

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

**Dinâmica populacional, hibridação e adaptação a hospedeiros  
em *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidade)**

**Laura Maria Pantoja Gomez**

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

**Piracicaba  
2021**

**Laura Maria Pantoja Gómez**  
**Engenheira Agrônoma**

**Dinâmica populacional, hibridação e adaptação a hospedeiros em *Helicoverpa*  
spp. (Lepidoptera: Noctuidae)**

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**  
**2021**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**

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

Pantoja Gomez, Laura Maria

Dinâmica populacional, hibridação e adaptação a hospedeiros em *Helicoverpa* spp (Lepidoptera: Noctuidade) / Laura Maria Pantoja Gomez. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2021.

129 p.

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

1. Genética de populações 2. Diversidade genética 3. Preferência alimentar 4. Pragas de importância agrícola I. Título

## **DEDICATÓRIA**

**A os meus pais, meu irmão e minha avó,  
a luz do meu caminho.  
A meu namorado Renan de Souza, o amor da minha vida.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que mesmo sem acreditar nele precisei de sua ajuda nos momentos mais difíceis do doutorado.

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz por todos os ensinamentos acadêmicos e de vida que me proporcionaram durante estes anos.

À Universidade de São Paulo, sempre será uma honra ter estudado aqui.

Ao Programa de Pós-graduação em Entomologia e Acarologia, por se converter no meu segundo lar, pelos ensinamentos recebidos durante as aulas e durante todo o desenvolvimento da minha pesquisa.

Ao professor Dr. Alberto Soares Côrrea, pela orientação, paciência, apoio e ajuda durante este tempo. Por me guiar durante a realização deste trabalho, pela motivação e pela confiança. Ficarei para sempre agradecida.

Ao Dr. Erick Cordeiro, por sua ajuda com as análises de bioinformática, pela paciência e todas suas ideias para melhorar este trabalho.

Ao professor Dr. Celso Omoto, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho, por me permitir trabalhar dentro do seu laboratório e por todos os ensinamentos.

A minha família, pelo apoio sempre, motivação e confiança. Obrigada pelas muitas horas no Skype, longe mas nunca sozinha. Vocês são meu motor e meu melhor motivo para persistir.

Ao Renan, meu amor, sem ele nada seria possível, por ser o melhor companheiro de todas horas e meu suporte nos momentos difíceis. Muito obrigada!

A os meus amigos do laboratório de Ecologia Molecular de Artrópodes, pelos momentos compartilhados, risadas e ajuda, especialmente a Cleane, por ser a melhor concorrente e amiga durante o doutorado.

A os meus amigos do laboratório de Resistência de Artrópodes a Táticas de Controle, especialmente ao Douglas e a equipe Helicoverpa, pelo suporte durante o desenvolvimento dos experimentos.

A Bia e Victoria, “team joaninha”, pela sua inestimável ajuda durante seu estágio, pelas muitas horas de bancada, pelas risadas e por tudo o que me ensinaram.

A Julia e ao Camilo, pela sua ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

A os meus colegas de casa Leo e Álvaro por serem meus irmãos maiores.

Aos meus amigos do Rotaract por ser minha família em Piracicaba.

Aos meus amigos de sempre e aos novos amigos com os quais compartilhei momentos de trabalho, de aula e vivência.

A CAPES pela bolsa e a FAPESP (processo 2014/11495-3) pelo apoio financeiro a minha pesquisa.

A Monsanto Brasil Ltda pela ajuda financeira na minha pesquisa, pelo material biológico e pelo suporte prestado ao laboratório.

Ao pessoal da biblioteca, pelo treinamento no Mendeley e ajuda na formatação deste trabalho.

A todas as pessoas que contribuíram na coleta de insetos para o desenvolvimento da minha pesquisa.

A todos aqueles que contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

## EPÍGRAFE

*"We're all smart. Distinguish yourself by being kind."*

*C. Gordon,*

## SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	145
REFERÊNCIAS.....	20
2. ANÁLISE ESPACIAL E TEMPORAL DA DINÂMICA POPULACIONAL E DE HOSPEDEIROS DE <i>Helicoverpa armigera</i> E <i>H. zea</i> (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM QUATRO CENÁRIOS AGRÍCOLAS BRASILEIROS .....	25
RESUMO.....	25
ABSTRACT.....	25
2.1 INTRODUÇÃO .....	26
2.2 MATERIAL & MÉTODOS.....	28
2.2.1. Coleta de Indivíduos.....	28
2.2.2. Análise de Isótopos Estáveis.....	29
2.2.3. Extração de DNA.....	30
2.2.4. Identificação molecular de <i>H. armigera</i> e <i>H. zea</i> .....	31
2.3 RESULTADOS .....	32
2.4 DISCUSSÃO .....	36
REFERÊNCIAS.....	39
3. FLUXO GÊNICO E HIBRIDAÇÃO DE POPULAÇÕES DE <i>Helicoverpa</i> spp (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL.....	45
RESUMO.....	45
ABSTRACT.....	45
3.1 INTRODUÇÃO .....	46
3.2 MATERIAL & MÉTODOS.....	48
3.2.1 Coleta, extração de DNA e identificação das amostras.....	48
3.2.2 Preparo das amostras, construção da biblioteca de GBS e sequenciamento.....	51
3.2.3 Análises dos dados .....	51
3.3 RESULTADOS.....	52

3.4 DISCUSSÃO .....	56
REFERÊNCIAS .....	60
4 BIOLOGIA DE LINHAGENS BRASILEIRAS DE <i>Helicoverpa armigera</i> , <i>H. zea</i> E HÍBRIDA (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) SOBRE OS HOSPEDEIROS SOJA E ALGODÃO.....	67
RESUMO.....	67
ABSTRACT.....	67
4.1 INTRODUÇÃO .....	68
4.2 MATERIAL & MÉTODOS .....	70
4.2.1 Insetos .....	70
4.2.2 Cruzamentos coespecíficos e interespecíficos de <i>H. armigera</i> e <i>H. zea</i>	71
4.2.3 Bioensaio de desenvolvimento larval em diferentes hospedeiros .....	72
4.2.4 Identificação molecular dos insetos .....	72
4.3 RESULTADOS.....	73
4.3.1 Cruzamentos coespecíficos e interespecíficos de <i>H. armigera</i> e <i>H. zea</i>	73
4.3.2 Bioensaio de desenvolvimento larval em diferentes hospedeiros .....	75
4.3.2.1 Massa Corpórea .....	75
4.3.2.2 Sobrevivência.....	78
4.3.2.3 Porcentagem de sobrevivência durante as primeiras semanas .....	79
4.3.2.4 Tempo de desenvolvimento requerido para trocar de estágio.....	81
4.4 DISCUSSÃO .....	83
REFERÊNCIAS .....	87
5. EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE <i>Helicoverpa</i> spp (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) COMO RESPOSTA A ALIMENTAÇÃO LARVAL EM DIFERENTES HOSPEDEIROS .....	93
RESUMO.....	93
ABSTRACT.....	93
5.1 INTRODUÇÃO .....	94
5.2 MATERIAL & MÉTODOS .....	96
5.2.1 Coleta, extração de RNA, preparo das amostras, construção da biblioteca e sequenciamento .....	96
5.2.2 Análises dos dados.....	97
5.2.3 Validação de genes candidatos por qPCR .....	99
5.3 RESULTADOS.....	100

5.3.1	Comparação entre tratamentos com foco nas linhagens .....	104
5.3.2	Comparação entre tratamentos com foco no hospedeiro algodão .....	107
5.3.3	Comparação entre tratamentos com foco no hospedeiro soja .....	111
5.3.4	Anotação funcional e determinação de rotas metabólicas deferentes...	114
5.3.5	Validação de genes candidatos por qPCR .....	116
5.4	DISCUSSÃO .....	120
	REFERÊNCIAS .....	123
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	129

## RESUMO

### Dinâmica populacional, hibridação e adaptação a hospedeiros em *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidade)

O complexo *Helicoverpa* é considerado um dos problemas fitossanitários que gerou maior impacto ao agronegócio brasileiro durante a última década. Antigamente, *Helicoverpa armigera* encontrava-se distribuída na Europa, África, Ásia e Oceania, mas em 2013 foi reportada pela primeira vez invadindo várias culturas no território brasileiro. Múltiplas estratégias foram adotadas para seu controle como a aplicação de inseticidas, controladores biológicos e plantas geneticamente modificadas. Porém fatores como sua distribuição, comportamento alimentar e relação com sua espécie irmã, *Helicoverpa zea*, ainda não estão completamente esclarecidos. Assim, os esforços aqui produzidos foram divididos em quatro capítulos com os seguintes objetivos gerais: (i) avaliar a flutuação populacional de *H. armigera*, *H. zea* e a fonte alimentar em quatro regiões do Brasil durante o ano 2015; (ii) determinar mediante a utilização de marcadores SNPs a presença de uma estrutura populacional e fluxo gênico intra e interespecífico entre linhagens de *H. armigera* e *H. zea* coletadas em diferentes localidades e hospedeiros; (iii) determinar a presença e o desempenho (sobre soja e algodão) da prole híbrida oriunda de cruzamentos entre *H. armigera* e *H. zea* em condições de laboratório; e (iv) avaliar o perfil de transcritos e prospectar genes candidatos envolvidos na polifagia de *H. armigera*, *H. zea* e da linhagem híbrida. Os resultados de flutuação populacional demonstraram que *H. armigera* é a espécie predominante no agroecossistemas brasileiro em relação a *H. zea*. Além disso, ambas as espécies alimentaram-se de plantas C3 e C4 durante todo o período de um ano confirmando a polifagia de *H. armigera* e *H. zea*. Os estudos com os marcadores SNPs apontaram uma alta similaridade genética entre as populações de *H. zea*, enquanto alguns altos valores de  $F_{ST}$  foram estimados entre as populações de *H. armigera*. A ausência de uma estruturação genética no espaço e por hospedeiro em *H. armigera* sugere que a principal força fixadora de alelos é a deriva genética. Foi detectada a presença de híbridos putativos entre as populações naturais de *H. armigera* e *H. zea*. No entanto, as espécies permanecem geneticamente caracterizadas no espaço e hospedeiros, uma vez que as análises sugerem dois cluster genéticos bastante definidos em *H. armigera* e *H. zea*. Os estudos de laboratório apontaram a presença de uma prole híbrida assimétrica entre *H. armigera* e *H. zea*, onde apenas o cruzamento ♀ *H. armigera* e ♂ *H. zea* geraram uma prole híbrida. O número de ovos gerados do cruzamento híbrido é significativamente inferior quando comparado com os cruamento coespecíficos entre *H. armigera* e *H. zea*. *H. armigera* e a linhagem híbrida foram capazes de completar o ciclo se alimentado de folhas de soja e algodão, enquanto, *H. zea* não foi capaz de gerar adultos viáveis. A análise do perfil de transcritos das larvas alimentadas em folhas e soja e algodão revelou que a expressão da linhagem híbrida foi mais similar a *H. armigera*. Além disso, os genes associados a rotas detoxificativas são os principais candidatos a explicar a maior polifagia de *H. armigera* e da linhagem híbrida quando comparado a *H. zea*. Genes como *molting carboxipeptidase A*, *Chemosensory protein 15*, *serine protease* que estão presentes em *H. armigera* e na prole híbrida, mas não em *H. zea*. Genes associados ao complexo Citocromo P450 foram expressos em taxas diferentes nas linhagens de *Helicoverpa*. Como considerações finais, *H. armigera*, apesar da recente invasão, é a espécie do gênero *Helicoverpa* mais abundante no agroecossistema brasileiro. Não foi encontrado uma estruturação espacial ou por

hospedeiros entre as populações de *H. armigera* e *H. zea*. *Helicoverpa armigera* demonstrou mais polífaga que *H. zea*. Híbridos putativos em condições de campo e uma prole híbrida assimétrica em condições de laboratório foram descritos e devem ser considerados em programas de manejo de pragas, uma vez que esse fluxo gênico interespecífico pode servir de ponte para introgressões adaptativas entre as populações naturais de *H. armigera* e *H. zea*.

Palavras-chave: Identificação molecular, Genética de populações, Híbridos, Polifagia, RNAseq, Manejo de Pragas.

## ABSTRACT

### Population dynamic, hibridization and host adaptation in *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidade)

The *Helicoverpa* complex is considered one of the phytosanitary problems that have had the greatest impact on Brazilian agribusiness during the last decade. In the past, *Helicoverpa armigera* was distributed in Europe, Africa, Asia, and Oceania, but in 2013 it was reported for the first time invading cotton and soybean crops in the Brazilian territory. Multiple strategies are adopted for its control, such as insecticides, biological controllers, and genetically modified plants. However, factors such as its distribution, feeding behavior, and relationship with its sister species, *Helicoverpa zea*, are not yet fully understood. Thus, the efforts produced here were divided into four chapters with the following general objectives: (i) to evaluate the population fluctuation of *H. armigera*, *H. zea* and the food source in four regions of Brazil during 2015; (ii) to determine, using SNPs markers, the presence of a population structure and intra and interspecific gene flow between strains of *H. armigera* and *H. zea* collected in different locations and hosts; (iii) determine the presence and performance (on soybean and cotton) of the hybrid offspring from crosses between *H. armigera* and *H. zea* under laboratory conditions; and (iv) evaluate the transcripts profile and search for candidate genes involved in the polyphagy of *H. armigera*, *H. zea*, and a hybrid strain. The population fluctuation of *Helicoverpa* demonstrated that *H. armigera* is the predominant species in the Brazilian agroecosystems. Both species fed on C3 and C4 plants over the entire year, confirming the polyphagy of *H. armigera* and *H. zea*. Studies with SNPs markers showed greater genetic similarity between *H. zea* populations when compared among populations of *H. armigera* that showed some high  $F_{ST}$  value. The absence of a genetic structure in space and the host in *H. armigera* suggest that the main allele-fixing force is genetic drift. The presence of putative hybrids was detected among the natural populations of *H. armigera* and *H. zea*. However, the species remain genetically characterized in space and hosts since the analyzes suggest two highly defined genetic clusters: *H. armigera* and *H. zea*. Laboratory studies pointed to the presence of an asymmetric hybrid offspring between *H. armigera* and *H. zea*, where only the crossing ♀ *H. armigera* and ♂ *H. zea* generated hybrid offspring. The number of eggs generated from the hybrid cross is significantly lower than the co-specific crosses between *H. armigera* and *H. zea*. *H. armigera* and the hybrid strain completed the cycle fed on soybean and cotton leaves, while *H. zea* was not able to generate viable adults. The analysis of the transcript profile of the larvae fed on leaves and soybean and cotton revealed that the expression of the hybrid strain was more similar to *H. armigera*. The genes associated with detoxifying routes are the main candidates to explain the greater polyphagia of *H. armigera* and the hybrid strain compared to *H. zea*. Genes such as molting carboxypeptidase A, Chemosensory protein 15, and serine protease are present in *H. armigera* and hybrid offspring, but not in *H. zea*. Genes associated with the Cytochrome P450 complex were expressed at different rates in *Helicoverpa* strains. As final considerations, *H. armigera*, despite the recent invasion, is the species of genus *Helicoverpa* most abundant in the Brazilian agroecosystem. No spatial or host genetic structure was found among the populations of *H. armigera* and *H. zea*. *Helicoverpa armigera* showed more polyphage than *H. zea*. Putative hybrids in field conditions and an asymmetric hybrid offspring in laboratory conditions were described. They must be considered in pest management programs

since this interspecific gene flow can serve as a bridge for adaptive introgressions among natural populations of *H. armigera* and *H. zea*.

Keywords: Molecular identification, Population genetics, Hybrids, Polyphagia, RNAseq, Pest Management.



## 1. INTRODUÇÃO

Com 18 espécies, o gênero *Helicoverpa* (Hardwick, 1965) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliiothinae) é considerado um grupo de lepidópteros altamente vorazes na fase de lagarta (Fitt, 1989) e consequente, pragas de grande importância agrícola (Cho et al., 2008; Cunningham & Zalucki, 2014). O hábito alimentar do gênero *Helicoverpa* varia entre espécies oligófagas e outras espécies altamente polífagas (Liu et al., 2012). As mariposas possuem hábito migratório (Rochester et al., 1996) e grande capacidade de dispersão (Zalucki & Furlong, 2005). As espécies de maior relevância pelo impacto na redução da produtividade agrícola e perdas econômicas são: *Helicoverpa armigera* (Hübner), *Helicoverpa zea* (Boddie), *Helicoverpa punctigera* (Wallengren), *Helicoverpa assulta* (Guenée) e *Helicoverpa gelotopoeon* (Dyar). A distribuição geográfica do gênero *Helicoverpa* é muito ampla, com pelo menos uma espécie registrada em cada um dos continentes. Sendo *H. armigera* presente em todos os continentes, *H. assulta* na África, Ásia e Oceania, *H. punctigera* na Austrália, *H. zea* nas Américas e *H. gelotopoeon* na América do Sul (Walsh et al., 2018).

A sistemática do gênero *Helicoverpa* tem se tornado alvo de diversos estudos, com o intuito de conhecer a proximidade entre as espécies assim como também a ancestralidade de seus hábitos polífagos (Cho et al., 2008). Assim, *H. punctigera* foi classificada como o grupo basal de *H. gelotopoeon* e *H. assulta* e esta última como grupo basal de *H. armigera* e *H. zea*, sendo estas duas com maior proximidade genética entre elas (Pogue, 2004; Cho et al., 2008). O nome “*Helicoverpa*” foi atribuído a este grupo, pela morfologia do sistema reprodutor dos machos, onde o edeago apresenta uma estrutura em forma de espiral (Hardwick, 1965). As diferentes espécies apresentam grandes semelhanças morfológicas o que tem dificultado sua correta identificação quando só é utilizada a taxonomia clássica, principalmente nas fases jovens de desenvolvimento. Um exemplo disto foi a demora na identificação inicial de *H. armigera* no Brasil, identificada como *H. zea*, praga nativa no país, ou como *H. gelotopoeon* uma espécie nativa e amplamente distribuída no Sul do continente que inclui Argentina, Brasil, Chile e Paraguai (Czepak et al., 2013).

Por se tratar de pragas agrícolas que geram consideráveis perdas nos sistemas de produção, uma ampla gama de alternativas tem surgido com o intuito de

controlar de maneira eficiente sua disseminação, colonização e danos em plantas cultivadas, variando entre estratégias químicas, biológicas e genéticas. Porém os níveis de resistência a alguns grupos inseticidas e plantas geneticamente modificadas têm aumentado, tornando seu uso ineficiente, como no caso dos inseticidas do tipo piretróide no controle de *H. zea* (Jacobson et al., 2009) e, principalmente, *H. armigera* (Joußen et al., 2012; Li et al., 2013; Durigan et al., 2017). A resistência de *H. armigera* a algumas das toxinas *Bt* empregadas em culturas geneticamente modificadas já foi reportada em várias regiões do mundo (Yang et al., 2013).

Dentro deste gênero, existe sem dúvida uma espécie que tem ganhado um maior protagonismo nos últimos anos, catalogada como “mega-pest” (Anderson et al., 2018), a *H. armigera* possui uma distribuição cosmopolita e capacidade de colonizar uma ampla gama de hospedeiros (Cunningham & Zalucki, 2014), possui uma alta capacidade de voo, conseguindo se deslocar até 2000 km (Nibouche et al., 1998), uma elevada taxa de reprodução, conseguindo ovipositar até 1500 ovos durante todo seu ciclo de vida (Eppo, 1981), e artifício para superar variações climáticas prolongadas, com a diapausa (Nibouche, 1998). Estes fatores próprios da sua biologia, misturados com a evolução da resistência para os principais grupos de inseticidas (Joußen et al., 2012; Li et al., 2013) fazem dela um dos insetos-praga mais importantes da agricultura moderna em todas as regiões do mundo.

