	L5	L6	L7	L8	L9	L10	L11	L12	L13	Média
BALM01	<i>A</i>	14	3	12	16	8	14	4	11	3	10	10	9,545
	<i>He</i>	0,930	0,622	0,914	0,960	0,884	0,934	0,324	0,920	0,240	0,926	0,912	0,778
	<i>Ho</i>	0,722	0,00	0,833	0,538	0,200	0,235	0,157	0,750	0,157	0,200	0,071	0,351
	<i>f</i>	0,228	1,00	0,090	0,449	0,783	0,753	0,520	0,191	0,349	0,793	0,924	0,554
	<i>Na</i>	0,092	0,365	0,032	0,199	0,349	0,354	0,150	0,073	0,092	0,362	0,430	
BALM02	<i>A</i>	11	5	13	12	9	11	5	8	3	8	9	8,545
	<i>He</i>	0,916	0,712	0,908	0,926	0,878	0,910	0,618	0,835	0,131	0,862	0,904	0,782
	<i>Ho</i>	0,846	0,111	0,866	0,384	0,400	0,357	0,333	0,545	0,133	0,333	0,090	0,400
	<i>f</i>	0,080	0,851	0,047	0,594	0,558	0,616	0,469	0,358	-0,018	0,623	0,903	0,497
	<i>Na</i>	0,000	0,333	0,000	0,273	0,233	0,277	0,151	0,140	0,000	0,270	0,415	
BALM03	<i>A</i>	9	8	13	12	10	10	3	9	2	7	11	8,545
	<i>He</i>	0,862	0,889	0,919	0,926	0,920	0,896	0,358	0,878	0,066	0,813	0,928	0,769
	<i>Ho</i>	0,571	0,100	0,933	0,384	0,333	0,142	0,083	0,454	0,066	0,285	0,285	0,331
	<i>f</i>	0,345	0,892	-0,015	0,594	0,648	0,845	0,775	0,494	0,000	0,666	0,700	0,579
	<i>Na</i>	0,142	0,404	0,000	0,273	0,294	0,389	0,222	0,207	0,000	0,261	0,323	
BALM04	<i>A</i>	16	9	14	15	9	13	5	13	3	6	14	10,636
	<i>He</i>	0,910	0,926	0,905	0,922	0,904	0,920	0,253	0,929	0,089	0,673	0,931	0,760
	<i>Ho</i>	0,318	0,200	0,818	0,523	0,181	0,473	0,181	0,333	0,090	0,200	0,500	0,347
	<i>f</i>	0,655	0,793	0,098	0,438	0,806	0,492	0,288	0,646	-0,012	0,714	0,471	0,548
	<i>Na</i>	0,301	0,366	0,015	0,205	0,369	0,227	0,087	0,304	0,000	0,269	0,213	
MTSO 01	<i>A</i>	13	11	11	19	9	18	2	12	1	6	11	10,272
	<i>He</i>	0,925	0,902	0,907	0,944	0,865	0,950	0,203	0,929	0,000	0,791	0,928	0,758
	<i>Ho</i>	0,352	0,666	0,666	0,500	0,416	0,470	0,111	0,538	0,000	0,125	0,285	0,375
	<i>f</i>	0,625	0,269	0,271	0,477	0,529	0,512	0,460	0,430	0,000	0,851	0,700	0,513
	<i>Na</i>	0,290	0,108	0,117	0,220	0,219	0,236	0,108	0,190	0,001	0,360	0,323	

MTSO 02	A	12	10	12	16	9	11	2	8	1	5	9	8,636
	He	0,913	0,947	0,915	0,957	0,905	0,902	0,128	0,874	0,000	0,666	0,926	0,739
	Ho	0,615	0,111	0,714	0,500	0,333	0,416	0,133	0,454	0,000	0,600	0,000	0,352
	f	0,335	0,888	0,226	0,487	0,642	0,549	-0,037	0,492	0,000	0,111	1,000	0,537
	Na	0,139	0,414	0,085	0,223	0,288	0,241	0,000	0,211	0,001	0,000	0,468	
MTSO 03	A	12	10	11	14	9	9	3	7	2	8	7	8,363
	He	0,934	0,913	0,917	0,931	0,878	0,887	0,190	0,865	0,128	0,821	0,865	0,757
	Ho	0,416	0,333	0,733	0,500	0,300	0,083	0,200	0,000	0,133	0,500	0,181	0,307
	f	0,565	0,645	0,206	0,472	0,670	0,909	-0,050	1,000	-0,037	0,403	0,797	0,603
	Na	0,252	0,293	0,082	0,209	0,289	0,415	0,000	0,452	0,000	0,149	0,354	
MTSO 04	A	13	5	13	15	11	12	3	9	3	4	9	8,818
	He	0,906	0,888	0,923	0,925	0,905	0,920	0,197	0,876	0,152	0,866	0,900	0,769
	Ho	0,368	0,000	0,777	0,611	0,600	0,142	0,105	0,538	0,052	0,333	0,000	0,320
	f	0,600	1,000	0,161	0,346	0,349	0,849	0,474	0,395	0,660	0,666	1,000	0,591
	Na	0,270	0,444	0,065	0,153	0,127	0,395	0,114	0,182	0,137	0,222	0,462	
PRRO 01	A	15	6	15	16	6	17	6	15	2	5	11	10,363
	He	0,935	0,863	0,943	0,941	0,826	0,960	0,544	0,944	0,097	0,700	0,894	0,786
	Ho	0,450	0,333	0,842	0,375	0,200	0,294	0,200	0,368	0,100	0,100	0,066	0,302
	f	0,525	0,636	0,109	0,609	0,767	0,700	0,638	0,616	-0,027	0,863	0,927	0,622
	Na	0,242	0,266	0,042	0,280	0,327	0,331	0,213	0,288	0,000	0,336	0,428	
PRRO 02	A	16	3	13	12	10	14	4	11	2	4	11	9,090
	He	0,936	0,800	0,926	0,930	0,945	0,944	0,563	0,920	0,066	0,582	0,923	0,776
	Ho	0,428	0,000	0,769	0,272	0,571	0,230	0,266	0,500	0,066	0,285	0,250	0,331
	f	0,551	1,000	0,175	0,716	0,414	0,763	0,535	0,467	0,000	0,529	0,738	0,581
	Na	0,246	0,400	0,046	0,326	0,159	0,355	0,181	0,199	0,000	0,166	0,338	
PRRO 03	A	12	0	9	11	5	11	3	9	1	7	8	7,600
	He	0,898	0,000	0,884	0,894	0,822	0,876	0,563	0,900	0,000	0,841	0,894	0,757
	Ho	0,416	0,000	0,833	0,500	0,400	0,166	0,153	0,454	0,000	0,250	0,166	0,334
	f	0,547	1,000	0,059	0,452	0,542	0,816	0,734	0,507	0,000	0,717	0,820	0,572
	Na	0,243	-	0,000	0,210	0,189	0,366	0,246	0,215	0,001	0,302	0,374	
PRRO 04	A	12	2	13	14	3	12	4	10	3	3	9	7,727
	He	0,913	0,666	0,932	0,933	0,800	0,933	0,527	0,898	0,109	0,711	0,861	0,753