A relevância desta praga para o Brasil, antes uma praga quarentenária A1, assumiu grande destaque quando *H. armigera* foi reportada no continente americano no ano 2013. Este primeiro reporte constatou sua presença no Brasil nas regiões de Goiás, Mato Grosso e Bahia atacando as culturas da soja e algodão (Czepak et al., 2013; Tay et al., 2013). *Helicoverpa armigera* teve no seu novo habitat um rápido crescimento populacional e uma expansão espacial atingindo rapidamente quase a totalidade do continente sul-americano e avançando para América Central e com relatos de coleta na América do Norte (Leite et al., 2014; Arnemann et al., 2016; Gonçalves et al., 2019). O clima tropical sem fortes variações de temperatura e a rotação de hospedeiros aptos a sustentar o ciclo da espécie, que compõem a paisagem agrícola brasileiras, fizeram com que a colonização de *H. armigera* promovesse perdas severas ao agronegócio brasileiro (Bueno & Sosa-Gómez, 2014). A principal estratégia implementada para seu controle foi o uso de defensivos químicos, porém eles se tornaram rapidamente ineficazes pela presença de alelos que

conferiam a resistência, principalmente, aos inseticidas do grupo dos piretróides (Durigan et al., 2017)

A caracterização molecular das linhagens mitocondriais de *H. armigera* presentes num primeiro momento no Brasil revelou a presença de pelo menos quatro diferentes linhagens no país (Tay et al., 2013; Leite et al., 2014; Mastrangelo et al., 2014). Posteriormente estudos apontaram que as populações eram derivadas de diferentes eventos invasivos provenientes da Europa, Ásia e África (Leite et al., 2014; Anderson et al., 2016) e possivelmente seu ingresso aconteceu em anos anteriores ao reporte oficial da praga no Brasil (Sosa-Gómez et al., 2016).

Este ingresso no continente Americano possibilitou também o encontro de *H. armigera* com sua espécie irmã *H. zea*, a qual se estima que a separação inicial foi aproximadamente 1,5 milhão de anos (Behere et al., 2007). *Helicoverpa zea* também é uma praga com alto potencial de dispersão e com capacidade de entrar em diapausa em regiões de estações bem definidas como na América do Norte (Morey et al., 2012). Esta espécie se desenvolve principalmente em culturas de milho onde o adulto oviposita nos cabelos frescos da espiga em estágio de formação dos grãos (Swenson et al., 2013). As larvas são extremamente competitivas, de modo que a partir do terceiro instar, normalmente, apenas uma larva se desenvolve em cada espiga (Fitt, 1989).

O manejo integrado de pragas tem como base o constante monitoramento dos insetos no campo. Assim podemos saber a amplitude de hospedeiros, conhecer as interações ecológicas com os inimigos naturais e identificar rapidamente as falhas de controle. No entanto, a grande semelhança morfológica entre *H. armigera* e *H. zea*, faz com que a identificação in situ torne-se inviável precisando fazer a amostragem dos indivíduos e posteriormente uma triagem detalhada deles. A diferenciação morfológica com fins taxonômicos entre as duas espécies é realizada por comparação do aparelho reprodutivo dos machos e fêmeas. No macho onde a percepção é mais nítida, existe uma diferenciação no formato da vesícula no edeago que permite que as duas espécies sejam separadas (Pogue, 2004). Porém a dificuldade na percepção das diferenças morfológicas faz com que a identificação morfológica seja realizada com precisão apenas por especialistas. Além disso, a identificação de lagartas não é possível sem um amplo estudo de morfometria. Assim a utilização de marcadores moleculares que permitem o rápido reconhecimento das espécies passa a ser uma

ferramenta crucial para diferenciação de *H. armigera* e *H. zea* (Behere et al., 2008; Perera et al., 2015).

Atualmente a identificação molecular tem ajudado no diagnóstico de *H. armigera* e *H. zea* em insetos coletadas no campo. Entre os marcadores mais utilizados, podemos destacar o marcador baseado na técnica de PCR-RFLP para separar quatro espécies de *Helicoverpa* (*H. armigera*, *H. zea*, *H. punctigera* e *H. assulta*) utilizando dois fragmentos de genes do genoma mitocondrial (Behere et al., 2008). Perera et al. (2015) utilizou a região ribossomal nuclear denominada ITS1 (Internal Transcribed Spacer I) para o desenho de primers específicos para identificação entre *H. armigera* e *H. zea*. Nagoshi et al. (2016) utilizou o sequenciamento de íntrons presentes no gene TPI (Z -linked Triosephosphate Isomerase) para identificação de *H. armigera* e *H. zea*. Finalmente, Walsh et al. (2018) realizou o genoma completo das espécies pragas de *Helicoverpa* gerando uma quantidade significativa de marcadores neutros factíveis de serem utilizados na classificação ao nível de espécie.

Os problemas taxonômicos e evolutivos associados ao encontro entre *H. armigera* e *H. zea* não ficam limitados às dificuldades na identificação das espécies. Existe ainda um assunto evolutivo de uma relevância superior entorno a invasão de *H. armigera* na América, a possibilidade de hibridação entre *H. armigera* e *H. zea*. A proximidade geográfica entre estas duas espécies criou a possibilidade de acasalamento e formação de uma prole híbrida previamente reportada em condições de laboratório por Laster & Hardee (1995) e Laster & Sheng (1995). Assim, essa nova união das espécies possibilitaria a presença de híbridos em campo no Brasil entre *H. armigera* e *H. zea*. Híbridos putativos já foram confirmados recentemente com o uso de diferentes marcadores moleculares (Tay et al., 2013; Leite et al., 2016; 2017; Anderson et al., 2016; 2018; Gonçalves et al., 2019).

Por definição biológica, hibridação é o cruzamento entre duas espécies diferentes (de grupos próximos) que resulta na produção de descendentes férteis (Mallet, 2005; Gompert & Buerkle, 2016). A hibridação pode ser um processo natural ou antropogênico e pode afetar a composição genética das populações, o fitness e em algumas ocasiões pode beneficiar a adaptação local via a introgressão de alelos e genes entre as espécies relacionadas (Burke & Arnold, 2001). Durante o processo de invasão de *H. armigera*, a hibridação com *H. zea* pode ter sido um processo chave para a colonização do novo ambiente.

Em alguns casos o processo de hibridização é influenciado pela ação humana de maneira direta e indiretamente. Isso é devido à ampliação das fronteiras agrícolas, do transporte inadequado de material vegetal contendo organismos exóticos que alcançarão regiões ainda não colonizadas e as mudanças climáticas que tem promovido à alteração na distribuição das espécies e o reencontro de espécies anteriormente separadas (Hulme, 2009; Chown et al., 2014; Abbott et al., 2016; Correa et al., 2019). Durante vários anos, estudos sobre hibridação utilizaram as espécies do gênero *Drosophila* como inseto modelo, os indivíduos híbridos eram produzidos em laboratório, analisado o número de gerações e a chance destes gerar descendência fértil, na grande maioria de vezes sem obter resultados satisfatórios (Barbash, 2010).

Se a hibridação acontece entre insetos considerados praga, o nível de atenção deve ser maior, já que estes podem carregar alelos que confirmam resistência a compostos inseticidas ou alelos que sirvam como mecanismo de detoxificação de compostos químicos que ajudariam a ampliar a gama de hospedeiros o que poderia se traduzir em graves problemas fitossanitários (Walsh et al., 2018; Correa et al., 2019). Uma das barreiras para o adequado manejo destes indivíduos no campo é sua identificação, uma vez que a detecção de fenótipos híbridos é quase impossível já que a introgressão em campo, comumente, não é visível fenotipicamente, gerando assim grandes dificuldades de rastrear esses eventos.

Dentro desse cenário é preciso buscar planos que melhorem o conhecimento sobre o fenômeno de hibridação e sugerir premissas sobre o possível comportamento dos novos indivíduos híbridos. Assim os objetivos gerais deste trabalho foram elucidar o estado de *Helicoverpa* no Brasil, avaliando a flutuação populacional em diferentes regiões para determinar a possibilidade de que *H. armigera* e *H. zea* encontrem-se compartilhando espaço e fonte alimentar. Paralelamente, estudar em diferentes localidades e culturas a possível hibridação e fluxo gênico entre as duas espécies utilizando marcadores de tipo SNPs. E finalmente, uma vez determinada a existência dos híbridos, em condições de laboratório, estudar a preferência alimentar e os mecanismos genéticos e moleculares que possibilitem a adaptação a hospedeiros considerando os sistemas de produção agrícola brasileiros.

## REFERÊNCIAS

- Abbott, R. J., Barton, N. H. e Good, J. M. (2016). Genomics of hybridization and its evolutionary consequences. *Molecular Ecology*, 25(11), 2325–2332.
- Anderson, C. J., Tay, W. T., McGaughran, A., Gordon, K. e Walsh, T. K. (2016). Population structure and gene flow in the global pest, *Helicoverpa armigera*. *Molecular Ecology*, 25(21):5296–5311.
- Anderson, C. J., Oakeshott, J. G., Tay, W. T., Gordon, K., Zwick, A. e Walsh, T. K. (2018). Hybridization and gene flow in the Mega-pest lineage of moth, *Helicoverpa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(19):5034–39.
- Arnemann, J. A., James, W. J., Walsh, T. K., Guedes, J. V. C., Smagghe, G., Castiglioni, E. e Tay, W. T. (2016). Mitochondrial DNA COI characterization of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Paraguay and Uruguay. *Genetics and Molecular Research*, 15(2), 1–8.
- Barbash, D. A. (2010). Ninety years of *Drosophila melanogaster* Hybrids. *Genetics*, 186(1):1–8.
- Behere, G. T., Tay, W. T., Russell, D. A., Heckel, D. G., Appleton, B. R., Kranthi, K. R. e Batterham, P. (2007). Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and its relationship to *H. Zea*. *BMC Evolutionary Biology*, 7(117).
- Behere, G. T., Tay, W. T., Russell, D. A. e Batterham, P. (2008). Molecular markers to discriminate among four pest species of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of Entomological Research*, 98 (6): 599–603.
- BOLD.[http://v3.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser\\_Taxonpage?taxid=200767](http://v3.boldsystems.org/index.php/Taxbrowser_Taxonpage?taxid=200767).  
Data de busca: 18/06/2020.
- Bueno, A. F. e Sosa-Gómez, D. R. (2014). The old world bollworm in the neotropical region: The experience of brazilian growers with *Helicoverpa armigera*. *Outlooks on Pest Management*, 25(2), 261–264.
- Burke, J. M. e Arnold, M. L. 2001. Genetics and the fitness of Hybrids. *Annual Review of Genetics*, 35: 31–52.
- CABI. Invasive Species Compendium. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/26758>. Data de busca: 18/06/2020

- Cho, S., Mitchell, A., Mitter, C., Regier, J., Matthews, M. e Robertson, R. (2008). Molecular phylogenetics of *Heliothine* moths (Lepidoptera: Noctuidae: Heliothinae), with comments on the evolution of host range and pest status. *Systematic Entomology*, 33(4):581–594.
- Chown, S. L., Hodgins, K. A., Griffin, P. C., Oakeshott, J. G., Byrne, M. e Hoffmann, A. A. (2014). Biological invasions, climate change and genomics. *Evolutionary Applications*.
- Corrêa, A. S., Cordeiro, E. M. G. e Omoto, C. (2019). Agricultural insect hybridization and implications for pest management. *Pest Management Science*, 75(11):2857–2864.
- Cunningham, J. P. e Zalucki M. P. (2014). Understanding *Heliothine* (Lepidoptera: Heliothinae) Pests: What is a host plant?. *Journal of Economic Entomology*, 107(3):881–896.
- Czepak, C., Albernaz, K. C., Vivian, L. M., Guimarães, H. O. e Carvalhais, T. (2013). First reported occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 43(1):110–113.
- Durigan, M. R., Corrêa, A. S., Pereira, R. M., Leite, N. A., Amado, D., Sousa D. R. e Omoto, C. (2017). High frequency of CYP337B3 gene associated with control failures of *Helicoverpa armigera* with pyrethroid insecticides in Brazil. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 143:73–80.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO (1981). Data sheets on quarantine organisms n° 110: *Helicoverpa armigera*. 11
- Fitt, G. P. (1989). The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. *Annual Review of Entomology*, 34:17–52.
- Gompert, Z. e Buerkle, C. A. (2016). What, if anything, are hybrids: enduring truths and challenges associated with population structure and gene flow. *Evolutionary Applications*, 9(7), 909–923.
- Gonçalves, R. M., Mastrangelo, T., Rodrigues, J. C. V., Paulo, D. F., Omoto, C., Corrêa, A. S. e 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(13):7378–7401.

- Hardwick, D. F. (1965). The corn earworm complex. *Memories of the Entomological Society of Canada*, 97:5–247.
- Hulme, P. E. (2009). Trade, transport and trouble: Managing invasive species pathways in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology*, 46(1), 10–18.
- Jacobson, A., Foster, R., Krupke, C., Hutchison, W., Pittendrigh, B. e Weinzierl, R. (2009). Resistance to pyrethroid insecticides in *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in Indiana and Illinois. *Journal of Economic Entomology*, 102(6):2289–2295.
- Joußen, N., Agnolet, S., Lorenz, S., Schöne, S. E., Ellinger, R., Schneider, B. e Heckel, D. G. (2012). Resistance of australian *Helicoverpa armigera* to fenvalerate is due to the chimeric P450 enzyme CYP337B3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(38), 15206–15211.
- Laster, M. L. e Hardee, D. D. (1995). Intermating compatibility between North American *Helicoverpa zea* and *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Russia. *Journal of Economic Entomology* 88(1):77–80.
- Laster, M. L. e Sheng, C. F. (1995). Search for hybrid sterility for *Helicoverpa zea* in crosses between the North American *H. zea* and *H. armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from China.” *Journal of Economic Entomology*, 88(5):1288–91.
- Leite, N. A., Alves-Pereira, A., Corrêa, A. S., Zucchi, M. I. e 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., Corrêa, A. S., Alves-Pereira, A., Campos, J. B., Zucchi, M. I. e Omoto, C. (2016). Cross-species amplification and polymorphism of microsatellite loci in *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazilian cropping systems. *Genetics and Molecular Research*, 2: 1-12.
- Leite, N. A., Corrêa, A. S., Michel, A. P., Alves-Pereira, A. Pavinato, V. A. C., Zucchi, M. I. e Omoto C. (2017). Pan-American similarities in genetic structures of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) with implications for hybridization. *Environmental Entomology*, 46(4):1024–34.
- Li, H., Zhang, H., Guan, R. e Miao, X. (2013). Identification of differential expression genes associated with host selection and adaptation between two sibling insect species by transcriptional profile analysis. *BMC Genomics*, 14(1).

- Liu, Z., Scheirs, J. e Heckel, D. G. (2012). Trade-offs of host use between generalist and specialist *Helicoverpa* sibling species: Adult oviposition and larval performance. *Oecologia*, 168(2), 459–469.
- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*, 20(5):229–237.
- Mastrangelo, T., Paulo, D. F., Bergamo, L. W., Morais, E. G. F., Silva, M., Bezerra-Silva, G. e Azeredo-Espin, A. M. L. (2014). Detection and genetic diversity of a *Heliiothine* invader (Lepidoptera: Noctuidae) from north and northeast of Brazil. *Journal of Economic Entomology*, 107(3): 970-980.
- Morey, A. C., Hutchison, W. D., Venette, R. C. e Burkness, E. C. (2012). Cold hardiness of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) pupae. *Environmental Entomology*, 41(1):172–179.
- Nagoshi, R. N., Gilligan, T. M. e Brambila, J. (2016). Combining Tpi and CO1 genetic markers to discriminate invasive *Helicoverpa armigera* from local *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the Southeastern United States. *Journal of Economic Entomology*, 109(5), 2115–2124.
- Nibouche, S. (1998). High temperature induced diapause in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 87(3):271–274.
- Nibouche, S., Buès, R., Toubon, J. e Poitout, S. (1998). Allozyme polymorphism in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae): Comparison of African and European populations. *Heredity*, 80:438–445.
- Perera, O. P., Allen, K C., Jain, D., Purcell, M., Little N.S. e Luttrell, R.G. (2015). Rapid identification of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) using ribosomal RNA internal transcribed spacer 1. *Journal of Insect Science*, 15(1):1–10.
- Pogue, M. G. (2004). A new synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiation of adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliiothinae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97(6):1222–1226.
- Rochester, W. A., Dillon, M. L., Fitt, G. P. e Zalucki, M. P. (1996). A simulation model of the long-distance migration of *Helicoverpa* spp. moths. *Ecological Modelling*, 86(2–3), 151–156.

- Sosa-Gómez, D. R., Specht, A., Paula-Moraes, S. V., Lopes-Lima, A., Yano, S. A. C., Micheli, A., Morais, E. G. F., Gallo, P., Pereira, P. R. V. S., Salvadori, J. R., Botton, M., Zenker, M. M. e Azevedo-Filho, W. S. (2016). Timeline and geographical distribution of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera, Noctuidae: Heliothinae) in Brazil. *Revista Brasileira de Entomologia*, 60(1):101–104.
- Swenson, S. J., Prischmann-Voldseth, D. A. e Musser F. R. (2013). Corn earworms (Lepidoptera: Noctuidae) as pests of soybean. *Journal of Integrated Pest Management*, 4(2):1–8.
- Tay, W. T., Soria, M. F., Walsh, T., Thomazoni, D., Silvie, P., Gajanan T. Behere, G. T. e Downes, S. (2013). A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *PLoS ONE*, 8(11):e80134.
- Walsh, T. K., Perera, O., Anderson, C., Gordon, K., Czepak, C., McGaughran, A., Zwick, A., Hackett, D. e Tay, W. T. (2018). Mitochondrial DNA genomes of five major *Helicoverpa* pest species from the Old and New Worlds (Lepidoptera: Noctuidae). *Ecology and Evolution*, 9(5), 2933–2944.
- Yang, Y., Li, Y. e Wu, Y. (2013). Current status of insecticide resistance in *Helicoverpa armigera* after 15 years of Bt cotton planting in China. *Journal of Economic Entomology*, 106(1):375–81.
- Zalucki, M. P. e Furlong, M. J. (2005). Forecasting *Helicoverpa* populations in Australia: A comparison of regression based models and a bioclimatic based modelling approach. *Insect Science*, 12(1), 45–56.