	<i>H_o</i>	0,250	0,000	0,823	0,222	0,000	0,285	0,117	0,500	0,111	0,000	0,272	0,234
	<i>f</i>	0,732	1,000	0,119	0,767	1,000	0,702	0,782	0,454	-0,014	1,000	0,693	0,684
	<i>N_a</i>	0,337	0,333	0,050	0,360	0,400	0,325	0,258	0,193	0,000	0,391	0,298	
RSNM 01	<i>A</i>	8	6	7	7	3	4	4	11	5	8	6	6,272
	<i>He</i>	0,829	0,866	0,890	0,924	0,800	0,857	0,688	0,917	0,064	0,901	0,866	0,835
	<i>H_o</i>	0,166	0,000	0,857	0,166	0,000	0,000	0,181	0,363	0,384	0,222	0,000	0,212
	<i>f</i>	0,806	1,000	0,040	0,833	1,000	1,000	0,745	0,615	0,411	0,764	1,000	0,752
	<i>N_a</i>	0,353	0,448	0,000	0,370	0,400	0,428	0,290	0,272	0,146	0,341	0,448	
RSNM 02	<i>A</i>	9	3	13	14	7	6	4	8	3	7	8	7,454
	<i>He</i>	0,898	0,483	0,910	0,965	0,873	0,836	0,193	0,888	0,131	0,857	0,851	0,717
	<i>H_o</i>	0,250	0,000	0,846	0,272	0,200	0,200	0,200	0,444	0,133	0,400	0,083	0,275
	<i>f</i>	0,730	1,000	0,073	0,727	0,780	0,770	-0,037	0,515	-0,018	0,547	0,905	0,625
	<i>N_a</i>	0,333	0,327	0,027	0,339	0,345	0,336	0,000	0,209	0,000	0,223	0,404	
RSNM 03	<i>A</i>	7	5	9	6	0	4	4	9	2	1	4	5,100
	<i>He</i>	0,924	0,888	0,933	0,928	0,000	0,742	0,350	0,945	0,142	0,000	0,857	0,671
	<i>H_o</i>	0,166	0,000	0,500	0,500	0,000	0,166	0,375	0,714	0,142	0,000	0,000	0,256
	<i>f</i>	0,833	1,000	0,481	0,500	0,000	0,791	-0,076	0,259	0,000	0,000	1,000	0,634
	<i>N_a</i>	0,370	0,444	0,206	0,166	-	0,308	0,000	0,095	0,000	0,001	0,428	
RSNM 04	<i>A</i>	7	3	8	8	3	7	4	9	3	3	7	5,636
	<i>He</i>	0,839	0,483	0,870	0,923	0,714	0,924	0,428	0,933	0,264	0,800	0,890	0,733
	<i>H_o</i>	0,181	0,285	0,818	0,428	0,000	0,166	0,357	0,375	0,142	0,000	0,142	0,263
	<i>f</i>	0,791	0,428	0,062	0,555	1,000	0,833	0,171	0,614	0,469	1,000	0,850	0,646
	<i>N_a</i>	0,345	0,000	0,000	0,235	0,386	0,370	0,068	0,271	0,134	0,400	0,375	
	<i>A_T</i>												
Mean/locus	A	11,625	5,562	11,625	12,937	6,937	10,812	3,750	9,937	2,437	5,750	9,000	8,216
	He	0,904	0,740	0,912	0,933	0,807	0,899	0,383	0,903	0,141	0,738	0,896	0,588
	H_o	0,407	0,133	0,789	0,417	0,258	0,239	0,197	0,458	0,107	0,239	0,149	0,308
	f	0,557	0,752	0,139	0,564	0,633	0,739	0,495	0,505	0,249	0,691	0,837	0,560

A: número de alelos; *He*: heteroziguidade esperada; *H_o*: heteroziguidade observada; *f*: coeficiente de Endogamia; *N_a*: frequência de alelos nulos; *A_T*: número total de alelos por locus.

De acordo com a estatística F, que quantifica o nível de diferenciação genética, há uma baixa estrutura populacional entre as populações putativas de *C. includens* ($F_{ST} = 0,015$) e alta endogamia ($F_{IS} = 0,589$ e $F_{IT} = 0,596$) entre os indivíduos estudados. A análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou que nas 16 amostragens estudadas a maior parte da diversidade está dentro das populações (96,18%, $\Phi_{ST}=0,038$; $p < 0,0001$) (Tabela 5.3). Quando parcionamos a variação dentro das regiões geográficas a maior parte da diversidade continuou dentro de populações (96,09%; $\Phi_{ST}=0,039$; $p < 0,0001$) e depois entre populações dentro de cada região (3,32%; $\Phi_{SC} = 0,033$; $p = 0,02$) (Tabela 5.3).

Tabela 5.3. Análise de variância molecular (AMOVA) para estrutura genética de 16 subpopulações de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) utilizando marcadores de microssatélites.

Fontes de Variação	Soma de quadrados	Componentes de variação	Variância (%)	Índice de fixação (p-value)
<i>Dois níveis hierárquicos</i>				
Entre Populações	98,928	0,134	3,813	$\Phi_{ST} = 0,038$ ($p < 0,0001$)
Dentro das populações	1306,540	3,386	96,186	
Total	1405,468	3,520		
<i>Três níveis hierárquicos (entre regiões)</i>				
Entre grupos	27,703	0,021	0,608	$\Phi_{CT} = 0,006$ ($p = 0,006$)
Entre populações dentro do grupo	71,225	0,117	3,322	$\Phi_{SC} = 0,033$ ($p = 0,02$)
Dentro das populações	1306,540	3,386	96,086	$\Phi_{ST} = 0,039$ ($p < 0,0001$)
Total	1405,468	3,525		

A análise de estruturação utilizando o software STRUCTURE, onde cada linha representa um indivíduo, reuniu os indivíduos de *C. includens* em três agrupamentos genético ($K = 3$). Entretanto, os agrupamentos considerando cada indivíduo demonstrou uma pequena estruturação genética entre os locais amostrados, onde as populações localizadas ao Sul, Rolândia - PR (PRRO) e Não-me-toque - RS (RSNM), aparentam apresentar maior presença dos cluster azul e verde e as populações de Luís Eduardo Magalhães - BA (BALM) e Sorriso - MT (MTSO) maior partição do cluster vermelho. No entanto, de maneira geral, existe uma fraca

estruturação genética de *C. includens* como indicada pelos índices globais de F_{ST} e Φ_{ST} (Figura 5.5).