## 2. ANÁLISE ESPACIAL E TEMPORAL DA DINÂMICA POPULACIONAL E DE HOSPEDEIROS DE *Helicoverpa armigera* E *H. zea* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM QUATRO CENÁRIOS AGRÍCOLAS BRASILEIROS

### RESUMO

O Brasil é conhecido como o celeiro do mundo, já que é um dos principais exportadores de alimento e matérias-primas derivadas de produtos agrícolas. No entanto, o manejo de pragas é um dos grandes desafios para a sustentabilidade da agricultura brasileiras. Entre essas pragas, podemos destacar a *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), uma espécie exótica, que recentemente foi reportada no Brasil. Assim, pouco se sabe sobre a dinâmica populacional e sua gama de hospedeiros no território brasileiro. Isso é dificultado pela grande similaridade morfológica com sua espécie irmã nativa, *H. zea*. Assim, nosso objetivo foi avaliar a abundância de indivíduos de *Helicoverpa armigera* e *H. zea* em quatro diferentes regiões brasileiras ao longo de 53 semanas (2014-2015) e posteriormente estimar, utilizando a técnica dos isótopos estáveis, a dinâmica de hospedeiros entre plantas C3 e C4 de *H. armigera* e *H. zea*. Um total de 6446 mariposas adultas foram coletados, dos quais até 20 insetos por semana de cada um dos quatro locais amostrados foram utilizados para a identificação molecular das espécies de *Helicoverpa* e para a análise dos isótopos  $^{13}\text{C}$  e  $^{12}\text{C}$  para determinar o grupo de cultura que serviu como fonte de alimento no estágio larval (C3 ou C4). O número de insetos total foi maior na localidade de Sorriso - MT, seguido por Luís Eduardo Magalhães – BA. De maneira geral, a maior abundância de insetos foi coletada durante a safra de verão. Em todos os pontos de coleta foi predominante a espécie *H. armigera* se alimentando de plantas C3, porém está também se alimenta de plantas C4. *Helicoverpa zea* foi coletada em todas as localidades, porém em menor abundância. Rolândia – PR foi o local com maior abundância relativa de *H. zea* (17%) quando comparada as outras três regiões. Nossos resultados demonstram uma prevalência de *H. armigera* nos sistemas agrícolas brasileiros e que as duas espécies estão compartilhando territórios e fontes alimentares de norte a sul do Brasil.

**Palavras-chave:** Flutuação populacional, Planta hospedeira, Isótopos estáveis, Manejo integrado de pragas.

**Spatial and temporal analysis of population dynamics and host range of *Helicoverpa armigera* and *H. zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in four Brazilian agricultural scenarios**

### ABSTRACT

Brazil is known as the storage of the world, since it is one of the main exporters of food and raw materials derived from agricultural products. However, pest management is one of the major challenges for the sustainability of Brazilian agriculture. Among these pests, we can highlight

*Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), an exotic species that has recently been reported in Brazil. Thus, little is known about the population dynamics and its host range in the Brazilian territory. This is hampered by the great morphological similarity with its native sister species *H. zea*. The goal was to evaluate the abundance of individuals of *Helicoverpa armigera* and *H. zea* in four different Brazilian regions over 53 weeks (2014-2015) and estimate using the technique of stable isotopes, the host dynamics between plants C3 and C4 of *H. armigera* and *H. zea*. A total of 6446 adult moths were collected, of which up to 20 insects per week from each of the four sites sampled were used for molecular identification of *Helicoverpa* species and for the analysis of isotopes  $^{13}\text{C}$  and  $^{12}\text{C}$  to determine the culture group that served as a food source in the larval stage (C3 or C4). The total number of insects was higher in the locality of Sorriso - MT, followed by Luís Eduardo Magalhães - BA. In general, the highest abundance of insects was collected during the summer harvest. In all collection points, the species *H. armigera* feeding on C3 plants was predominant, but it is also feeding on C4 plants. *Helicoverpa zea* was collected in all localities, but in lower abundance. Rolândia - PR was the site with the highest relative abundance of *H. zea* (17%) when compared to the other three regions. Our results demonstrate a prevalence of *H. armigera* in Brazilian agricultural systems and that the two species are sharing territories and food sources from north to south of Brazil.

**Keywords:** Population fluctuation, Host plant, Stable isotopes, Integrated pest management.

## 2.1 INTRODUÇÃO

O manejo adequado de insetos-praga depende da utilização de várias estratégias oportunas para suprimir sua densidade populacional (Ehler, 2006; Bueno et al., 2013). A tomada de decisões sobre o momento ótimo de aplicação das táticas de controle se fundamenta na correta identificação da praga e no monitoramento constante das mesmas em diferentes culturas e períodos do ano (Barzman et al., 2015). O Brasil é um país com clima e topografia adequada para a agricultura em grande escala (EMBRAPA, 2018), o que faz com que as áreas de plantio sejam de proporções enormes e as mesmas podem ser cultivadas o ano inteiro.

O agronegócio no ano 2019 foi responsável pelo 21,4% do PIB brasileiro (CEPEA/USP), entre as culturas de maior representatividade encontraram-se a soja, cana, milho, café, algodão e citros (IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2019). Sendo assim a identificação errada ou tardia de insetos-praga que afetem diretamente uma ou mais destas culturas causa danos diretos ao agronegócio

devido às perdas geradas na produção, como também pelos gastos excessivos (e às vezes nocivos e ineficientes) no controle tardio das pragas.

*Helicoverpa armigera* é um inseto altamente polífago (Zalucki et al., 1994), foi relatada pela primeira vez no Brasil na região do Cerrado no ano 2013 (Czepak et al., 2013; Tay et al., 2013). Quando foi constatada a sua presença no campo, a principal alternativa para o controle foi à aplicação de inseticidas químicos do grupo piretróide. Porém estudos posteriores reportaram a presença do gene CYP337B3 que confere resistência aos inseticidas deste tipo (Durigan et al., 2017). Uma alternativa de controle também são produtos de origem biológico como vírus e a liberação de inimigos naturais (Parra & Coelho, 2019). No entanto, a utilização de plantas geneticamente modificadas tem sido o principal método de controle empregado nas culturas da soja e algodão no Brasil (Marques et al., 2017; Leite et al., 2018).

Durante o período de larva, *H. armigera* é um inseto altamente polífago o qual se alimenta principalmente das estruturas reprodutivas das plantas (Liu et al., 2004; 2010). Quando adulto, *H. armigera* alimenta-se de pólen e consegue migrar longas distâncias conseguindo atingir uma alta diversidade de hospedeiros, o que torna comum a mudança de hospedeiro de uma geração para outra (Zhou et al., 2019). Sua espécie irmã, *H. zea*, também é um inseto polífago, porém com um menor número de hospedeiros registrados quando comparado a *H. armigera*, tendo uma destacada preferência pelas estruturas reprodutivas das plantas de milho e algodão.

Normalmente o monitoramento de pragas utiliza como estratégia de captura as armadilhas com luz ou com feromônio, sendo que esta atrai principalmente os machos (Baker et al., 2011). Porém ao atrair indivíduos adultos, em espécies polípagas, não conseguimos associar com a fonte alimentar dos estados larvais e consequente conhecer a amplitude de hospedeiros que está sendo explorada pela espécie (Baker et al., 2019). A análise de isótopos estáveis é uma ferramenta que ajuda a determinar a rota de carbono dentro de diferentes organismos nos ecossistemas, utilizando como princípio a diferença existente nos isótopos de carbono em grupos de plantas com diferente metabolismo fotossintético C3 e C4 (Rounick & Winterbourn, 1986).

As análises da proporção  $^{13}\text{C}$  e  $^{12}\text{C}$  utilizam como base a taxa distinta de acúmulo de carbono dentro dos organismos, o que pode ser útil para conhecer o comportamento alimentar de animais fitófagos (Ambika et al., 2005; Baker & Tann,

2013). Plantas com o tipo de metabolismo C3 e C4 diferem no processamento do carbono durante a fotossíntese (Wang et al., 2012). Plantas C3 incorporam o CO<sub>2</sub> atmosférico por carboxilação da ribulose bisfosfato (RuBP) produzindo três moléculas de carbono e discriminam as moléculas de <sup>13</sup>C apresentando valores entre -20/1000 a -34/1000. Enquanto as plantas C4 incorporam o CO<sub>2</sub> por carboxilação do fosfoenolpiruvato (PEP) produzindo quatro moléculas de carbono (Hobbie & Werner, 2004) e não discriminam as moléculas de <sup>13</sup>C, apresentam valores que variam de -9/1000 a -17/1000 deltas. Utilizando este princípio, estudos para avaliar a utilização de plantas hospedeiras por diferentes espécies de insetos têm sido desenvolvidos utilizando a análise de isótopos de <sup>13</sup>C e <sup>12</sup>C (Gould et al., 2002; Head et al., 2010).

Adicionalmente o uso de ferramentas moleculares tem ajudado na identificação das espécies de difícil diferenciação morfológica (Hebert et al., 2003; Floyd et al., 2010; Correa et al., 2013; Parish et al., 2017). Isso não é diferente para as espécies de *Helicoverpa*, onde vários marcadores moleculares já foram desenvolvidos e tornaram-se ferramentas úteis para o levantamento populacional de *H. armigera* e *H. zea* a campo (Behere et al., 2008; Perera et al., 2015; Nagoshi et al., 2016). Desta forma, combinando as estratégias de identificação molecular e análise de isótopos estáveis, os nossos objetivos foram avaliar a flutuação populacional dos indivíduos e estimar a utilização de hospedeiros C3 e C4 de *H. armigera* e *H. zea* em quatro diferentes regiões brasileiras ao longo de 53 semanas entre dezembro de 2014 e dezembro de 2015.

## 2.2 MATERIAL & MÉTODOS

### 2.2.1. Coleta de Indivíduos

Entre dezembro de 2014 e dezembro de 2015 foram escolhidas quatro mesorregiões brasileiras reconhecidas como grandes produtoras agrícolas para coletas semanais de *Helicoverpa* spp. (Tabela 2.1). Em cada área foram colocadas duas armadilhas com feromônio para captura de *Helicoverpa* spp. (BIO HELICOVERPA®, ChemTica Internacional, S.A.) (Figura 2.1). Os insetos eram retirados, contados e as iscas trocadas semanalmente. Posteriormente, até 20 indivíduos por semana eram liofilizados e divididos em duas partes. A primeira parte correspondente ao tórax, abdômen e asas foram destinadas para a análise do conteúdo de isótopos estáveis de Carbono (<sup>13</sup>C). A segunda correspondente a

cabeça e as pernas foram utilizadas para a identificação molecular das espécies de *Helicoverpa* spp. Esses dados foram utilizados para estimar proporção de indivíduos de *H. armigera* e *H. zea* e o grupo (C3 ou C4) de plantas hospedeiras utilizadas como fonte de alimento pelas larvas das mariposas coletadas em cada área.



**Figura 2.1.** Armadilha para captura de *Helicoverpa* spp. em área de plantio de soja na localidade de Luís Eduardo Magalhaes, BA

**Tabela 2.1.** Áreas de coleta de insetos adultos de *Helicoverpa armigera* e *H. zea*.

Cidade, Estado	Coordenadas geográficas	Região agrícola
Luís Eduardo Magalhaes, BA	-11,959167; -46,119167	Extremo Oeste Baiano
Sorriso, MT	-12,462417; -55,684250	Norte Mato-grossense
Rolândia, PR	-23,313056; -51,491389	Norte Central Paranaense
Não-me-toque, RS	-28,322730; -52,712500	Noroeste Rio-Grandense

### 2.2.2. Análise de Isótopos Estáveis

Com o intuito de conhecer a fonte alimentar (C3 ou C4) das espécies *H. armigera* e *H. zea* foi analisada a proporção da concentração do Carbono  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  presente no tecido dos insetos adultos. O procedimento foi terceirizado e realizado pela empresa “Monsanto Company, St. Louis, MO”.

O procedimento seguiu os seguintes passos: asas das mariposas foram embrulhadas em papel alumínio e inseridas em um reator de combustão a 950°C. O material foi completamente queimado em CO<sub>2</sub> e o mesmo separado utilizando uma coluna de GC. Posteriormente, para análise de <sup>13</sup>C, a coluna foi 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 controlar a variação do instrumento, um gás de referência de altíssima pureza foi introduzido na interface ConFlo IV em um momento que não se sobreponha aos picos de cada amostra analisada. Para estimar os valores de carbono <sup>13</sup>C foi utilizado o pacote de software IRMS Isodat. O cálculo dos valores finais de <sup>13</sup>C de cada amostra, em cada ciclo de análise, foi realizado com os padrões USGS40 e USGS41 (United States Geological Survey) com valores conhecidos. A classificação dos indivíduos dependendo da fonte alimentar foi realizada seguindo o protocolo de Gould et al., 2002, o qual classifica as mariposas com valores entre -20 e -18‰ como alimentadas de plantas com metabolismo fotossintético C<sub>3</sub> e os valores entre -17 e -15‰ como alimentadas de plantas com metabolismo fotossintético C<sub>4</sub>.

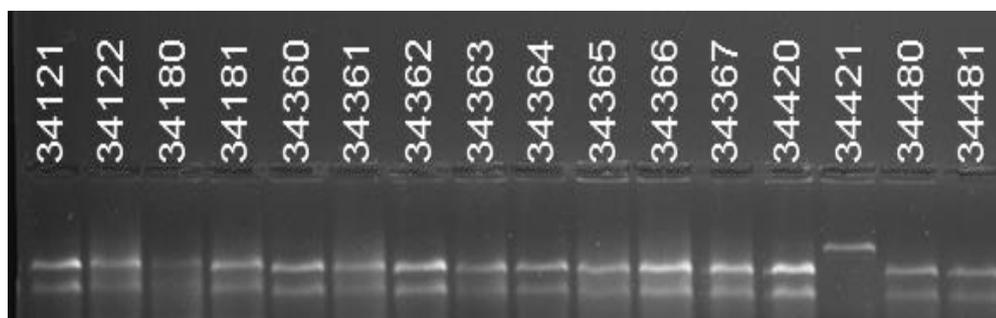
### **2.2.3. Extração de DNA**

O DNA foi extraído seguindo o método adaptado de Clark et al. (2001). Para isso, em tubos individuais foram dispostos a cabeça e as pernas dos insetos. Estes foram macerados com 500 µL de tampão CTAB (100 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 1,4 M de NaCl; 0,02M de EDTA, pH 8,0; CTAB (2%), β-mercaptoetanol 0,2% (adicionado separado dos demais componentes do tampão)) e 10 µL de proteinase K. Posteriormente foram incubados em banho-maria por 60 minutos a 65 °C. Passado este tempo as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 14000 rpm e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. No sobrenadante foram adicionados 600 µL de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) e centrifugou-se novamente a 14000 rpm por 10 minutos. Novamente o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado 400 µL de isopropanol. Os tubos ficaram a 4 °C por toda a noite. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12500 rpm, o sobrenadante foi descartado. Os pellets de DNA foram lavados duas vezes com 600 µL de álcool 90%, secos em temperatura ambiente, ressuspendidos em 50 µL de água milliQ e deixados a 4 °C por toda a noite para hidratação. Posteriormente foi

adicionado 1  $\mu\text{L}$  de RNase por amostra e levadas ao banho maria por 60 minutos a 37  $^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, o DNA extraído foi armazenado em freezer -20  $^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.2.4. Identificação molecular de *H. armigera* e *H. zea*

A identificação molecular foi realizada de acordo com o protocolo de Behere et al. (2008) utilizando como base um polimorfismo presente em um fragmento do gene COI de 511pb de *H. armigera* e *H. zea* amplificado via PCR e posteriormente cortado com a enzima de restrição BstZ17I. Para a reação de PCR foi utilizado 1  $\mu\text{L}$  de DNA (40ng), 3,4  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, 1  $\mu\text{L}$  de tampão (10X) (Thermo), 1,5  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 1  $\mu\text{L}$  de dNTP (2,5mM), 1  $\mu\text{L}$  de cada primer (5 pmols) e 0,15  $\mu\text{L}$  de Taq (5U/ $\mu\text{L}$ ) (Thermo). Os primers foram COI-F (5' CTC AAA TTA ATT ACT CCC CAT C 3') e COI-R (5' GGA GGT AAG TTT TGG TAT CAT T 3'). O programa no termociclador consistiu em um passo inicial de desnaturação a 94 $^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos a 94 $^{\circ}\text{C}$  durante 0,5 minutos, 50 $^{\circ}\text{C}$  por 0,5 minutos, e 72 $^{\circ}\text{C}$  durante 1,5 minutos, terminando com um passo de extensão a 72 $^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Posteriormente foi realizada a clivagem com enzima de restrição utilizando 4  $\mu\text{L}$  da reação de PCR, 5  $\mu\text{L}$  de água ultra pura, 1,5  $\mu\text{L}$  de 10X Buffer (CutSmart Buffer Uniscience) e 0,5  $\mu\text{L}$  da enzima BstZ17I incubados em banho-maria a 37 $^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos, o resultado foi visualizado num gel de agarose 2% (p/v). A enzima identifica uma mutação específica de *H. armigera* (não presente em *H. zea*) promovendo um corte dentro do fragmento amplificado e a formação de dois fragmentos de 318 e 193 pb, para *H. zea* essa enzima não corta o fragmento mantendo o tamanho original de 511 pb (Figura 2.2).

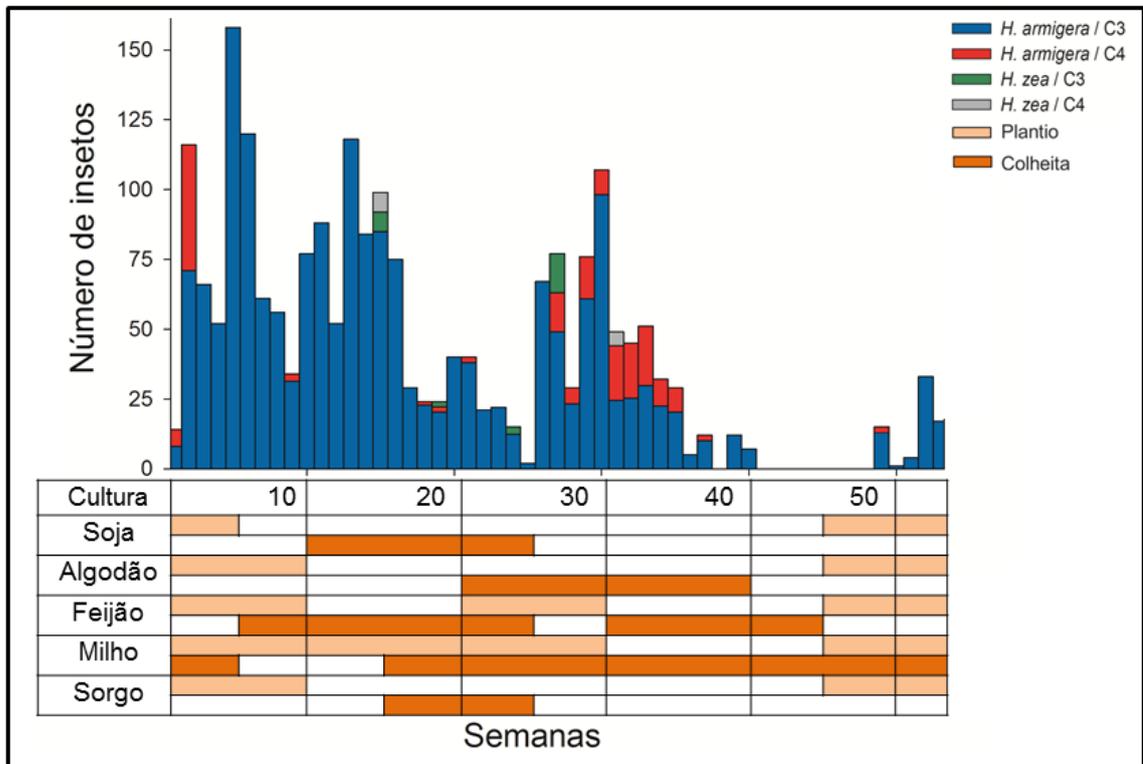


**Figura 2.2.** Gel de agarose para identificação molecular de espécies utilizando o marcador COI, amostras com uma banda correspondem a indivíduos de *H. zea* e com duas bandas a *H. armigera*.

## 2.3 RESULTADOS

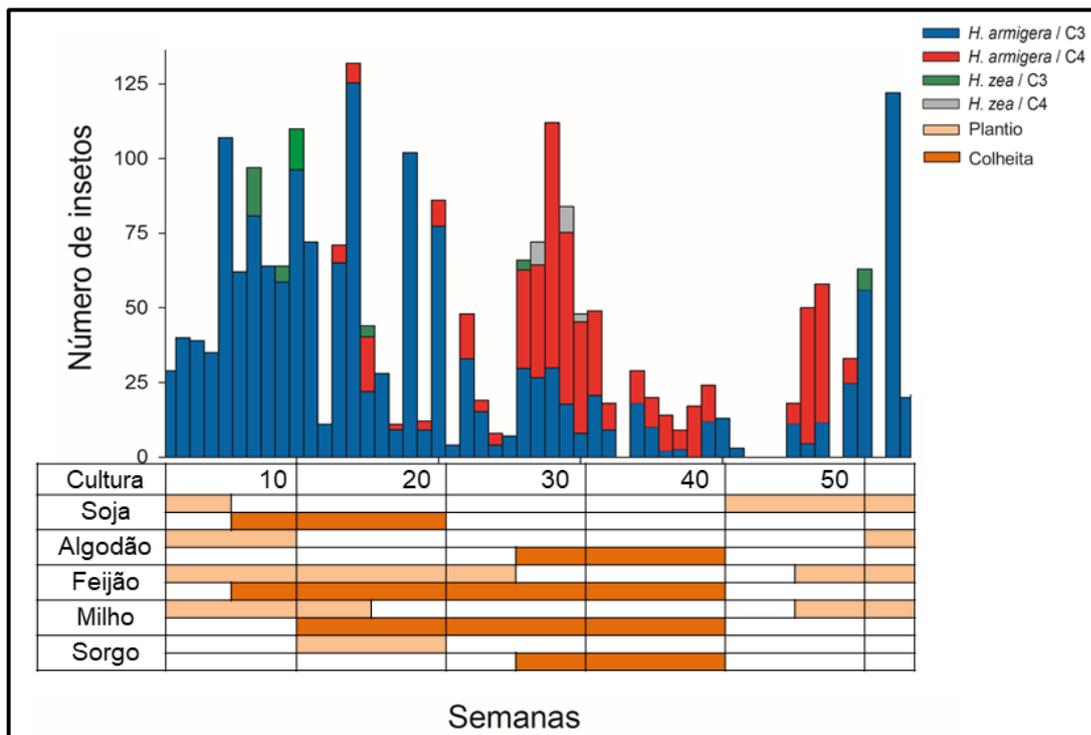
O número total de indivíduos de *Helicoverpa* spp. coletados variou ao longo das semanas nos quatro locais de coleta (Figura 2.3 a 2.6). Considerando o valor acumulado nas 53 semanas, podemos destacar que as regiões de Sorriso – MT e Luís Eduardo Magalhães – BA apresentaram a maior densidade populacional de *Helicoverpa* spp. com 2244 e 2187 indivíduos coletados respectivamente; seguidos por Não-Me-Toque – RS com 1127 indivíduos e Rolândia – PR com 858 indivíduos. Em todos os locais a espécie mais abundante foi *H. armigera* que correspondeu 98,2% do total dos indivíduos coletados em Luís Eduardo Magalhães – BA, 97,3% dos coletados em Sorriso – MT, 83,0% em Rolândia – PR e 96,2% em Não-Me-Toque – RS.

Durante o ano 2015 na região de Luís Eduardo Magalhães – BA, a distribuição populacional de *H. armigera* variou ao longo do ano, com maior número de indivíduos associados à época de crescimento vegetativo e reprodutivo das culturas da soja e algodão (Figura 2.3). A semana número 5 foi o período de coleta com o maior número de insetos, 158 indivíduos numa única amostragem. Os indivíduos de *H. armigera* provenientes de plantas C3 foram predominantes, associados aos estágios vegetativos e reprodutivos dos cultivos de soja, algodão e feijão. Entre as semanas 25 a 40 também se coletaram amostras de *H. armigera* alimentadas com plantas C4, época em que à ausência de soja e algodão no campo e à presença de culturas como milho e sorgo. Entre as semanas 40 a 50 houve uma diminuição do número de insetos, fenômeno que coincide com a ausência dos cultivos considerados hospedeiros primários e plantados em grandes áreas agrícolas. A partir da semana 48 quando o plantio de todas as culturas é iniciado, o número de insetos retoma um crescimento nas áreas.



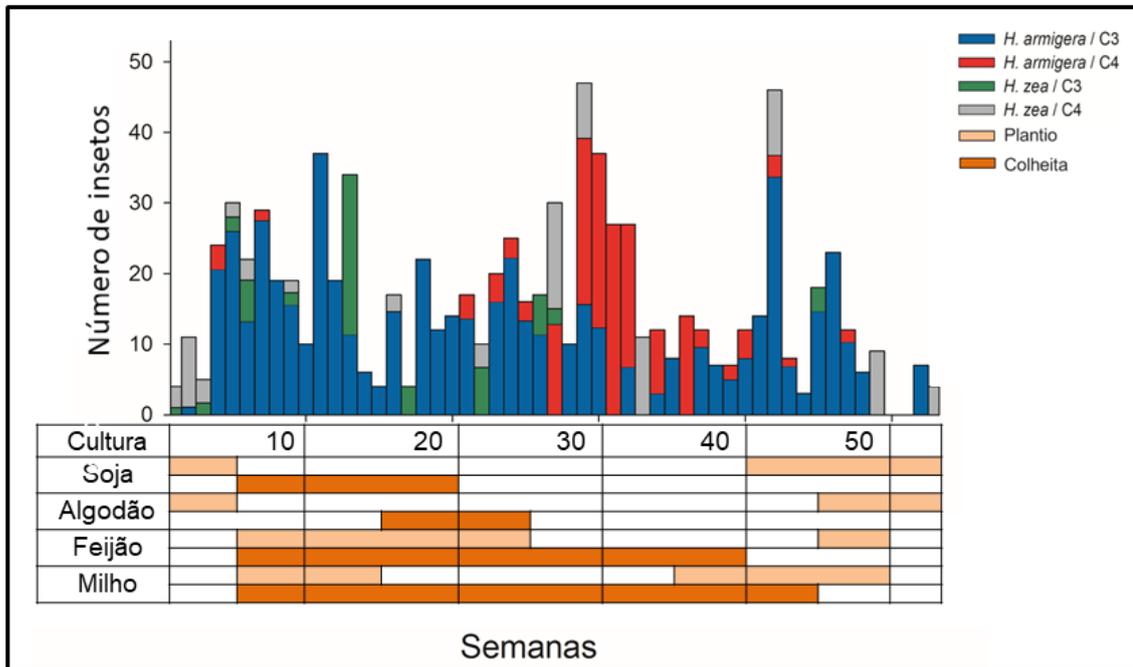
**Figura 2.3.** Flutuação populacional e análise de C13 de indivíduos de *Helicoverpa* spp em Luis Eduardo Magalhães - BA. Fonte: CONAB, 2015

Na região de Sorriso, localizada no estado de Mato Grosso, durante os estágios vegetativo e reprodutivo da soja e do algodão o inseto predominante foi *H. armigera* (Figura 2.4). Entre as semanas 25 a 50 na ausência em campo de destas culturas, *H. armigera* alimenta-se proporcionalmente de plantas C3 e C4, época do ano coincide com a presença das culturas de milho e sorgo. Semelhante ao ocorrido na localidade de Luís Eduardo Magalhães - BA, insetos de *H. zea* foram coletados esporadicamente durante as amostragens se alimentando de plantas C3 e C4.



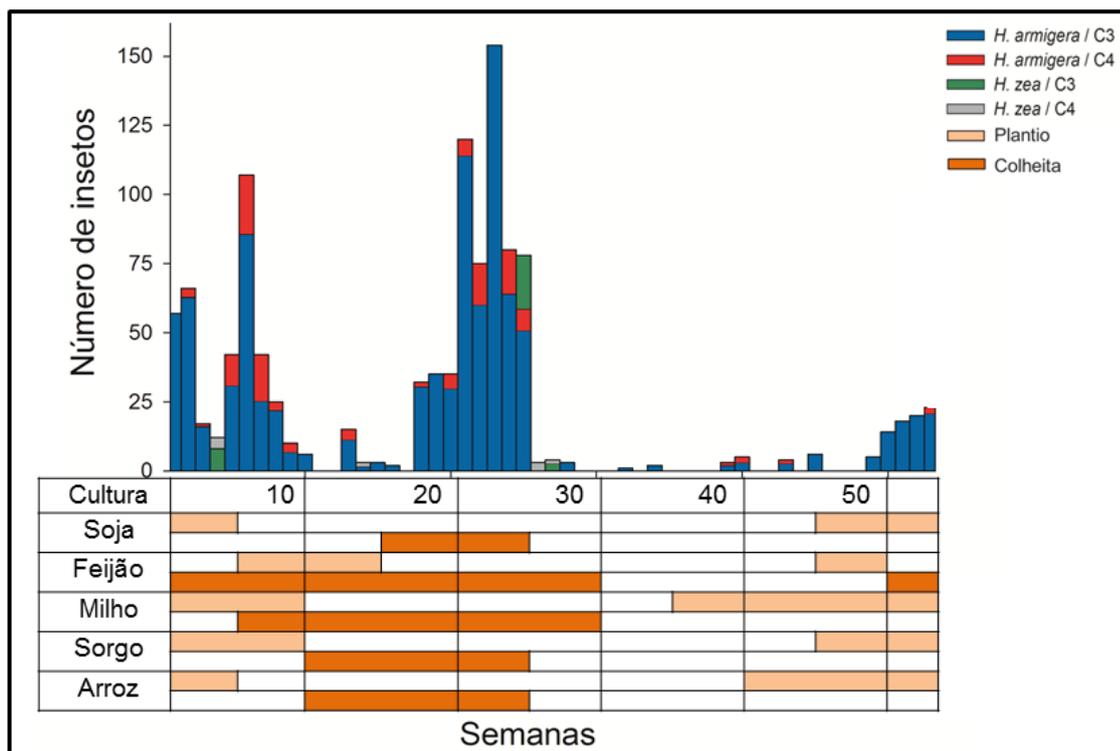
**Figura 2.4.** Flutuação populacional e análise de C13 de indivíduos de *Helicoverpa* spp em Sorriso - MT. Fonte: CONAB, 2015

Na região de Rolândia - PR a quantidade de insetos coletados teve menores proporções quando comparada com as amostragens das outras localidades (Figura 2.5). O número total de insetos coletados semanalmente manteve-se sempre abaixo dos 50 indivíduos. Amostras de *H. armigera* foram coletadas ao longo do ano, durante a época de crescimento vegetativo e reprodutivo das culturas de soja e algodão o maior número de indivíduos coletados foi de *H. armigera* provenientes de plantas C3. Nas semanas 20 a 40 foram coletadas *H. armigera* alimentadas com plantas C4, no mesmo período a cultura prevaiente no campo é o milho. Indivíduos de *H. zea* estão presentes em menor proporção que de *H. armigera*. *Helicoverpa zea* provenientes de plantas C4 foi coletada em várias semanas do ano. Provavelmente a fonte de alimento de *H. zea* foi o milho porque sua amostragem coincide com a presença desta cultura no campo, também foram coletados esporadicamente *H. zea* provenientes de plantas C3 durante as semanas 5 a 25.



**Figura 2.5.** Flutuação populacional e análise de C13 de indivíduos de *Helicoverpa* spp em Rolândia - PR. Fonte: CONAB, 2015

Na região de Não-Me-Toque no Rio Grande do Sul, o número de insetos variou significativamente durante o ano, apresentando coletas superiores aos 75 indivíduos entre as semanas 20 a 25 e semanas onde nenhum inseto foi coletado (semanas 26-48) (Figura 2.6). Indivíduos de *H. armigera* provenientes de plantas C3 foram coletados durante as semanas 0 até a 25 e posteriormente das semanas 49 a 53 que correspondem às fases vegetativa e reprodutiva da soja e do feijão. Durante as semanas 5 a 25 foram coletados também indivíduos de *H. armigera* provenientes de plantas C4. Nesta mesma época encontravam-se disponíveis no campo plantas de milho, sorgo e arroz. Entre as semanas 25 a 50, os insetos apresentaram uma diminuição e uma baixa aparição nas amostragens como resposta possivelmente à limitada oferta de culturas na área devido ao inverno mais rigoroso.



**Figura 2.6.** Flutuação populacional e análise de C13 de indivíduos de *Helicoverpa* spp em Não-me-toque - RS. Fonte: CONAB, 2015.

## 2.4 DISCUSSÃO

Apesar de um tempo inferior a uma década da invasão de *H. armigera* no Brasil, nossos resultados apontam que existe uma alta incidência da espécie em diferentes regiões durante todos os meses do ano superando em número absoluto a *H. zea*, uma espécie nativa das Américas. Isso reforça a rápida expansão territorial e demográfica de *H. armigera* no Brasil (Leite et al., 2014; Gonçalves et al., 2019). Nossos dados confirmam *H. armigera* como uma das principais pragas da agricultura brasileira.

A maior abundância de *H. armigera* na região do bioma Cerrado (Sorriso – MT e Luís Eduardo Magalhães – BA) pode estar associado com as condições climáticas e agrícolas, onde invernos pouco rigorosos e grandes extensões territoriais de áreas cultivadas sucessivamente ao longo de todo o ano favorecem as populações de *H. armigera*. Com destaque para os cultivos de soja e algodão, que quando estão no seu ciclo vegetativo e reprodutivo, podem sustentar um grande número de lagartas, e consequentemente produzem um grande número de mariposas, como demonstrado na curva de abundância estimada durante nossas coletas semanais. Estudos de

biologia de *H. armigera* em condições de laboratório confirmam a grande viabilidade sobre plantas de soja e algodão (Suzana et al., 2015; Reigada et al., 2016).

A adaptação de *H. armigera* as condições climáticas e ao ambiente agrícola do cerrado brasileiro fica mais evidenciado quando comparamos com a flutuação populacional no sítio de coleta em Não-Me-Toque, RS. Onde a espécie ocorreu em menor abundância e concentrada nos meses do verão, provavelmente, devido à presença de um inverno mais rigoroso entre os meses de maio a setembro. O inverno mais rigoroso também impede o plantio dos principais cultivos agrícolas utilizados como hospedeiros por ambas as espécies de *Helicoverpa*.

As análises de isótopos estáveis revelaram que ambas as espécies utilizam como hospedeiros plantas com metabolismo C3 e C4, o que reforça a característica de polifagia de ambas as espécies (Liu et al., 2004; Jackson et al., 2008). A maior incidência de *Helicoverpa* sobre plantas C3 pode estar associada ao melhor desempenho biológico das espécies sobre essas culturas, e principalmente, a maior magnitude de áreas cultivadas com plantas C3 quando comparada a plantas C4 nas regiões de coleta. Isso é confirmado principalmente para *H. armigera*, onde no período do ano em que a soja é abundante no campo (novembro a março), nós tivemos o maior número de insetos absolutos coletados e predominantemente mariposas provenientes de lagartas que se alimentaram de hospedeiros C3. Já na ausência de cultivos de soja, houve um aumento na proporção de mariposas provenientes de lagartas que se alimentaram de plantas C4. A grande influência da soja na flutuação populacional de *H. armigera* pode ser atribuída à grande área plantada da cultura no país ( $\approx$  35 milhões de hectares) e a alta viabilidade das larvas de *H. armigera* quando alimentadas desse hospedeiro (Suzana et al., 2018).

O hospedeiro principal de *H. zea* é reconhecidamente a cultura do milho em seu estágio reprodutivo (presença de espigas) (Leite et al., 2014; 2017). Apesar de não possuir alta viabilidade em cultivos de soja, cultivos simultâneos de tomate, por exemplo, poderiam justificar a presença de mariposas identificadas como *H. zea* provenientes de plantas C3 nas diferentes regiões brasileiras (EFSA Panel on Plant Health, 2020). A maior proporção de *H. zea* em relação a *H. armigera* foi relatada em Rolândia – PR. O Paraná é uma região que apresenta um histórico maior de plantações de milho na safra de verão e também possui um mosaico agrícola de

cultivos mais diversificado quando comparado a regiões do cerrado (Silva et al., 2020) o que parece beneficiar as populações de *H. zea*.

Nossos dados reforçam que *H. armigera*, assim como *H. zea*, estão amplamente espalhadas em todo o território brasileiro e compartilham temporalmente e espacialmente essas regiões. Alguns estudos sinalizam que existe uma grande competição no campo entre as espécies (Bentivenha et al., 2016), enquanto outros diferenciam elas por hospedeiro, sendo as plantas dicotiledôneas preferidas por *H. armigera* e os cultivos de milho preferidos por *H. zea* (Leite et al., 2014; 2017). A aplicação de pesticidas e a presença de plantas geneticamente modificadas podem também influenciar a dinâmica populacional de ambas as espécies no Brasil, uma vez, que essas táticas de controle podem favorecer ou desfavorecer determinada espécie de acordo com o grau de eficiência de cada tática de controle (Dourado et al., 2016; Cordeiro et al., 2014; Leite et al., 2018; Rabelo et al., 2020).

Esta ocorrência simultânea aumenta as dúvidas sobre a dinâmica de hibridização entre as espécies, uma vez que, híbridos putativos, identificados por marcadores moleculares, já foram relatos no Brasil (Anderson et al., 2018; Leite et al., 2017). No entanto, para a identificação das espécies nesse trabalho foi utilizado como marcador um fragmento do gene mitocondrial Citocromo c Oxidase subunidade I (COI) utilizando a técnica de PCR-RFLP (Behere et al., 2008). Foi escolhido por ser um marcador de origem materna e sem recombinação, trazendo maior confiança e estabilidade na nossa identificação. Além disso, é o marcador mais rápido e barato de ser aplicado, pois não depende de sequenciamento do gene. No entanto, não podemos determinar a existência de populações híbridas nestes locais durante o ano de estudo. O fenômeno de hibridação entre espécies nativas e introduzidas pode favorecer a adaptação da espécie introduzida e/ou a depressão da espécie nativa (Todesco et al., 2016; Correa et al., 2019). Hipótese essa que se encaixa no atual cenário de sucesso de *H. armigera* na América do Sul e a baixa densidade populacional de *H. zea*.

Por fim, nós confirmamos que *H. armigera* se tornou, em um pequeno espaço de tempo após a sua invasão, a espécie mais abundante do gênero *Helicoverpa* no Brasil. Além disso, *H. armigera* e *H. zea* compartilham espacialmente e temporalmente as regiões geográficas e competem por hospedeiros aumentando a importância de estudos de competição, impacto das táticas de controle em cada espécie e de hibridação. Baseado nos resultados aqui obtidos, as estratégias de manejo, quando

não aplicáveis para ambas as espécies, devem visar prioritariamente *H. armigera* no atual cenário agrícola brasileiro. Com destaque para as regiões do cerrado que são áreas de abundância de cultivos de soja e algodão e invernos pouco rigorosos que parecem favorecer a ocorrência de *H. armigera* em alta abundância durante todo o período do ano.