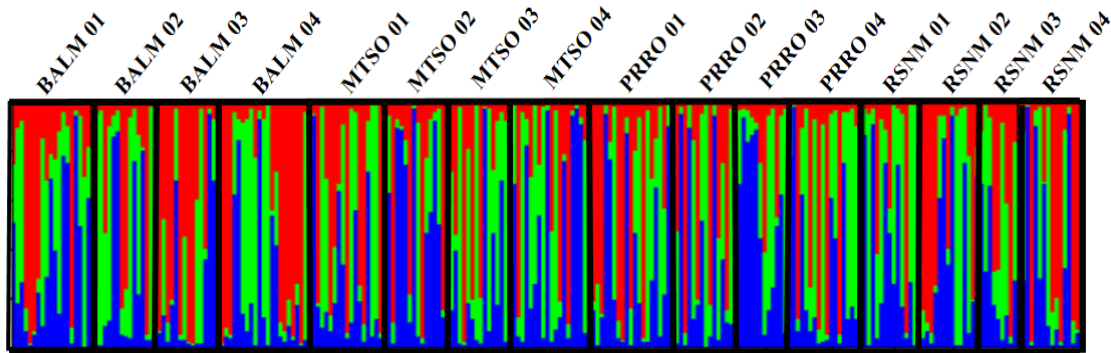


Figura 5.5. Padrão de estrutura genética de 16 subpopulações de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) baseado em 11 marcadores microssatélites. Cada barra representa um indivíduo e as cores representam populações putativas ($K = 3$).

Os valores calculados de F_{ST} par-a-par demonstraram moderada estruturação genética entre algumas subpopulações de *C. includens* (Figura 5.6). As subpopulações de Rolândia - PR, PRRO2, PRRO3, PRRO4 e de Não-me-toque - RS, RSNM1 demonstram consistente diferenciação genética entre as demais populações, sugerindo uma inicial estruturação genética por distância entre os locais amostrados de *C. includens* (Figura 5.6). No entanto, existe baixos valores de F_{ST} entre subpopulações da região Sul e de subpopulações presentes no Cerrado brasileiro, como destacado para as subpopulações RSNM2 (Não-me-toque - RS) e BALM2 (Luís Eduardo Magalhães - BA).

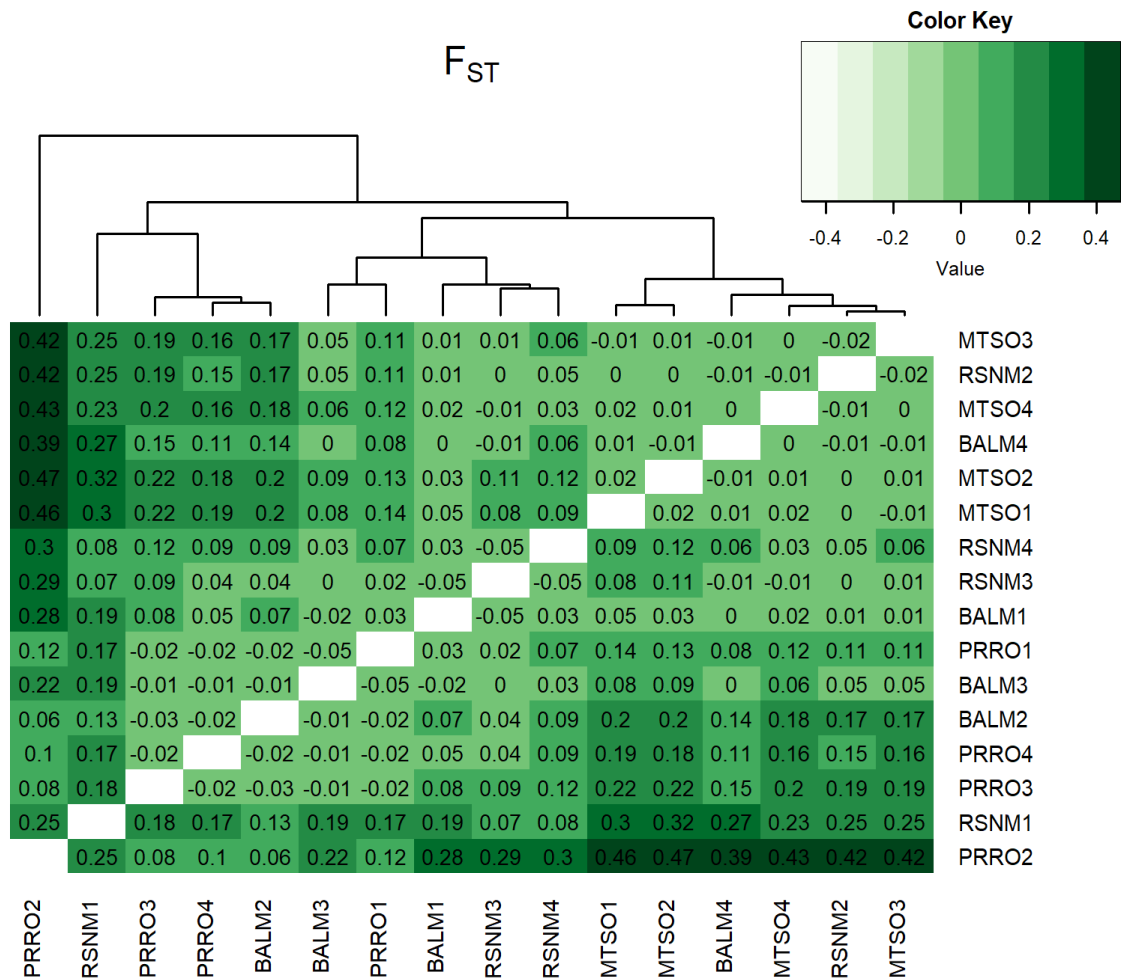


Figura 5.6. Heatmap do F_{ST} par-a-par de 16 subpopulações de *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) baseado nos dados de 11 marcadores microsatélites.

5.4. Discussão

Os picos de flutuação populacional observados no número de mariposas capturadas em cada região atende uma sincronia de aproximadamente 60 a 120 dias após o plantio da soja, provavelmente associados a uma segunda geração de larvas desenvolvidas nesses cultivos. A cultura do algodão também parece ser um hospedeiro importante na manutenção das populações de *C. includens* em condições de campo, comprovado pelo aumento do número de mariposas capturadas e também por um maior período de tempo de captura ao longo das semanas nas armadilhas instaladas na região de Luís Eduardo Magalhães – BA. Esse fato é comprovado na análise de isótopos estáveis e do marcador bioquímico, que confirmaram o alto consumo de culturas tipo C3 (como a soja, algodão, amendoim e girassol) e também especificamente de plantas de algodão. Plantas tipo C4 (como a cana-de-açúcar, milho e sorgo), parecem não serem

hospedeiros ideais para o desenvolvimento de *C. includens*, uma vez que não foram identificados na análise de isótopos estáveis valores que indicaram a presença de mariposas no campo oriundas de larvas alimentadas em plantas tipo C4. Assim podemos sugerir que rotações de cultivos agrícolas entre cultivos de plantas com metabolismo fotossintético C3 e C4 seriam adequados para diminuição da densidade populacional dessa praga em condições de campo, uma vez que *C. includens* não se alimentam de plantas com metabolismo fotossintético tipo C4.

A flutuação populacional das mariposas de *C. includens* ao longo das semanas sugere uma ampla alimentação das larvas de *C. includens* em plantas de soja. Assim, nós podemos sugerir que o aumento contínuo da área plantada de soja está associada ao aumento populacional absoluto de *C. includens* nas últimas décadas. Esse fato coincide com a hipótese de que os surtos populacionais de *C. includens* estão associados a expansão dos cultivos de soja para diversas regiões do Brasil (Martin *et al.*, 1976; Khalsa *et al.*, 1979; Kidd and Orr, 2001). Além disso, esse aumento do número de mariposas durante o cultivo da soja pode contribuir para o aumento da ocorrência/densidade de *C. includens* em outras culturas C3 como algodão, feijão e diversas hortaliças ao longo do ano agrícola, elevando o status dessa espécie para praga-chave no cenário agrícola brasileiro.

Apesar da indicação da grande influência dos cultivos de soja sobre a densidade populacional de *C. includens*, outros hospedeiros também podem ser importantes para a manutenção e aumento no número de indivíduos de *C. includens* em condições de campo. Esse fato é primeiramente sustentado pelo maior pico absoluto e maior amplitude de coleta de mariposas de *C. includens* em Rolândia – PR, onde não temos a maior área plantada de soja no Brasil. E em um segundo momento, pelo fato de Luís Eduardo Magalhães – BA apresentar uma significativa proporção das mariposas de *C. includens* coletadas proveniente de larvas que se desenvolveram na cultura do algodão. Além da disponibilidade de hospedeiros, fatores climáticos, ainda não testados, como temperatura, umidade e precipitação e fatores bióticos como sistema de cultivo da soja, variedades das plantas de soja e utilização de culturas geneticamente modificadas podem estar diretamente associado ao número de mariposas de *C. includens* coletadas semanalmente em cada região (Santos *et al.*, 2017).