## REFERÊNCIAS

- Ambika, T., Sheshshayee, M. S., Viraktamath, C. A. e Udayakumar, M. (2005). Identifying the dietary source of polyphagous *Helicoverpa armigera* (Hübner) using carbon isotope signatures. *Current Science*, 89(12):1982-1984.
- Anderson, C. J., Oakeshott, J. G., Tay, W. T., Gordon, K., Zwick, A. e Walsh, T. K. (2018). Hybridization and gene flow in the Mega-pest lineage of moth, *Helicoverpa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(19):5034–5039.
- Baker, G. H., Tann, C. R. e Fitt, G. P. (2011). A tale of two trapping methods: *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera, Noctuidae) in pheromone and light traps in Australian cotton production systems. *Bulletin of Entomological Research*, 101(1): 9–23.
- Baker, G. H. e Tann, C. R. (2013). Mating of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) moths and their host plant origins as larvae within Australian cotton farming systems. *Bulletin of Entomological Research*, 103(2), 171–181.
- Baker, G. H., Tann, C. R., Verwey, P. e Lisle, L. (2019). Do the plant host origins of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae) moth populations reflect the agricultural landscapes within which they are caught?. *Bulletin of Entomological Research*, 109(1): 1–14.
- Barzman, M., Bàrberi, P., Birch, A. N. E., Boonekamp, P., Dachbrodt-Saaydeh, S., Graf, B., Hommel, B., Jensen, J. E., Kiss, J., Kudsk, P., Lamichhane, J. R., Messéan, A., Moonen, A. C., Ratnadass, A., Ricci, P., Sarah, J. L. e Sattin, M. (2015). Eight principles of integrated pest management. *Agronomy for Sustainable Development*, 35(4), 1199–1215.
- Behere, G. T., Tay, W. T., Russell, D. A. e Batterham, P. (2008). Molecular markers to discriminate among four pest species of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of Entomological Research*, 98 (6): 599–603.

- Bentivenha, J. P. F., Paula-Moraes, S. V., Baldin, E. L. L., Specht, A., Da Silva, I. F. e Hunt, T. E. (2016). Battle in the new world: *Helicoverpa armigera* versus *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE*, 11(12):e0167182.
- Bueno, A. F., Paula-Moraes, S. V., Gazzoni, D. L. e Pomari, A. F. (2013). Economic thresholds in soybean-Integrated pest management: Old concepts, current adoption and adequacy. *Neotropical Entomology*, 42(5): 439–447.
- Clark, T. L., Meinke, L. J. e Foster, J. E. (2001). Molecular phylogeny of *Diabrotica beetles* (Coleoptera: Chrysomelidae) inferred from analysis of combined mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Insect Molecular Biology*, 10(4):303–314.
- CEPEA/USP. 2020 PIB Do Agronegócio - Brasil. *Centro de Estudo Avançado em Economia Aplicada - Esalq/USP*
- Companhia Nacional de Abastecimento, CONAB (2015). Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Décimo primeiro levantamento, 11(2).
- Cordeiro, E. M. G., Corrêa, A. S. e Guedes, R. N. C. (2014). Insecticide-mediated shift in ecological dominance between two competing species of grain beetles. *PLoS ONE*, 9(6),1–9.
- Corrêa, A. S., Orlando de Oliveira, L., Braga, L. S. e Guedes, R. N. C. (2013). Distribution of the related weevil species *Sitophilus oryzae* and *S. zeamais* in Brazil. *Insect Science*, 20(6), 763-770.
- Corrêa, A. S., Cordeiro, E. M. G. e Omoto, C. (2019). Agricultural insect hybridization and implications for pest management. *Pest Management Science*, 75(11), 2857–2864.
- Czepak, C., Albernaz, K. C., Vivan, L. M., Guimarães, H. O. e Carvalhais, T. (2013). First reported occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 43(1):110–113.
- Dourado, P. M., Bacalhau, F. B., Amado, D., Carvalho, R. A., Martinelli, S., Head, G. P. e Omoto, C. (2016). High susceptibility to Cry1Ac and low resistance allele frequency reduce the risk of resistance of *Helicoverpa armigera* to Bt soybean in Brazil. *PLoS ONE*, 11(8), 1–15.
- Durigan, M. R., Corrêa, A. S., Pereira, R. M., Leite, N. A., Amado, D., Sousa D. R. e Omoto, C. (2017). High frequency of CYP337B3 gene associated with control failures of *Helicoverpa armigera* with pyrethroid insecticides in Brazil. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 143:73–80.

- EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), Bragard, C., Dehnen-Schmutz, K., Di Serio, F., Gonthier, P., Jacques, M., Jaques Miret, J. A., Justesen, A. F., Magnusson, C. S., Milonas, P., Navas-Cortes, J. A., Pamell, S., Potting, R., Reignault, P. L., Thulke, H. H., Van der Werf, W., Civera, A. V., Yuen, J., Zappalà, L., Czwieneczek, E., Streissl F. e MacLeod, A. (2020). Pest categorization of *Helicoverpa zea*. *EFSA Journal*, 18(7), 6177–6208.
- Ehler, L. E. (2006). Integrated pest management (IPM): definition, historical development and implementation, and the other IPM. *Pest Management Science*, 63: 787–789.
- EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil. (2018). Visão 2030 - O futuro da agricultura brasileira. *Embrapa*, 212.
- Floyd, R., Lima, J., de Waard, J., Humble, L. e Hanner, R. (2010). Common goals: policy implications of DNA barcoding as a protocol for identification of arthropod pests. *Biological Invasions*, 12: 2947–2954.
- Gonçalves, R. M., Mastrangelo, T., Rodrigues, J. C. V., Paulo, D. F., Omoto, C., Corrêa, A. S. e 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(13), 7378-7401.
- Gould, F., Blair, N., Reid, M., Rennie, T. L., Lopez, J. e 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 of the United States of America*, 99(26):16581–16586.
- Head, G., Jackson, R. E., Adamczyk, J., Bradley, J. R., Van Duyn, J., Gore, J., Hardee, D. D., Leonard, B. R., Luttrell, R., Ruberson, J., Mullins, J. W., Orth, R. G., Sivasupramaniam, S. e Voth, R. (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*, 47(3), 583–592.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S. e De Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome C oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270, S96-S99.

- Hobbie, E. A. e Werner, R. A. (2004). Intramolecular, compound-specific and bulk carbon isotope patterns in C3 and C4 plants: a review and synthesis. *New Phytologist*, 161: 371–385.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2019). Produção Agrícola Municipal - Culturas Temporárias e Permanentes 2019. 42.
- Jackson, R. E., Bradley, J. R., Van Duyn, J., Leonard, B. R., Allen, K. C., Luttrell, R., Ruberson, J., Adamczyk, J., Gore, J., Hardee, D. D., Voth, R., Sivasupramaniam, S., Mullins, J. W. e Head, G. (2008). Regional assessment of *Helicoverpa zea* populations on cotton and non-cotton crop hosts. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 126(2): 89–106.
- Leite, N. A., Alves-Pereira, A., Corrêa, A. S., Zucchi, M. I. e 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., Corrêa, A. S., Michel, A. P., Alves-Pereira, A. Pavinato, V. A. C., Zucchi, M. I. e Omoto C. (2017). Pan-American similarities in genetic structures of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) with implications for hybridization. *Environmental Entomology*, 46(4):1024–1034.
- Leite, N. A., Pereira, R. M., Durigan, M. R., Amado, D., Fatoresso, J., Medeiros, F. C. L. e Omoto, C. (2018). Susceptibility of Brazilian Populations of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to Vip3Aa20. *Journal of Economic Entomology*, 111(1), 399–404.
- Liu, Z., Li, D., Gong, P. e Wu, K. (2004). Life table studies of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), on different host plants. *Environmental Entomology*, 33(6), 1570–1576.
- Liu, Z., Scheirs, J. e Heckel, D. G. (2010). Host plant flowering increases both adult oviposition preference and larval performance of a generalist herbivore. *Environmental Entomology*, 39(2), 552–560.
- Marques, L. H., Santos, A. C., Castro, B. A., Moscardini, V. F., Rossetto, J., Silva, O. A. N., Zobiolo, L. H. S., Valverde-Garcia, P., Babcock, J. M., Storer, N. P., Rule, D. M. e Fernandes, O. A. (2017). Field evaluation of soybean transgenic event DAS-81419-2 expressing Cry1F and Cry1Ac proteins for the control of secondary lepidopteran pests in Brazil. *Crop Protection*, 96, 109–115.

- Nagoshi, R. N., Gilligan, T. M. e Brambila, J. (2016). Combining Tpi and CO1 genetic markers to discriminate invasive *Helicoverpa armigera* from local *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the Southeastern United States. *Journal of Economic Entomology*, 109(5), 2115-2124.
- Parra, J. R. P. e Coelho, A. (2019). Applied biological control in Brazil: from laboratory assays to field application. *Journal of Insect Science*, 19(2):5; 1-6.
- Parish, J. B., Carvalho, G. A., Ramos, R. S., Queiroz, E. A., Picanço, M. C., Guedes, R. N. e Corrêa, A. S. (2017). Host range and genetic strains of leafminer flies (Diptera: Agromyzidae) in eastern Brazil reveal a new divergent clade of *Liriomyza sativae*. *Agricultural and Forest Entomology*, 19(3), 235-244.
- Perera, O. P., Allen, K. C., Jain, D., Purcell, M., Little, N. S. e Luttrell, R. G. (2015). Rapid identification of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) using ribosomal RNA internal transcribed spacer 1. *Journal of Insect Science*, 15(1), 155.
- Rabelo, M. M., Matos, J. M. L., Santos-Amaya, O. F., França, J. C., Gonçalves, J., Paula-Moraes, S. V., Guedes, R. N. C. e Pereira, E. J. G. (2020). Bt-toxin susceptibility and hormesis-like response in the invasive southern armyworm (*Spodoptera eridania*). *Crop Protection*, 105129.
- Reigada, C., Guimarães, K. F. e Parra, J. R. P. (2016). Relative fitness of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on seven host plants: a perspective for IPM in Brazil. *Journal of Insect Science*, 16(1):1–5.
- Rounick, J. S. e Winterbourn, M. J. (1986). Stable carbon isotopes and carbon flow in ecosystems. *BioScience*, 36(3):171–177.
- Silva, C. S., Cordeiro, E. M. G., de Paiva, J. B., Dourado, P. M., Carvalho, R. A., Head, G., Martinelli, S. e Correa, A. S. (2020). Population expansion and genomic adaptation to agricultural environments of the soybean looper, *Chrysodeixis includens*. *Evolutionary Applications*, 13:2071–2085.
- Suzana, C. S., Damiani, R., Fortuna, L. S., e Salvadori, J. R. (2015). Desempenho de larvas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes fontes alimentares. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 45(4): 480–485.
- Suzana, C. S., Rosa, C. F., Alves, F. D. L., e Salvadori, J. R. (2018). Consumption and use of soybean by the caterpillar *Helicoverpa armigera*. *Ciencia Rural*, 48(12): 1–6.

- Tay, W. T., Soria, M. F., Walsh, T., Thomazoni, D., Silvie, P., Gajanan T. Behere, G. T. e Downes, S. (2013). A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *PLoS ONE*, 8(11):e80134.
- Todesco, M., Pascual, M. A., Owens, G. L., Ostevik, K. L., Moyers, B. T., Hübner, S., Heredia, S. M., Hahn, M. A., Caseys, C., Bock, D. G. e Rieseberg, L. H. (2016). Hybridization and extinction. *Evolutionary Applications*, 9(7):892–908.
- Wang, C., Guo, L., Li, Y. e Wang, Z. (2012). Systematic comparison of C3 and C4 plants based on metabolic network analysis. *BMC Systems Biology*
- Zalucki, M. P., Murray, D. A. H., Gregg, P. C., Fitt, G. P., Twine, P. H. e Jones, C. (1994). Ecology of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *H. punctigera* (Wallengren) in the island of Australia: Larval sampling and host plant relationships during winter and spring. *Australian Journal of Zoology*, 42(3):329–46.
- Zhou, Y., Zhao, S., Wang, M., Yu, W., Wyckhuys, K. A. G. e Wu, K. (2019). Floral visitation can enhance fitness of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) long-distance migrants. *Journal of Economic Entomology*, 112(6): 2655–2662.

### 3. FLUXO GÊNICO E HIBRIDAÇÃO DE POPULAÇÕES DE *Helicoverpa* spp. (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

#### RESUMO

*Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma praga agrícola importante em vários países da Europa, Ásia, África, Austrália e Oceania. No ano de 2013, *H. armigera* foi reportada pela primeira vez no Brasil. Morfologicamente, *H. armigera* é semelhante à *Helicoverpa zea*, espécie nativa que ocupa todo o continente americano. Ambas as espécies são consideradas altamente polífagas e são importantes pragas em culturas como soja, algodão e milho. Linhagens de *H. armigera* e *H. zea* podem acasalar-se e produzir descendência híbrida em condições de laboratório. Assim nosso objetivo com este trabalho foi desenvolver marcadores moleculares de tipo SNPs para determinar o fluxo gênico intra e interespecífico entre populações de *Helicoverpa* spp. em diferentes locais e cultivos dentro dos sistemas agrícolas no Brasil. Para isso utilizamos uma abordagem de “Genotyping By Sequencing (GBS)” onde 172 insetos foram coletados em cinco diferentes estados no Brasil em diferentes hospedeiros. Nós calculamos os padrões de diversidade e de estrutura genética que permitiram inferir o fluxo gênico intra e interespecífico entre as populações naturais de *H. armigera* e *H. zea*. Os valores de  $F_{ST}$  variaram entre as diferentes populações. Quando comparamos as populações dentro das espécies o maior valor de  $F_{ST}$  para *H. zea* foi 0,13, já entre *H. armigera* os valores são de 0,37 refletindo uma alta diferenciação genética entre as populações de *H. armigera*. Não observamos estruturação por hospedeiros para as populações de *H. armigera*. A estrutura populacional foi analisada com um  $K=2$  e híbridos putativos foram detectados em diferentes locais e a taxa de hibridação variou dentro do território brasileiro. Nossos resultados sugerem que eventos de hibridação entre *H. armigera* e *H. zea* devem ser considerados no manejo de ambas as espécies no cenário agrícola brasileiro.

**Palavras-chave:** SNP, Genética de populações, Noctuidae, Pragas agrícolas, Genômica

#### Gene flow and hybridization of *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera Noctuidae) populations in different regions of Brazil

#### ABSTRACT

*Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) is an important agricultural pest in Europe, Asia, Africa, Australia, and Oceania. In 2013, *H. armigera* was reported for the first time in Brazil. Morphologically, *H. armigera* is similar to *Helicoverpa zea*, a native species present in the American continent. Both species are considered highly polyphagous and are important pests in crops such as soybean, cotton, and corn. *Helicoverpa armigera* and *H. zea* can mate and produce fertile hybrid

descent under laboratory conditions. Thus, our objective with this work was to develop molecular markers of type SNPs to determine the intra and interspecific gene flow between *Helicoverpa* spp. populations in different sites and crops within the production systems in Brazil. For this, we used a "Genotyping By Sequencing (GBS)" approach where 172 insects were collected in five different states in Brazil in different hosts. We calculated the genetic diversity patterns and genetic structure that allowed us to infer the intra and interspecific gene flow between the natural populations of *H. armigera* and *H. zea*.  $F_{ST}$  values varied among different populations. When compare the populations within the species, the highest  $F_{ST}$  value for *H. zea* was 0.13, while among *H. armigera*, the values are up to 0.37, reflecting a high genetic differentiation between the populations of *H. armigera*. We did not find population structure by hosts for *H. armigera*. The population structure was analyzed with a  $K=2$  and possible hybrids were detected in different locations. The hybridization rate varied within the Brazilian territory. Our results suggest that hybridization events between *H. armigera* and *H. zea* should be considered in the management of both species in the Brazilian agricultural scenario.

**Keywords:** SNP, Population Genetics, Noctuidae, Agriculture pest, Genomics

### 3.1 INTRODUÇÃO

Hibridação na natureza é um fenômeno comum, ocorre quando indivíduos de dois grupos diferentes (linhagens ou espécies) acasalam e produzem descendência viável (Gompert & Buerkle, 2016; Keller et al., 2013; Mallet, 2005). Em 1963, Mayr definiu este processo como o cruzamento de indivíduos de populações naturais divergentes geneticamente quando estas se reencontram. A hibridação pode gerar impactos negativos como a inviabilidade dos indivíduos resultantes dos cruzamentos ou pode favorecer e melhorar seu fitness e a capacidade de adaptação a novos ambientes (Burke & Arnold, 2001; Todesco et al., 2016). Ao contrário da percepção de que a hibridação é um evento raro, insetos na natureza hibridizam constantemente pois é um processo comum durante os eventos evolutivos de especiação (Nadeau et al., 2014; Wang & Dong, 2001). Na Europa estima-se que cerca de 16% para mariposas hibridizam com outras espécies geneticamente relacionadas (Descimon & Mallet, 2010).

Estudos utilizando como ferramenta marcadores moleculares têm contribuído no reconhecimento de eventos de hibridação, permitindo identificar e entender o impacto deste fenômeno em populações naturais de animais e plantas (Galaverni et al., 2017; Payseur & Rieseberg, 2016; Pinheiro et al., 2010). Exemplo disso foi a

confirmação de híbridos de *Canis aureus* e *Canis familiaris* fazendo uso de marcadores nucleares e mitocondriais (Galov et al., 2015), ou a confirmação de *Papilio nandina* como espécie híbrida utilizando como marcadores o gene COI e um gene nuclear quando comparado com o DNA de indivíduos de coleções de museus (Thompson et al., 2011).

Considerados insetos polípagos e fitófagos de grande importância agrícola, *H. armigera* e *H. zea* apresentam grande similaridade morfológica e são consideradas espécies irmãs (Pearce et al., 2017). O processo de especiação entre elas é associado à um processo alopátrico, onde uma população de *H. armigera* dispersou-se para as Américas aproximadamente 1.5 milhões de anos, diferenciando-se em um pool genético que hoje nomeamos como *H. zea* (Behere et al., 2007). No entanto, a separação geográfica entre elas terminou no ano 2013 quando *H. armigera* foi reportada pela primeira vez no Brasil e rapidamente se espalhou por toda a América do Sul (Czepak et al., 2013; Tay et al., 2013; Gonçalves et al., 2019).

*Helicoverpa armigera* é uma das pragas mais importantes na agricultura mundial e apresenta distribuição cosmopolita, com presença na Europa, Ásia, África, Austrália, Oceania e finalmente nas Américas (Kriticos et al., 2015). No Brasil, *H. armigera* é constantemente relatada se alimentando de algodão, soja, tomate, feijão, milho e crotalaria (Avila et al., 2013). O dano acontece no período larval, quando a forma jovem se alimenta das folhas e estruturas reprodutivas de mais de 181 espécies de plantas diferentes. Já na fase adulta, as fêmeas são reconhecidas pela alta capacidade reprodutiva, onde cada fêmea pode ovipositar em torno de 1000 até 1500 ovos (Eppo, 1981), capacidade de voar longas distâncias ultrapassando fronteiras geopolíticas (Nibouche et al., 1998), adaptação a várias condições climáticas e habilidade para colonizar novos ambientes devido a ampla variabilidade genética (Jones et al., 2019).

Por sua vez, *H. zea* está distribuída em todo continente americano (Hardwick, 1965). As lagartas de *H. zea* se alimentam de estruturas reprodutivas em formação das plantas hospedeiras, local de preferência de oviposição pelas mariposas. No Brasil, *H. zea* encontra-se principalmente reportada como praga na cultura do milho, (Leite et al., 2014; 2017) e nos Estados Unidos, podemos também incluir *H. zea* como praga de soja (Seymour et al., 2016). *Helicoverpa zea* também é relatada se

alimentando de outras plantas da família Poaceae e de diversos hospedeiros alternativos (EFSA Panel on Plant Health, 2020).