Utilizando marcadores microssatélites, nós não encontramos grandes diferenças no número de alelos por locus, heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) entre as 16 subpopulações de *C. includens* distribuídas no espaço e tempo de coleta. A heterozigosidade observada foi menor em todas as subpopulações avaliadas, demonstrando um excesso de homozigotos nos indivíduos de *C. includens* estudados, resultado reforçado pelo coeficiente de endogamia (F_{IS}). Esses resultados de alta endogamia podem ser explicados pelos eventos de

rápido aumento e diminuição da densidade populacional de *C. includens* ao longo do ano em todas as regiões brasileiras, promovendo eventos de deriva genética e diminuição na frequência de alelos nas populações estudadas.

As análises globais de AMOVA, F_{ST} e STRUCTURE indicaram uma baixa estruturação e diferenciação genética entre as subpopulações avaliadas. No entanto, quando realizamos a análise de F_{ST} par-a-par nós encontramos uma estrutura genética consistente entre as subpopulações dentro de cada região geográfica, principalmente quando comparamos as subpopulações presentes na região Sul (Rolândia - PR (PRRO) com as do cerrado Brasileiro (Luís Eduardo Magalhães - BA (BALM) e Sorriso - MT (MTSO)) indicando uma estruturação genética espacial de *C. includens*. Apenas os insetos oriundos das subpopulações coletadas em Não-me-toque - RS (RSNM) apresentaram uma maior variação na estruturação genética no tempo das coletas e espacial na análise de F_{ST} par-a-par, sugerindo eventos de extinção e recolonização anuais nessa região. Isso é acentuado quando percebemos que na ausência da soja, as coletas de mariposa no campo foram muito baixas ou até mesmo ausentes em algumas semanas do ano, permitindo assim sugerir que a extinção/colonização de *C. includens* na região de Não-me-toque pode ser um evento recorrente. No entanto, os insetos não são oriundos de regiões muito distantes como reportado para outros Noctuidae pragas como *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa armigera* (Leite et al., 2017; Arias et al., 2019; Dourado et al., 2020), uma vez que o marcador bioquímico heliocídio H que não apresentou resultados positivos para mariposas presentes nas demais regiões brasileiras com baixa ou com ausência de plantios de algodão, o que reforça a baixa movimentação de *C. includens* no país.

5.5. Considerações Finais

Nossos resultados demonstraram que a maior abundância na captura de adultos de *C. includens* no campo ocorreu entre 60 a 120 dias após o plantio da soja, com drástica redução no número de indivíduos após esse período, o que demonstra a alta capacidade dos cultivos de soja em sustentar grandes densidades de indivíduos de *C. includens* no campo. As análises de isótopos estáveis de carbono demonstraram que todas as mariposas coletadas durante as 54 semanas são provenientes de larvas alimentadas em plantas com metabolismo fotossintético tipo C3. O marcador bioquímico heliocídio H, apesar de presente apenas em mariposas coletadas em Luís Eduardo Magalhães – BA, revelou que a cultura do algodão também é uma fonte de alimento importante para as populações de *C. includens* e indicou uma baixa capacidade de dispersão de *C. includens* para outras regiões produtoras. Baixa diferenciação genética e uma

inicial estruturação espacial por regiões brasileiras são sugeridas por nossas análises de marcadores SSRs. Nós hipotetizamos que a baixa estruturação genética está associada a recente expansão populacional e espacial de *C. includens* no território brasileiro. Uma hipótese alternativa seria um alto fluxo gênico entre as populações, no entanto, o marcador bioquímico de algodão indica uma pequena movimentação de *C. includens* entre ecoregiões brasileiras, o que torna a hipótese de amplo fluxo gênico entre as populações menos plausível.

Referências

- Alford, A.R., Hammond Junior, A.N., 1982. Plusinae (Lepidoptera: Noctuidae) populations in Louisiana soybeans ecosystems as determined with looplure-baited traps. *Journal of Economic Entomology* 75, 4:647-650.
- Arias, O., Cordeiro, E., Corrêa, A. S., Domingues, F. A. Guidolin, A. S., Omoto, C., 2019. Population genetic structure and demographic history of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae): implications for insect resistance management programs. *Pest Management Science*, 75: 2948–2957.
- Black, W.C., Duteau, N.M., 1997. RAPD-PCR and SSCP analysis for insect population genetic studies. In: Crampton JM, Beard CB, Louis C. *The molecular biology of insect disease vectors: a methods manual*. London: Chapman & Hall 361-373.
- Camargo, A.J.A., 2001. Insect diversity in cultivated areas and nature reserves: considerations and recommendations. (Diversidade de insetos em áreas cultivadas e reserva legal: considerações e recomendações.) *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento - Embrapa Cerrados*, 1:27.
- Conab: Companhia nacional de abastecimento, 2015. Calendário plantio e colheita de grãos no Brasil. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: [file:///C:/Users/user/Downloads/CalendrioZ2019%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/user/Downloads/CalendrioZ2019%20(1).pdf). Acesso em: 29 jan. 2020.
- Dourado, P.M., Pantoja-Gomez, L.M., Horikoshi, R.J., Carvalho, R.A., Omoto, C., Corrêa, A.S., Kim, J.H., Martinelli, S., Head G.P. Host plant use of *Helicoverpa* spp. in the Brazilian agricultural landscape. *Pest Management Science*, 2020 (submetido).
- Earl, D.A., von Holdt, B.M., 2012. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4:359-361.
- Evanno, G., Regnauts, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.

- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2006. ARLEQUIN. Ver 3.1. An integrated software package for population genetic data analysis. Computational and Molecular Population Genetic Lab, University of Bern, Bern, Switzerland.
- Ferreira, M.E., Grattapaglia, D., 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2a ed. EMBRAPA, Brasília. 220 p.
- Garcia, A., Pipolo, A. E., Lopes, I.O.N., Portugal, F.A.F., 2007. Instalação da lavoura de soja: época, cultivares, espaçamento e população de plantas. Embrapa, 1516-7860.
- Guedes, J.V.C, Stecca, C.S., Rodrigues, R.B., Bigolin, M., 2011. Nova dinâmica. Cultivar Grandes Culturas 139: 24-26.
- Goudet, J., 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). See <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- Gould, F., Blair, N., Reid, M., Rennie, T.L., Lopez, J., Micinski, S., 2002. *Bacillus thuringiensis*-toxin resistance management: stable isotope assessment of alternate host use by *Helicoverpa zea*. Proceedings of the *National Academy of Sciences*. USA 99:16581–16586.
- Hamrick, J.L., 1983. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: Shonewald-Cox, C.M.; Chambers, S.M.; MacBride, B.; Thomas, W.L. (Ed.). Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant population. Menlo Park: Benjamin/Cummings, 335-348.
- Harding, J.A., 1976. Seasonal occurrence, parasitism and parasites of cabbage and soybean loopers in the lower Rio Grande Valley. *Environmental Entomology*, v. 5, p. 672-674.
- Head, G., Jackson, R. E., Adamczyk, J., Bradley, J. R., Van Duyn, J., Gore, J., ... & Mullins, J. W. (2010). 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*, v. 47, p. 583-592.
- Hyodo, F., 2015. Use of stable carbon and nitrogen isotopes in insect trophic ecology. *Entomological Science*, 18(3), 295–312.
- Khalsa, M. S., Kogan, M., Luckmann, W. H., 1979. *Autographa precationis* in relation to soybean: Life history, and food intake and utilization under controlled conditions. *Environmental Entomology*, v. 8, n 1, p. 117-122.
- Kidd, K.A., Orr, D.B., 2001. Comparative feeding and development of *Pseudoplusia includes* (Lepidoptera: Noctuidae) on kudzu and soybean foliage. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94, 219-225.