Fazendo uma comparação entre as duas espécies, *H. zea* tem um número menor de plantas hospedeiras e baixos níveis de resistência a inseticida e plantas geneticamente modificadas quando comparado a *H. armigera* no Brasil (Reigada et al., 2016; Leite et al., 2018). No entanto, existem relatos de ocorrência simultânea de *H. armigera* e *H. zea* no mesmo hospedeiro e ocupando temporalmente o mesmo espaço (Leite et al., 2014). A ocorrência simultânea de ambas as espécies em cultivos agrícolas trouxe questionamentos sobre eventos de hibridação entre *H. armigera* e *H. zea* no Brasil. Uma vez que hibridação entre linhagens norte americanas de *H. zea* e Chinesas e Russas de *H. armigera*, em condições de laboratório, revelaram que as espécies são capazes de acasalar e gerar uma prole híbrida fértil (Laster & Hardee, 1995; Laster & Sheng, 1995).

Assim a rápida invasão e colonização de *H. armigera* no Brasil nos brindou com uma oportunidade única de estudo e a formulação de alguns questionamentos, que serviram como objetivos neste trabalho. Assim nós utilizamos uma abordagem de genoma reduzido conhecida com Genotyping by Sequencing (GBS) para gerar um grande número de marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) e responder as seguintes questões: (i) Existe uma estrutura genética espacial intraespecífica entre as populações de *H. armigera* e de *H. zea*? (ii) Existe uma estrutura genética das populações de *H. armigera* por hospedeiro? (iii) Existe indicativo de fluxo gênico interespecífico (hibridação) entre as populações de *H. armigera* e *H. zea*?

## 3.2 MATERIAL & MÉTODOS

### 3.2.1 Coleta, extração de DNA e identificação das amostras

Em cultivos de soja, milho, algodão, sorgo, milheto e feijão foram coletadas, manualmente no ano 2015, larvas de *Helicoverpa* spp. em diferentes regiões do Brasil (Tabela 3.1). As larvas provenientes da localidade de São Desiderio – BA foram armazenadas em RNAlater para conservação do DNA e RNA. O restante das larvas foi armazenado em álcool >95%. Todas as amostras foram estocadas em freezer - 80°C para posterior extração de DNA e aplicação dos marcadores moleculares.

Nas amostras de São Desiderio – BA para realizar a extração de DNA foram dispostos em tubos individuais fragmentos de aproximadamente 5 mm do tegumento

das larvas. Posteriormente foram realizadas duas lavagens com álcool absoluto e tampão fosfato salino (PBS) com o intuito de retirar o RNA later do interior dos tecidos. No restante das amostras a extração foi realizada diretamente sem necessidade de lavagens prévias. A extração do DNA foi realizada seguindo o protocolo adaptado de (Clark et al., 2001), a qualidade e integridade do DNA foi observada em gel de agarose 1% (p/v) e quantificada no Qubit 2.0, a espécie (*H. armigera* ou *H. zea*) foi identificada de acordo com o protocolo de PCR-RFLP (Behere et al., 2008) como descritos no capítulo anterior.

**Tabela 3.1** Informações sobre as populações estudadas e o número de indivíduos analisados

<b>Espécie</b>	<b>Localidade</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Código</b>	<b>Data</b>	<b>Latitude</b>	<b>Longitude</b>	<b>N</b>
<i>H. armigera</i>	São Desidério, BA	Algodão, soja, feijão, sorgo, milho	ABASD	Maio, 2015	12°26'27" S	45°26'47" W	34
<i>H. armigera</i>	L. E. Magalhaes, BA	Algodão	ABALE	Junho, 2015	11°49'15" S	46°11'54" W	16
<i>H. armigera</i>	Campo Verde, MT	Algodão	AMTCV	Maio, 2015	15°23'41" S	55°11'02" W	08
<i>H. armigera</i>	Sapezal, MT	Algodão	AMTSA	Maio, 2015	13°32'33" S	58°48'49" W	11
<i>H. armigera</i>	Montividiu, GO	Soja	AGOMO	Janeiro, 2015	17°22'30" S	51°23'33" W	12
<i>H. armigera</i>	S.A. do Rio Verde, GO	Soja	AGOSA	Fevereiro, 2015	18°01'37" S	47°21'25" W	04
<i>H. armigera</i>	Lucas do Rio Verde, MT	Soja	AMTLR	Novembro, 2014	11°40'57" S	55°47'49" W	10
<i>H. armigera</i>	Londrina, PR	Soja	APRLO	Fevereiro, 2015	23°41'46" S	50°57'52" W	11
<i>H. armigera</i>	Viradouro, SP	Soja	ASPVI	Janeiro, 2015	20°52'38" S	48°22'35" W	13
<i>H. zea</i>	São Desidério, BA	Milho	ZBASD	Maio, 2015	12°26'27" S	45°26'47" W	6
<i>H. zea</i>	Rio Verde, GO	Milho	ZGORV	Fevereiro, 2015	17°28'03" S	51°07'43" W	15
<i>H. zea</i>	Palotina, PR	Milho	ZPRPA	Fevereiro, 2015	24°21'24" S	53°45'30" W	17
<i>H. zea</i>	Piracicaba, SP	Milho	ZSPPI	Fevereiro, 2015	22°41'50" S	47°38'34" W	15

### 3.2.2 Preparo das amostras, construção da biblioteca de GBS e sequenciamento

A construção e o sequenciamento das bibliotecas foram terceirizados e realizadas em parceria com o Dr. Andrew Michel da The Ohio State University, Wooster, OH, USA no Molecular and Cellular Imaging Center. As amostras foram processadas seguindo o protocolo de Elshire et al. (2011). Um total de 172 indivíduos foram utilizados para construir as bibliotecas, estes foram separados em dois grupos de 86 para otimizar o sequenciamento em duas canaletas. O DNA total foi normalizado numa concentração de 20 ng/μl e posteriormente foi feita a digestão com a enzima de restrição MseI. As bibliotecas de GBS foram sequenciadas com uma abordagem “Pair-end” na plataforma HiSeq 2500®.

### 3.2.3 Análises dos dados

As leituras foram processadas no programa STACKS 2.2 (Catchen et al., 2013), separadas, filtradas e trimadas em 85 pb, posteriormente o alinhamento foi realizado com uma abordagem de novo, os parâmetros de filtragem seguiram a metodologia de Anderson et al. (2016). Assim, um loci foi considerado como existente se encontrado no mínimo em 20% do total das amostras. Foi calculada a heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), heterozigosidade observada ( $H_O$ ), coeficiente de endogamia ( $F_{IS} \pm SE$ ) e diversidade de nucleotídica ( $\pi \pm SE$ ). Também foi estimado o Índice de Fixação ( $F_{ST}$ ) com o qual se determina pela variabilidade genética de uma população pelo total da variabilidade genética de todas as populações, com isso, é possível mensurar o nível de diferenciação genética entre as populações. Com os valores de  $F_{ST}$  par-a-par (todas as populações comparadas com todas as populações) foi construído o Heatmap utilizando o pacote RColorBrewer no R Studio. O dendograma representa a divergência entre as populações e as cores os valores do  $F_{ST}$ , sendo as mais escuras aquelas populações com maiores valores de  $F_{ST}$  entre as mesmas.

As análises da estrutura populacional de *Helicoverpa* spp. foram realizadas no programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000), com um valor de  $K=2$  levando em consideração o número de espécies, posteriormente os resultados foram complementados com a análises de STRUCTURE HARVESTER com  $K$  variando de 1-10 com 1.000.000 de gerações e descartadas as 150.000 primeiras corridas. Foi

utilizado o método de Evanno (2005) para determinar qual valor de K seria o mais adequado.

Os valores obtidos no STRUCTURE também foram utilizados para determinar a presença de híbridos e a existência de introgressão seguindo a metodologia de Pinheiro et al. (2010). Assim indivíduos com valores superiores a  $q \geq 0,90$  eram classificados como indivíduos puros de *H. armigera*, os  $q \leq 0,10$  como puros de *H. zea*, os valores dispersos dentro desse intervalo foram catalogados como híbridos. Assim foi construído um mapa de possíveis locais de hibridização no território brasileiro.

### 3.3 RESULTADOS

Na genotipagem por espécie utilizando o marcador mitocondrial, foram identificados 119 indivíduos com a linhagem materna pertencentes a *H. armigera* e 53 como *H. zea*. Nas amostras coletadas nas culturas de algodão, soja, milho, feijão e sorgo todos os indivíduos foram identificados como *H. armigera*, por sua vez, *H. zea* foi coletada apenas em culturas de milho nas localidades de São Desiderio – BA, Palotina – PR, Piracicaba – SP, Rio Verde – GO (Tabela 3.1.).

As leituras resultantes do sequenciamento foram depositadas no genbank: PRJNA615801, um total de 16.698 SNPs foram utilizados nas análises da heterozigosidade esperada e observada, coeficiente de endogamia ( $F_{IS} \pm SE$ ), diversidade de nucleotídeos ( $\pi \pm SE$ ) e o Índice de Fixação ( $F_{ST}$ ). A diversidade nucleotídica média foi maior em *H. zea* quando comparada a *H. armigera* (Tabela 3.2.). Em *H. armigera*  $\pi$  variou de 0,017 a 0,345 para as populações de AGOMO e APRLO, respectivamente. Para *H. zea* os valores de  $\pi$  variou de 0,171 para ZBASD e 0,309 para ZPRPA (Tabela 3.2.).

Como resultado obtivemos uma alta variação nos índices de  $H_0$  e  $H_E$  (Tabela 3.2). Em *H. armigera* o menor valor de  $H_0$  foi AMTCV e APRLO com valor igual a 0,005, o maior valor de  $H_0$  foi de ABASD com 0,188. Para  $H_E$  o menor valor foi de 0,016 para AGOMO e o maior valor foi de 0,315 para APRLO (Tabela 3.2.). Para *H. zea* o menor valor de  $H_0$  foi ZPRPA com 0,012 e o maior valor foi ZSPPI com 0,208, já pra  $H_E$  o menor foi de 0,147 para ZBASD e o maior 0,287 para ZPRPA (Tabela 3.2.).

Todas as populações de *H. armigera* apresentaram valor positivos para o coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ), o que significa uma endogamia na população, fato esperado para uma praga de recente invasão no Brasil. Já para *H. zea* duas

populações apresentaram  $F_{IS}$  positivos (ZPRPA e ZGORV) e duas populações  $F_{IS}$  negativos (ZBASD e ZSPPI) demonstrando que os eventos demográficos agem de maneira independente nas populações de *H. zea* (Tabela 3.2.).

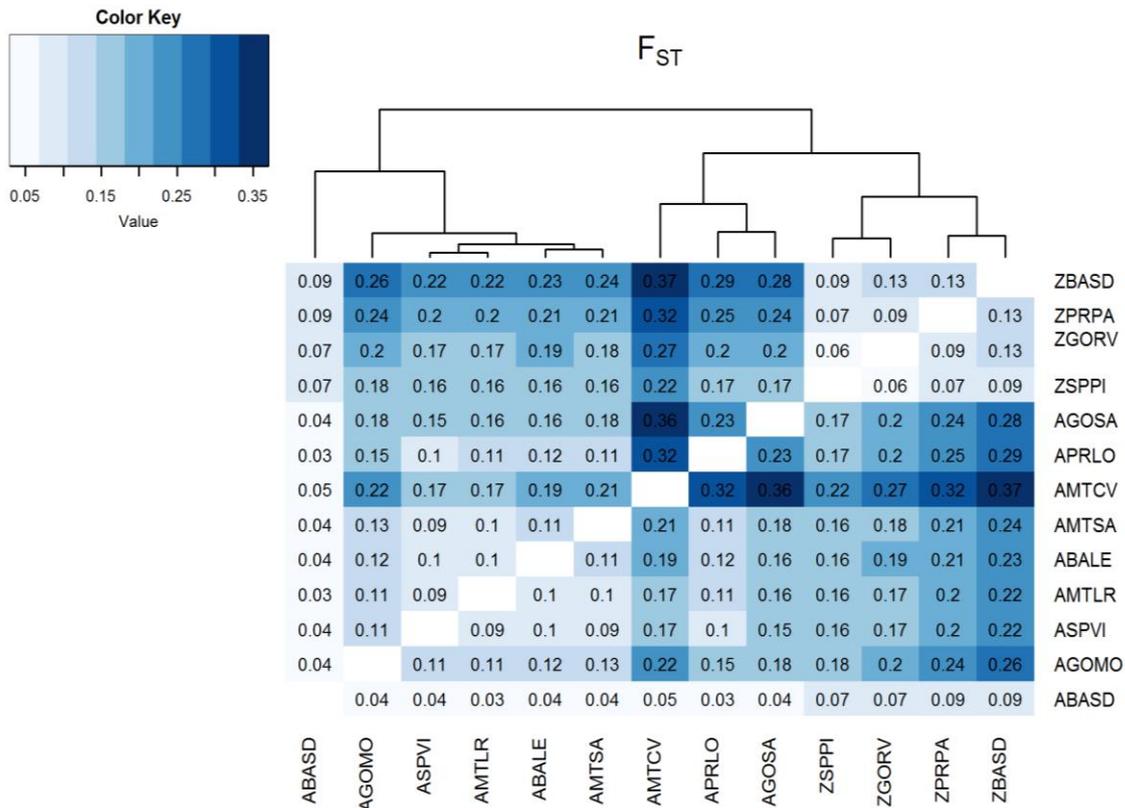
**Tabela 3.2.** Parâmetros de diversidade de *H. armigera* e *H. zea* estimados por marcadores SNPs. Diversidade de nucleotídeos ( $\pi \pm SE$ ), heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), coeficiente de endogamia ( $F_{IS} \pm SE$ ).

Local	$\pi$	$H_o$	$H_E$	$F_{IS}$
ABALE	0,089±0,001	0,004	0,085	0,442±0,008
ABASD	0,194±0,006	0,188	0,201	0,109±0,144
AMTCV	0,122±0,002	0,005	0,111	0,328±0,009
AMTSA	0,085±0,002	0,008	0,078	0,219±0,006
AMTLR	0,148±0,005	0,116	0,133	0,087±0,041
AGOMO	0,017±0,001	0,008	0,016	0,022±0,005
AGOSA	0,314±0,003	0,022	0,242	0,463±0,005
ASPVI	0,067±0,003	0,032	0,062	0,120±0,008
APRLO	0,345±0,002	0,005	0,315	0,752±0,006
ZBASD	0,171±0,009	0,199	0,147	-0,047±0,033
ZSPPI	0,175±0,008	0,208	0,165	-0,042±0,086
ZPRPA	0,309±0,003	0,012	0,287	0,691±0,015
ZGORV	0,247±0,009	0,174	0,230	0,227±0,062
<i>H. armigera</i>	0,256±0,073	0,104	0,215	0,366±0,201
<i>H. zea</i>	0,397±0,003	0,099	0,337	0,613±0,111
Híbridos	0,243±0,001	0,029	0,229	0,848±0,106

Nas análises de  $F_{ST}$  o dendograma separou as populações em dois grandes grupos, no primeiro destes encontram-se exclusivamente populações de *H. armigera*, já no segundo existe uma subdivisão em dois grupos num deles encontram-se populações de *H. zea*, enquanto no outro estão populações de *H. armigera* das localidades Campo Verde – MT, Londrina – PR, São Antônio do Rio Verde – GO (Figura 3.1).

Quando comparadas as amostras de *H. zea* com *H. armigera* os valores de  $F_{ST}$  são altos ou muito altos (>0,25), o que significa que há diferenciação genética, isto se deve ao fato de serem espécies diferentes. Quando comparadas as populações dentro de *H. armigera* e dentro de *H. zea* os valores de  $F_{ST}$  são superiores dentro do grupo das *H. armigera*. Analisando o subgrupo que ficou próximo ao clado de *H. zea* entre elas os valores também são maiores que 0,20 representando possivelmente uma alta diferenciação genética. Já entre as populações de *H. zea* os valores de  $F_{ST}$

não foram superiores a 0,13, demonstrando maior homogeneidade entre as populações (Figura 3.1). Nossos resultados não refletiram qualquer separação de populações regulada pela distribuição geográfica ou por cultivos agrícolas onde as larvas foram coletadas.



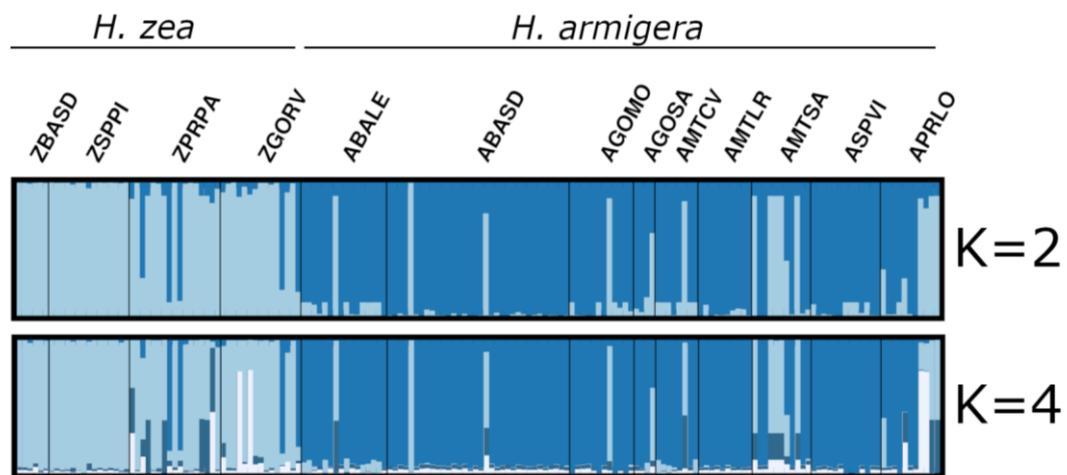
**Figura 3.1.** Heatmap com os valores de  $F_{ST}$  para populações de *Helicoverpa armigera* e *H. zea* coletadas em diferentes regiões brasileiras. Os códigos das populações são apresentados na Tabela 1.

Na análise de STRUCTURE quando  $K=2$  existe uma clara separação entre *H. armigera* e *H. zea* o que reforça o fato de serem realmente espécies diferentes, porém existe introgressão entre algumas populações de *H. armigera* e *H. zea* sugerindo a presença de híbridos putativos (Figura 3.2). No total foram detectados 26 híbridos putativos em nove diferentes localidades.