- Leite, N.A., Correa, A.S., Michel, A.P., Alves-Pereira, A., Pavinato, V.A.C., Zucchi M.I., Omoto, C., 2017. Pan-American Similarities in Genetic Structures of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) With Implications for Hybridization. *Environ Entomol.* 1; 46(4):1024-1034.
- Lewis, P.O., Zaykin, D., 2001. Genetic Data Analysis (GDA), v. 1.1. Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of Connecticut, Storrs.
- Madeira, F., di Lascio, A., Carlino, P., Costantini, M.L., Rossi, L., Pons, X. 2014. Stable carbon and nitrogen isotope signatures to determine predator dispersal between alfalfa and maize. *Biological Control*, 77:66–75
- Martin, P.B., Lingren, P.D., Greene, G.L., 1976. Relative abundance and host preferences of cabbage looper, soybean looper, tobacco budworm and corn earworm on crops grown in north Florida. *Environmental Entomology*, v. 5, p. 878-882.
- Mason, L.J., Johnson, S.J., Woodring, J., 1989. Seasonal and ontogenetic examination of the reproductive biology of *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology*. 18, 980-985.
- Moscardi, F., Bueno, A.F., Sosa-Gómez, D.R., Roggia, S., Hoffmann-Campo, C.B., Pomari, A. F., Corso, I.C., Yano, S.A.C., 2012. In: Hoffmann-Campo BC, Corrêa-Ferreira BS, Moscardi F Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga, Embrapa, 859.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Roderick, G.K., 1996. Geographic Structure of Insect Populations: Gene Flow, Phylogeography and their uses. *Annual. Review. Entomology*.41:325-352.
- Santos, S. R., Specht, A., Carneiro, E., Paula-Moraes, S. V., Casagrande, M. M., 2017. Interseasonal variation of *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the Brazilian Savanna. *Revista Brasileira de Entomologia*, 61, 294–299.
- Seymour, M., Perera, O.P., Fescemyer, H.W., Jackson, R.E., Fleischer, S.J., Abel, C.A., 2016. Peripheral genetic structure of *Helicoverpa zea* indicates asymmetrical panmixia. *Ecology and evolution* 6(10): 3198-3207.
- Silva, C.S., Cordeiro, E. M. G., Corrêa, A. S., 2019. Isolation and Characterization of Microsatellite Markers for Soybean Looper (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Science*, 19(5): 22; 1–5
- Slatkin, M., 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792.

- Sosa-Gómez, D.R., Delpin, K.E., Moscardi, F., Nozaki, M.H., 2003. The Impact of Fungicides on *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson Epizootics and on Populations of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), on Soybean. *Neotropical Entomology* 32(2): 287-291.
- Spehar, C. R., 1995. Impact of strategic genes in soybean on agricultural development in the Brazilian tropical savannahs. *Field Crops Research*. 1, 141-146.
- Specht, A., Paula-Moraes, S.V., Sosa-Gómez, D.R., 2015. Host plants of *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera, Noctuidae, Plusiinae). *Revista Brasileira de Entomologia* 59: 343–345.
- Stansly, P.A., Orellanam, G.J., 1990. Field Manipulation of *Nomuraea rileyi* (Moniliales: Moniliaceae): Effects on Soybean Defoliators in Coastal Ecuador). *Journal of Economic Entomology* 83(6): 2193-2195.
- Tsafack, N., Alignier, V., Head, G.P., Kim, J.H., Goulard, M., Menozzi, P., Ouin, A., 2015. Landscape effects on the abundance and larval diet of the polyphagous pest *Helicoverpa armigera* in cotton fields in North Benin. *Pest Management Science*, 72, 1613-1626
- Wallner, W. E., 1987. Factors affecting 'Insect population dynamics: Differences between outbreak and non-outbreak species, *Annual Review Entomology*.32:317-340
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–137.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos estudos identificaram baixa diversidade genética mitocondrial para indivíduos de *C. includens* coletados no Brasil. Tanto a abordagem filogeográfica utilizando marcadores mitocondriais quanto as análises de múltiplos loci através de marcadores SNPs e SSRs, nos levaram a hipótese de uma recente expansão demográfica e espacial de *C. includens* no Brasil, com início datado a ≈ 300 anos. No entanto, processos iniciais de estruturação genética por distância geográfica (IBD) e por hospedeiro (soja e algodão) foram revelados por nossos marcadores moleculares e pelo marcador bioquímico para a cultura do algodão (heliocídio H). Isso é reforçado pelos SNPs sobre seleção que apontaram seleção positiva para genes associados ao metabolismo digestivo e, também, para resistência a pesticidas, que sugere uma forte influência da paisagem agrícola contemporânea sobre as populações de *C. includens*. Finalmente, o levantamento populacional do número de mariposas de *C. includens*, realizado semanalmente em quatro regiões brasileiras, apontaram para uma alta associação do aumento na densidade populacional de *C. includens* com a presença de cultivos de soja em todas as regiões brasileiras ao longo de um ano agrícola. Desta forma, podemos sugerir que a expansão contínua dos cultivos de soja para o Cerrado brasileiro nas últimas três décadas, e recentemente para regiões mais ao Norte do Brasil, contribuiu para o aumento da densidade populacional de *C. includens*, bem como para recente expansão demográfica e espacial de *C. includens* no Brasil. Além disso, o cenário agrícola atual contribuiu para seleção positiva de *loci* associados a características adaptativas como adaptação a hospedeiros e resistência a patógenos e pesticidas.