Nas populações de *H. armigera*, não foram encontrados indivíduos híbridos nas amostras procedentes de Lucas do Rio Verde no Mato Grosso e de Viradouro em São Paulo. Nas demais populações existem introgressão em diferentes níveis de frequência. As populações de *H. zea* de São Desiderio na Bahia (ZBASD) e de Piracicaba em São Paulo (ZSPPI) não tem hibridação, contudo as de Palotina no

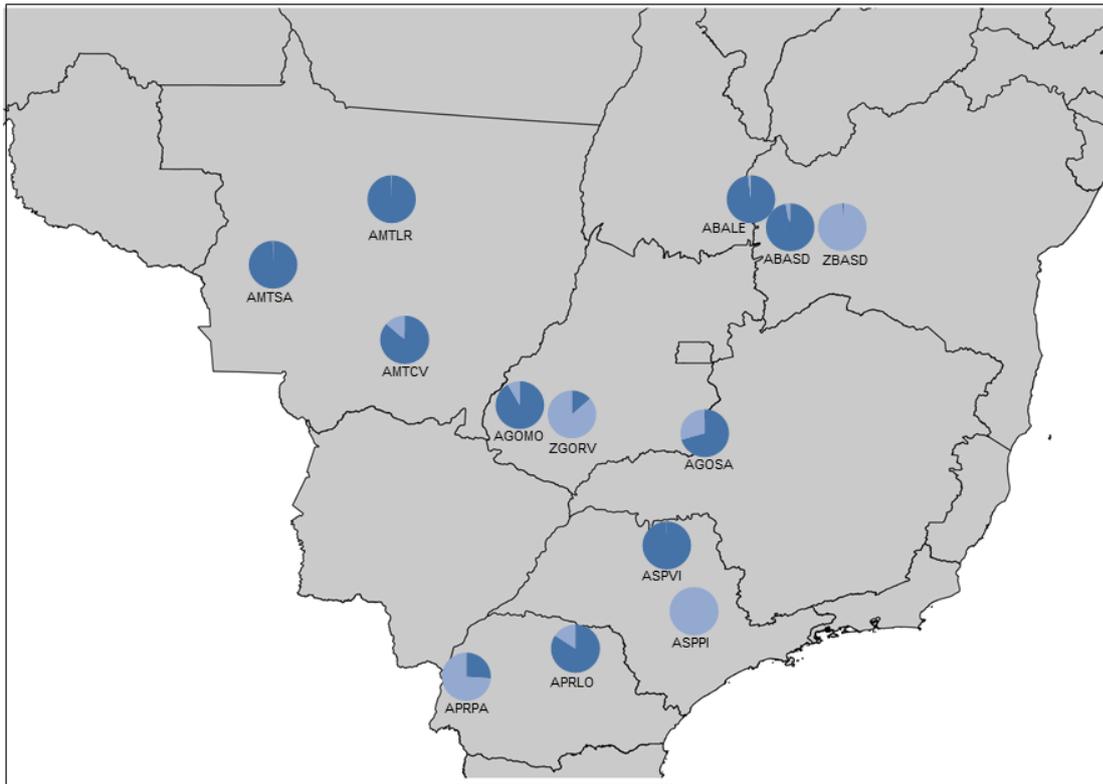
Paraná (ZPRPA) e de Rio Verde em Goiás (ZGORV) apresentaram um total de cinco indivíduos híbridos.

O melhor número de clusters foi  $K = 4$ , estimado usando o delta  $K$ , conforme sugerido por Evanno et al., 2005. Quando as análises foram realizadas com um valor de  $K=4$  as populações de Sapezal no Mato Grosso (AMTSA) e de Londrina no Paraná (APRLO) apresentam um nível alto de mistura. Em *H. zea* as populações que apresentaram possíveis híbridos quando  $K=2$  apresentaram uma maior mistura quando  $K=4$  (Figura 3.2).



**Figura 3.2.** Padrão da estrutura genética baseada em SNPs de populações de *H. armigera* e *H. zea* (Lepidoptera: Noctuidae). Cada barra representa um indivíduo e as cores representam uma população putativa ( $K = 2$  ou  $K=4$ ).

Quando analisada a distribuição geográfica das populações, existem populações de *H. armigera* e *H. zea* próximas geograficamente no estado da Bahia e no estado de São Paulo, no entanto os níveis de hibridação são baixos. Já nos estados de Mato Grosso e principalmente em Goiás e Paraná uma maior taxa de hibridização foi constatada (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Distribuição das populações de *Helicoverpa* spp. no Brasil considerando a análise de STRUCTURE com  $K = 2$ . A cor escura corresponde o cluster genético mais comum a *H. armigera* e a cor clara o cluster genético mais comum a *H. zea*.

### 3.4 DISCUSSÃO

As invasões biológicas são reconhecidas como uma grande ameaça para o meio ambiente e a economia a nível mundial, pois na colonização de novos espaços, as espécies invasoras podem afetar de maneira negativa as espécies nativas de plantas e animais (Seehausen, 2004; Prentis et al., 2008). Isso ocorre quando a espécie invasora aumenta seu número rapidamente devido à falta de competidores e controladores naturais no ambiente invadido (Alpert, 2006). Essas características se adequam ao caso de *H. armigera* na América do Sul, adicionalmente ainda é sugerido à possibilidade de que *H. armigera* pode estar em condição vantajosa pela capacidade de se acasalar com sua espécie irmã *H. zea*, nativa do continente americano, possibilitando a introgressão de genes que facilitam sua adaptação ao ecossistema agrícola presente na América do Sul (Tay et al., 2013; Valencia-Montoya et al., 2020).

*Helicoverpa armigera* rapidamente se expandiu na América do Sul com relatos de detecções na América Central e América do Norte (Arnemann et al., 2016; Gonçalves et al., 2019). Sua rápida expansão geográfica tornou *H. armigera*, a principal praga do gênero em toda a América do Sul, recebendo status de praga

primária em culturas como soja e algodão. Esses relatos confirmam a rápida adaptação de *H. armigera* as condições climáticas e agrícolas da região, onde invernos amenos e presença de cultivos agrícolas, e consequente presença de hospedeiros, durante todo o período do ano favoreceram a rápida colonização demográfica de *H. armigera*.

A primeira pergunta que motivou o desenvolvimento deste trabalho buscava conhecer se existia uma estrutura genética, no espaço ou por hospedeiro, de *H. armigera* e *H. zea* no Brasil. Considerando a identificação das espécies utilizando o marcador mitocondrial (linhagem materna) obtivemos como resposta que *H. zea* foi exclusivamente encontrada na cultura do milho, hospedeiro historicamente associado a espécies na América do Sul. Já *H. armigera* foi encontrada em uma ampla gama de hospedeiros, com exceção do milho. Esses resultados reforçam que as espécies, apesar de consideradas polípagas, possuem graus de polifágia funcional completamente diferente e prevalência distinta entre diferentes hospedeiros no campo no território brasileiro (Leite et al., 2014). Isso pode ser devido à preferência de hospedeiros, o desempenho biológico em diferentes hospedeiros, e/ou o potencial competitivo das espécies em diferentes hospedeiros (Bentivinha et al., 2016; Pinto et al., 2017).

O marcador mitocondrial permite inferências apenas sobre a linhagem materna, sendo bastante útil para estudos demográficos, mas com baixa resolução para estudos de estruturação genética e de fluxo gênico intra e interespecífico. A utilização de SNPs gerados a partir da técnica de GBS surgem como uma ótima alternativa pois abrangem diferentes regiões do genoma (Arnold et al., 2013). Assim, nós geramos um grande número de marcadores, estimamos a diversidade genética e calculamos os valores de  $F_{ST}$  (índice de fixação) para inferir a estrutura genética entre as populações de *H. armigera* e *H. zea* no Brasil. Foi observada uma consistente homogeneidade genética entre as populações de *H. zea* quando comparadas as quatro populações de diferentes regiões brasileiras. Não foi observado padrão de estruturação genética por distância (IBD – *isolation by distance*) entre as populações, propondo um alto fluxo gênico entre as populações naturais dessa praga no Brasil. Resultados similares já foram reportados por Leite et al. (2014) e (2017), no entanto existe uma grande diferenciação genética entre as linhagens de *H. zea* da América do Sul e América do Norte (Leite et al., 2017).

Para *H. armigera* maiores valores de  $F_{ST}$  entre as populações foram observados quando comparado a *H. zea*, sugerindo ampla diferenciação genética entre as populações de *H. armigera*. No entanto, não conseguimos observar uma estruturação genética nem por hospedeiro e nem por localidade dentro do território brasileiro. Os altos valores de  $F_{ST}$  entre populações de *H. armigera*, podem ser atribuídos pela rápida e recente expansão populacional de *H. armigera* que promoveu a fixação aleatória de alelos em diferentes localidades e cultivos agrícolas, principalmente, por ação da deriva genética. Outras duas hipóteses podem ser levantadas para os altos valores de  $F_{ST}$ , primeiro a presença de múltiplos eventos de invasão em diferentes regiões brasileiras e a segunda o processo de hibridização com *H. zea* (Tay et al., 2017; Anderson et al., 2018; Arnemann et al., 2019)

A análise de STRUCTURE separou as espécies em dois consistentes grupos e permitiu responder a nosso segundo questionamento e sugerir que existe fluxo gênico interespecífico (híbridos putativos) entre as duas espécies. Isso sugere que indivíduos das duas espécies se acasalam e formam uma prole híbrida. No entanto, existe um fluxo gênico assimétrico, onde a espécie nativa (*H. zea*) introgride com mais frequência nas populações da espécie invasora (*H. armigera*). Também foi constatado diferenças no grau de introgressão quando comparadas as diferentes localidades brasileiras. A distribuição dentro do Brasil nos mostrou que dentro dos estados de Goiás, Paraná e Mato Grosso podem existir áreas que sirvam como pontes de hibridização e pontos de encontro entre elas.

A hibridação favoreceu-se provavelmente pela união geográfica das duas espécies devido à presença em campo de hospedeiros aptos para as duas espécies e pela proximidade geográfica entre as culturas dentro da paisagem agrícola. As culturas de soja e algodão em grandes áreas paralelas às plantações de milho presentes durante largos períodos do ano pode favorecer a hibridação entre as espécies. No Brasil, outros cultivos agrícolas como milheto, sorgo, algodão e tomate podem também contribuir no mosaico agrícola para o encontro das duas espécies espacialmente e temporalmente facilitando a hibridação.

Relatos de acasalamento entre as duas espécies em laboratório que resultaram em uma prole híbrida fértil são descritos por Laster & Hardee (1995) e Laster & Sheng (1995). Análises sobre as possíveis barreiras pré-zigóticas resultantes de processos de diferenciação alopátrica que impeçam o cruzamento (Payseur & Rieseberg, 2016) ou que dificultem a escolha da espécie contrária como parceiro

assim como pós-zigóticas devem ser analisadas, já que em condições naturais o processo de hibridação tende a ser mais difícil de acontecer. A variação intraespecífica entre as populações de *H. armigera*, onde diferentes populações podem apresentar composição de feromônios distintas bem como tamanho e forma das estruturas reprodutivas que influenciam diretamente no sucesso de acasalamento entre as espécies também pode ser um fator chave para a hibridação entre as populações de *H. zea* e *H. armigera* (Mallet, 2018; Pogue, 2004)

Para detectar híbridos entre *H. armigera* e *H. zea* em condições naturais no Brasil já foram utilizadas diversas ferramentas moleculares como os microssatélites (Leite et al., 2017), EPIC-PCR (Gonçalves et al., 2019), SNPs (Anderson et al., 2016) e análises completas do genoma (Anderson et al., 2018). Todos os estudos detectaram híbridos putativos em diferentes taxas em condições de campo, porém esse ainda é um quesito de ampla discussão e controvérsia. O aumento no número de marcadores a nível genômico e o número de amostras avaliadas aqui produzidos é mais um estudo que relata a presença de híbridos putativos e com ampla distribuição nas diferentes áreas geográficas brasileiras.

Estudos sobre a estabilidade, permanência e aumento na quantidade dos indivíduos híbridos no campo precisam ser desenvolvidos, no entanto, acreditamos que isso é possível apenas com uma abordagem de sequenciamento completo do genoma. No entanto, ainda é difícil de separar a origem dos marcadores/loci compartilhados entre as duas espécies que inferem a hibridação, uma vez que podem ter (i) origem de eventos recentes de introgressão, confirmando a hibridação, (ii) ou origem de regiões conservadas do genoma que ainda não divergiram após o evento histórico de separação de *H. armigera* e *H. zea* entre Américas e Velho Mundo, devido à grande similaridade genética entre as espécies. Assim, a definição de quais eram os melhores parâmetros de filtragem e seleção de SNPs foram bastante difíceis de serem ajustados, pois precisávamos atender loci compatíveis às populações de duas espécies diferentes e também pelo fato de não possuímos genomas de referência de ambas as espécies com boa porcentagem de cobertura. Assim, nós tivemos um grande número de “missing data” que podem aumentar os valores de  $F_{ST}$  para as populações de ambas as espécies e também influencia no padrão de hibridação (número de híbridos putativos) aqui detectado.

*Helicoverpa armigera* e *H. zea* são pragas reconhecidas por seus hábitos migratórios e sua capacidade para voar longas distâncias (Nibouche et al., 1998; Jones et al., 2019). Além disso, ambas as espécies estão completamente difundidas no território brasileiro por ser uma paisagem com muitos cultivos. Desta forma, estudos de genômica populacional e adaptativa aplicados as populações naturais de *H. armigera* e *H. zea* devem continuar, uma vez que, a hibridação pode promover introgressões adaptativas e uma rápida mudança na dinâmica de utilização de hospedeiros e na eficiência de estratégias de controle.

## REFERÊNCIAS

- Alpert, P. (2006). The advantages and disadvantages of being introduced. *Biological Invasions*, 8(7):1523–1534.
- Anderson, C. J., Tay, W. T., McGaughan, A., Gordon, K. e Walsh, T. K. (2016). Population structure and gene flow in the global pest, *Helicoverpa armigera*. *Molecular Ecology*, 25(21):5296–5311.
- Anderson, C. J., Oakeshott, J. G., Tay, W. T., Gordon, K., Zwick, A. e Walsh, T. K. (2018). Hybridization and gene flow in the Mega-pest lineage of moth, *Helicoverpa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(19):5034–5039.
- Arnemann, J. A., James, W. J., Walsh, T. K., Guedes, J. V. C., Smagghe, G., Castiglioni, E. e Tay, W. T. (2016). Mitochondrial DNA COI characterization of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Paraguay and Uruguay. *Genetics and Molecular Research*, 15(2): 1–8.
- Arnemann, J. A., Roxburgh, S., Walsh, T., Guedes, J., Gordon, K., Smagghe, G. e Tay, W. T. (2019). Multiple incursion pathways for *Helicoverpa armigera* in Brazil show its genetic diversity spreading in a connected world. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12.
- Arnold, B., Corbett-Detig, R. B., Hartl, D. e Bomblies, K. (2013). RADseq underestimates diversity and introduces genealogical biases due to nonrandom haplotype sampling. *Molecular Ecology*, 22:3179–3190.
- Avila, C. J., Vivan, L. M. e Tomquelski G. V. (2013). Ocorrência, aspectos biológicos, danos e estratégias de Manejo de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) nos sistemas de produção agrícolas. *Circular Técnica Embrapa*, 23.

- Behere, G. T., Tay, W. T., Russell, D. A., Heckel, D. G., Appleton, B. R., Kranthi, K. R. e Batterham, P. (2007). Mitochondrial DNA analysis of field populations of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and of its relationship to *H. zea*. *BMC Evolutionary Biology*, 7(117).
- Behere, G. T., Tay, W. T., Russell, D. A. e Batterham, P. (2008). Molecular markers to discriminate among four pest species of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of Entomological Research*, 98 (6):599–603.
- Bentivenha, J. P. F., Paula-Moraes, S. V., Baldin, E. L. L., Specht, A., Da Silva, I. F., & Hunt, T. E. (2016). Battle in the new world: *Helicoverpa armigera* versus *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE*, 11(12), e0167182.
- Burke, J. M. e Arnold, M. L. (2001). Genetics and the fitness of Hybrids. *Annual Review of Genetics*, 35:31–52.
- Catchen, J., Bassham, S., Wilson, T., Currey, M., O'Brien, C., Yeates, Q. e Cresko, W. A. (2013). The population structure and recent colonization history of Oregon threespine stickleback determined using RAD-seq. *Molecular Ecology* 22(11):2864–2883.
- Clark, T. L., Meinke, L. J. e Foster, J. E. (2001). Molecular phylogeny of *Diabrotica* beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) inferred from analysis of combined mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Insect Molecular Biology*, 10(4):303–314.
- Czepak, C., Albernaz, K. C., Vivian, L. M., Guimarães, H. O. e Carvalhais, T. (2013). First reported occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 43(1):110–113.
- Descimon, H e Mallet. M. (2010). Bad Species. *Ecology of Butterflies in Europe*, 219–249.
- EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), Bragard, C., Dehnen-Schmutz, K., Di Serio, F., Gonthier, P., Jacques, M., Jaques Miret, J. A., Justesen, A. F., Magnusson, C. S., Milonas, P., Navas-Cortes, J. A., Pamell, S., Potting, R., Reignault, P. L., Thulke, H. H., Van der Werf, W., Civera, A. V., Yuen, J., Zappalà, L., Czwieneczek, E., Streissl F. e MacLeod, A. (2020). Pest categorisation of *Helicoverpa zea*. *EFSA Journal*, 18(7), 6177–6208.

- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S. e Mitchell, S.E. (2011). A robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, 6(5):e19379.
- European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO (1981). Data sheets on quarantine organisms n° 110: *Helicoverpa armigera*. 11.
- Evanno, G., Regnaut, S. e Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611–2620.
- Galaverni, M., Caniglia, R., Pagani, L., Fabbri, E., Boattini, A. e Randi, E. (2017). Disentangling timing of admixture, patterns of introgression, and phenotypic indicators in a hybridizing wolf population. *Molecular Biology and Evolution*, 34(9): 2324–2339.
- Galov, A., Fabbri, E., Caniglia, R., Arbanasić, H., Lapalombella, S., Florijančić, T. Bošković, I., Galaverni, M. e Randi, E. (2015). First evidence of hybridization between golden jackal (*Canis aureus*) and domestic dog (*Canis familiaris*) as revealed by genetic markers. *Royal Society Open Science*, 2(12).
- Gompert, Z. e Buerkle, C. A. (2016). What, if anything, are hybrids: enduring truths and challenges associated with population structure and gene flow. *Evolutionary Applications*, 9(7): 909–923.
- Gonçalves, R. M., Mastrangelo, T., Rodrigues, J. C. V., Paulo, D. F., Omoto, C., Corrêa, A. S. e 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(13), 7378–7401.
- Hardwick, D. F. (1965). The corn earworm complex. *Memories of the Entomological Society of Canada*, 97:245–247.
- Jones, C. M., Parry, H., Tay, W. T., Reynolds, D. R. e Chapman, J. W. (2019). Movement ecology of pest *Helicoverpa*: Implications for ongoing spread. *Annual Review of Entomology*, 64, 277–295.
- Keller, I., Wagner, C. E., Greuter, L., Mwaiko, S., Selz, O. M., Sivasundar, A., Wittwer, S. e Seehausen, O. (2013). Population genomic signatures of divergent adaptation, gene flow and hybrid speciation in the rapid radiation of Lake Victoria cichlid fishes. *Molecular Ecology*, 22(11): 2848–2863.

- Kriticos, D. J., Ota, N., Hutchison, W. D., Beddow, J., Walsh, T., Tay, W. T., Borchert, D. M., Paula-Moraes, S. V., Czapak, C. e Zalucki, M. P. (2015). The potential distribution of invading *Helicoverpa armigera* in North America: Is it just a matter of time?. *PLoS ONE*, 10(3):e0119618.
- Laster, M. L. e Hardee, D. D. (1995). Intermating compatibility between North American *Helicoverpa zea* and *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Russia. *Journal of Economic Entomology*, 88(1):77–80.
- Laster, M. L. e Sheng, C. F. (1995). Search for hybrid sterility for *Helicoverpa zea* in crosses between the North American *H. zea* and *H. armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from China. *Journal of Economic Entomology*, 88(5):1288–1291.
- Leite, N. A., Alves-Pereira, A., Corrêa, A. S., Zucchi, M. I. e 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., Corrêa, A. S., Michel, A. P., Alves-Pereira, A. Pavinato, V. A. C., Zucchi, M. I. e Omoto C. (2017). Pan-American similarities in genetic structures of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) with implications for hybridization. *Environmental Entomology*, 46(4):1024–34.
- Leite, N. A., Pereira, R. M., Durigan, M. R., Amado, D., Faretto, J., Medeiros, F. C. L. e Omoto, C. (2018). Susceptibility of brazilian populations of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to Vip3Aa20. *Journal of Economic Entomology*, 111(1), 399–404.
- Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*, 20(5):229–237.
- Mallet, J. (2018). Invasive insect hybridizes with local pests. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(19): 4819–4821.
- Mayr, E. (1963) Animal Species and Evolution. *Harvard University Press*, 1-30.
- Nadeau, N. J., Ruiz, M., Salazar, P., Counterman, B., Medina, J. A., Ortiz-Zuazaga, H. Morrison, A., McMillan, W. O., Jiggins, C. D. e Papa, R. (2014). Population genomics of parallel hybrid zones in the mimetic butterflies, *H. melpomene* and *H. erato*. *Genome Research*, 1316–1333.

- Nibouche, S., Buès, R., Toubon, J., e Poitout, S. (1998). Allozyme polymorphism in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera : Noctuidae): Comparison of African and European populations. *Heredity*, 80:438–445.
- Payseur, B. A. e Rieseberg, L. H. (2016). A genomic perspective on hybridization and speciation. *Molecular Ecology*, 25(11):2337–2360.
- Pearce, S. L., Clarke, D. F., East, P. D., Elfekih, S., Gordon, K. H. J., Jermin, L. S., McGaughran, A., Oakeshott, J. G., Papanikolaou, A., Perera, O. P., Rane, R. V., Richards, S., Tay, W. T., Walsh, T. K., Anderson, A., Anderson, C. J., Asgari, S., Board, P. G., Bretschneider, A., Campbell, P. M., Chertemps, T., Christeller, J. T., Coppin, C. W., Downes, S. J., Duan, G., Farnsworth, C. A., Good, R. T., Han, L. B., Han, Y.C., Hatje, K., Horne, I., Huang, Y. P., Hughes, D. S. T., Jacquín-Joly, E., James, W., Jhangiani, S., Kollmar, M., Kuwar, S. S., Li, S., Liu, N. Y., Maibeche, M. T., Miller, J. R., Montagne, N., Perry, T., Qu, J., Song, S. V., Sutton, G. G., Vogel, H., Walenz, B. P., Xu, W., Zhang, H. J., Zou, Z., Batterham, P., Edwards, O. R., Feyereisen, R., Gibbs, R. A., Heckel, D. G., McGrath, A., Robin, C., Scherer, S. E., Worley, K. C. e Wu, Y. D. (2017). Genomic innovations, transcriptional plasticity and gene loss underlying the evolution and divergence of two highly polyphagous and invasive *Helicoverpa* pest species. *BMC Biology*, 15(69):15–63.
- Pinheiro, F., Barros, F., Palmas-Silva, C., Meyer, D., Fay, M. F., Suzuki, R. M., Lexer, C. e Cozzolino, S. (2010). Hybridization and introgression across different ploidy levels in the neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology*, 19(18):3981–3994.
- Pinto, F. A., Mattos, M. V. V., Silva, F. W. S., Rocha, S. L. e Elliot, S. L. (2017). The spread of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and coexistence with *Helicoverpa zea* in southeastern Brazil. *Insects*, 8(87), 1–5.
- Pogue, M. G. (2004). A new synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiation of adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliethinae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97(6): 1222–1226.
- Prentis, P. J., Wilson, J. R. U., Dormontt, E. E., Richardson, D. M. e Lowe, A. J. (2008). Adaptive evolution in invasive species. *Trends in Plant Science*, 13(6):288–294.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. e Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2):945–959.

- Reigada, C., Guimarães, K. F. e Parra, J. R. P. (2016). Relative fitness of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on seven host plants: A perspective for IPM in Brazil. *Journal of Insect Science*, 16(1), 1–5.
- Seehausen, O. (2004). Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology and Evolution*, 19(4), 198–207.
- Seymour, M., Perera, O. P., Fescemyer, H. W., Jackson, R. E., Fleischer, S. J. e Abel, C. A. (2016). Peripheral genetic structure of *Helicoverpa zea* indicates asymmetrical panmixia. *Ecology and Evolution*, 6(10), 3198–3207.
- Tay, W. T., Soria, M. F., Walsh, T., Thomazoni, D., Silvie, P., Gajanan T. Behere, G. T. e Downes, S. (2013). A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *PLoS ONE*, 8(11):e80134.
- Tay, W. T., Walsh, T. K., Downes, S., Anderson, C., Jermiin, L. S., Wong, T. K. F., Piper, M. C., Chang, E. S., Macedo, I. B., Czepak, C., Behere, G. T., Silvie, P., Soria, M. F., Frayssinet, M. e Gordon, K. H. J. (2017). Mitochondrial DNA and trade data support multiple origins of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae) in Brazil. *Scientific Reports*, 7, 1–10.
- Thompson, M. J., Vane-Wright, R. I. e Timmermans, M. (2011). Hybrid origins: DNA techniques confirm that *Papilio nandina* is a species hybrid (Papilionidae). *Journal of the Lepidopterists' Society*, 65(3):199–201.
- Todesco, M., Pascual, M. A., Owens, G. L., Ostevik, K. L., Moyers, B. T., Hübner, S., Heredia, S. M., Hahn, M. A., Caseys, C., Bock, D. G. e Rieseberg, L. H. (2016). Hybridization and extinction. *Evolutionary Applications*, 9(7):892–908.
- Valencia-Montoya, W. A., Elfekih, S., North, H. L., Meier, J. I., Warren, I. A., Tay, W. T., Gordon, K. H. J., Specht, A., Paula-Moraes, S. V., Rane, R., Walsh, T. K. e Jiggins, C. D. (2020). Adaptive introgression across semipermeable species boundaries between local *Helicoverpa zea* and invasive *Helicoverpa armigera* moths. *Molecular Biology and Evolution*, 37(9): 2568–2583.
- Wang, C. e Dong, J. (2001). Interspecific hybridization of *Helicoverpa armigera* and *H. assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Chinese Science Bulletin*, 46(6): 489–491



#### 4 BIOLOGIA DE LINHAGENS BRASILEIRAS DE *Helicoverpa armigera*, *H. zea* E HÍBRIDA (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) SOBRE OS HOSPEDEIROS SOJA E ALGODÃO

##### RESUMO

Consideradas como dois dos insetos-praga mais importantes do mundo, *Helicoverpa armigera* e *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) permaneceram isoladas até o ano 2013, quando *H. armigera* foi reportada pela primeira vez no continente americano atacando culturas de soja e algodão no Brasil. Os relatos prévios de hibridação em laboratório e a grande similaridade morfológica e genética entre as espécies levaram a considerar a possibilidade de hibridação entre as linhagens brasileiras de *H. armigera* e *H. zea*. Com o intuito de confirmar a presença de uma prole híbrida e comparar o comportamento alimentar dos híbridos, nós realizamos, em condições de laboratório, cruzamentos coespecíficos e interespecíficos entre *H. armigera* e *H. zea* e avaliamos diferentes parâmetros biológicos das larvas sobre folhas de algodão e soja. O número total de ovos foi maior para os cruzamentos coespecíficos de *H. armigera*. Na avaliação da viabilidade de ovos não existiu diferença significativa quando comparamos os dois cruzamentos coespecíficos e o cruzamento ♀ *H. armigera* e ♂ *H. zea*. O cruzamento da ♀ *H. zea* e o ♂ *H. armigera* não gerou descendência. Ao comparar o peso dos indivíduos com 7 e com 14 dias os maiores valores são obtidos quando estes se alimentam do hospedeiro soja. Larvas de *H. zea* conseguiram avançar entre os instar larvais nos hospedeiros soja e algodão, porém não conseguiram formar pupas. Nós confirmamos a presença de uma prole híbrida assimétrica entre as linhagens brasileiras de *H. armigera* e *H. zea* em condições de laboratório. Além disso, essa prole híbrida apresenta características de polifagia similares ao seu progenitor *H. armigera*. Assim, podemos concluir que indivíduos híbridos podem ocorrer em condições de campo e que devem ser levados em consideração nos programas de manejo dessas pragas, uma vez que eles podem ser pontes para rápida introgressão de características adaptativas em ambas as linhagens de *Helicoverpa*.

**Palavras-chave:** Adaptação a hospedeiros, Cruzamentos interespecíficos, Sobrevivência, Viabilidade de ovos.

##### Evaluation of biological parameters of hybrid individual from the mating of *Helicoverpa armigera* e *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae)

##### ABSTRACT

Considered as two of the most important pest insects in the world, *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) remained isolated until 2013, when *H. armigera* was first reported on the American continent attacking soybean and cotton crops in Brazil. The previous reports of hybridization in the laboratory and the high morphological and genetic similarity between the species led to the

possibility of hybridization between the Brazilian strains of *H. armigera* and *H. zea*. To confirm the presence of a hybrid offspring and compare the hybrids' feeding behavior, we performed, under laboratory conditions, co-specific and interspecific crosses between *H. armigera* and *H. zea* and evaluated different biological parameters of the larvae on cotton and soybean leaves. The total number of eggs was higher for the co-specific crosses of *H. armigera*. In the evaluation of egg viability, there was no significant difference when comparing the two co-specific crosses and the crossing ♀ *H. armigera* and ♂ *H. zea*. The crossing of ♀ *H. zea* and ♂ *H. armigera* did not generate offspring. When comparing the weight of individuals aged 7 and 14 days, the highest values are obtained when they feed on the soybean host. *H. zea* larvae developed between the larval instars on soybean and cotton hosts but failed to form pupae. We confirmed the presence of an asymmetric hybrid offspring between the Brazilian strains of *H. armigera* and *H. zea* under laboratory conditions. In addition, the hybrid offspring has characteristics of polyphagia similar to its strain parent *H. armigera*. Thus, we can conclude that hybrid individuals can occur in field conditions and must be taken into account in these pests management programs since they can be bridges for rapid introgression of adaptive characteristics in both *Helicoverpa* strains.

**Keywords:** Adaptation to hosts, Interspecific crosses, Survival, Egg viability.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

Insetos fitófagos são aqueles que se alimentam exclusivamente de plantas, dependendo da espécie e do estágio no qual se encontram estes podem se alimentar de diferentes estruturas dentro da planta. De acordo com a diversidade de espécies de plantas que os insetos podem se alimentar, eles podem ser classificados como polívoros, quando se alimentam de mais de uma família de plantas, oligófagos, quando se alimentam de espécies de plantas de uma única família, ou monófagos quando se alimentam de só uma espécie de planta (Ali & Agrawal, 2012).

A eleição da planta hospedeira muitas vezes encontra-se ligada a escolha da fêmea, que na busca por hospedeiros para ovipositar determina qual será o local de alimentação da fase jovem (Gripenberg et al., 2010). Porém quando os insetos são polívoros e com capacidade de locomoção na fase jovem, a prole pode migrar para outro hospedeiro na falta de recurso em quantidade e qualidade para completar o seu desenvolvimento. A qualidade dos nutrientes que a planta hospedeira pode oferecer e, principalmente, os compostos secundários de defesa da planta contra herbivoria são os fatores determinantes na capacidade de um inseto utilizar a planta como

hospedeiro para completar o seu desenvolvimento e gerar os seus descendentes (Zangerl & Berenbaum, 1993; Bass et al., 2013).

*Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae) é um gênero de insetos com distribuição cosmopolita e que incorpora espécies consideradas polífagas (Fitt, 1989; Jones et al., 2019). Entre as espécies de *Helicoverpa*, podemos destacar *H. armigera*, uma praga cosmopolita, que se alimenta de 68 diferentes famílias de plantas (Subramanian & Mohankumar, 2006; Cunningham & Zalucki, 2014). Outras espécies do gênero apesar de polífagas, não possuem uma amplitude de hospedeiro tão ampla quanto *H. armigera*, por exemplo, *H. zea*, uma espécie nativa do continente Americano (Suits et al., 2017).

Entre as espécies do gênero *Helicoverpa* e outras Heliothines é comum os relatos de hibridação em condições de laboratório (Laster & Hardee, 1995; Laster & Sheng, 1995). No entanto, poucos estudos eram realizados para entender as consequências da hibridação para evolução das espécies. Esse tema se tornou bastante recorrente após a invasão de *H. armigera* no Brasil e em outras regiões da América do Sul e da América Central (Tay et al., 2013; 2017; Arnemann et al., 2016; Gonçalves et al., 2019). Híbridos putativos entre *H. armigera* e *H. zea* já foram relatados em condições de campo utilizando diferentes marcadores moleculares (Anderson et al., 2016; 2018; Leite et al., 2017; Gonçalves et al., 2019), no entanto, pouco se sabe sobre a biologia, viabilidade e comportamento alimentar da prole híbrida em diferentes hospedeiros.

A formação de uma prole híbrida tem sido reportada como um fenômeno benéfico em algumas plantas e em insetos, no qual a prole híbrida apresenta as características dos seus progenitores de maneira potencializada, vigor híbrido (Burke & Arnold, 2001). Assim, se realmente essas características conferem-lhes uma vantagem no desenvolvimento e na capacidade reprodutiva, estas podem ser facilmente incorporadas nas populações naturais formando uma zona de hibridação e a possibilidade de fusão das duas espécies. Porém se a prole híbrida apresenta um menor vigor, onde estes híbridos não gerariam descendentes ou produziram os descendentes com uma viabilidade baixa, teríamos uma continuidade do isolamento entre as espécies (Naisbit et al., 2001; Abbott et al., 2013; Corrêa et al., 2019).

*Helicoverpa armigera* e *H. zea* são consideradas pragas importantes da agricultura brasileira, onde as duas espécies compartilham as mesmas regiões

geográficas e hospedeiros (Leite et al., 2014; Bentivenha et al., 2016; Pinto et al., 2017). No entanto, reconhecidamente, a amplitude de hospedeiros utilizados pelas duas espécies é bem diferente, onde *H. armigera* é considerada praga em várias culturas agrícolas, enquanto, *H. zea* é mais restrita aos cultivos de milho (Jackson et al., 2008; Leite et al., 2014). Desta forma, é crucial entender o desempenho da prole híbrida sobre hospedeiros agrícolas, uma vez que esses indivíduos podem servir como uma ponte para trocas de alelos ou até mesmo genes entre as espécies. Considerando que possíveis introgressões adaptativas podem influenciar na polifagia das espécies, nós fizemos duas principais perguntas: As linhagens brasileiras de *H. armigera* e *H. zea* geram uma prole híbrida em condições de laboratório? Qual é a viabilidade e os parâmetros de desenvolvimento das larvas híbridas nos hospedeiros algodão e soja?

## **4.2 MATERIAL & MÉTODOS**

### **4.2.1 Insetos**

Aproximadamente 500 larvas de *H. zea* foram coletadas manualmente em campos de milho localizados em Piracicaba - SP no ano 2019. Os indivíduos de *H. armigera* utilizados pertencem a uma população coletada na cidade de Luís Eduardo Magalhães, localizado no estado da Bahia, no ano 2013, considerada como uma das populações iniciais de *H. armigera* no Brasil. As duas espécies foram mantidas na fase larval sobre dieta artificial (Greene et al., 1976) em recipientes plásticos (3cm x 2cm x 2cm), de maneira individualizada até chegar à fase de pupa. As pupas eram colocadas em gaiolas cilíndricas de PVC (40 cm de diâmetro x 40 cm de altura) revestidas internamente com papel e fechadas na parte superior com tecido tipo tule para emergência dos adultos ali eram mantidos até a morte. Os ovos provenientes dos cruzamentos eram retirados a cada 3 dias e mantidos em recipientes plásticos contendo um papel filtro umedecido com água destilada na base até emergência das neonatas que eram posteriormente alimentadas em dieta artificial como descrito acima. As condições de laboratório foram temperatura  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , umidade relativa  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo 14L/10E. Essas condições foram respeitadas para todos os bioensaios realizados.

#### 4.2.2 Cruzamentos coespecíficos e interespecíficos de *H. armigera* e *H. zea*

Para montagem dos bioensaios de acasalamento entre indivíduos coespecíficos e interespecíficos, pupas de ambas as espécies foram individualizadas e separadas por sexo seguindo metodologia de Butt & Cantu (1962). Após a emergência dos adultos, estes ainda com idade menor que 24 horas foram utilizados para montagem dos casais em quatro tratamentos: (a) ♀ *H. armigera* \* ♂ *H. armigera*; (b) ♀ *H. armigera* \* ♂ *H. zea*; (c) ♀ *H. zea* \* ♂ *H. armigera*; e (d) ♀ *H. zea* \* ♂ *H. zea*. Foram montadas 4 gaiolas para cada cruzamento coespecífico (a) e (d) e 8 gaiolas para cada cruzamento interespecífico (b) e (c). O número de insetos utilizado em cada tratamento foi variável, pois dependia da emergência dos adultos, no entanto foi dada prioridade aos acasalamentos interespecíficos com intuito de gerar a prole híbrida. Os adultos foram acondicionados em gaiolas cilíndricas de PVC (40 cm de diâmetro x 40 cm de altura) revestidas internamente com papel e fechadas na parte superior com tecido tipo tule. O alimento oferecido consistiu numa solução aquosa de mel 10:1. Os tules com ovos eram retirados a cada 2 dias e mantidos em recipientes plásticos contendo um papel filtro umedecido com água destilada na base.

Os parâmetros avaliados consistiram em: (1) Número de ovos: foi contabilizando o total de ovos em cada um dos tules retirados com as posturas durante o tempo de vida de todos os indivíduos adultos da gaiola. Os valores foram somados e calculada a média dividindo o total de ovos entre o número de fêmeas presentes na gaiola; (2) Viabilidade dos ovos: para isso foram utilizados 300 ovos de cada uma das gaiolas distribuídos em três grupos de 100 ovos provenientes das três primeiras posturas de cada gaiola. Após a eclosão dos ovos, era contabilizado o número de neonatas. Posteriormente, foi calculada a média geral entre as replicatas (de 100 ovos) para cada uma das gaiolas, que nas análises foi considerada uma repetição dentro do tratamento. Nas análises estatísticas foram comparados os quatro tratamentos utilizando uma ANOVA e um teste de Tukey para múltiplas comparações entre grupos ( $P=0.05$ ), no programa RStudio.

### 4.2.3 Bioensaio de desenvolvimento larval em diferentes hospedeiros

Foi avaliado o desenvolvimento das larvas provenientes das linhagens coespecíficas e híbrida (♀ *H. armigera* \* ♂ *H. zea*) de *Helicoverpa* em dois hospedeiros, soja e algodão. Assim o delineamento foi constituído de 6 tratamentos: (a) *H. armigera* \* algodão (AIA), b) *H. armigera* \* soja (SoA), c) *H. zea* \* algodão (AIZ), d) *H. zea* \* soja (SoZ), e) Híbrido \* algodão (AIH), f) Híbrido \* soja (SoH). Foram inoculadas pelo menos 100 neonatas individualizadas, em recipientes plásticos (2cm x 2cm x 2cm) contendo como alimento folhas de algodão ou de soja, por tratamento. Eram ofertadas folhas frescas e novas, as mesmas eram trocadas todos os dias e no fundo do recipiente uma solução de ágar 2% (p/v) para manter a umidade. As variedades de soja e algodão foram plantadas na horta do departamento de Entomologia e Acarologia - ESALQ/USP. A capina foi realizada mecanicamente e nenhuma estratégia de controle de pragas ou doenças foram adotadas.

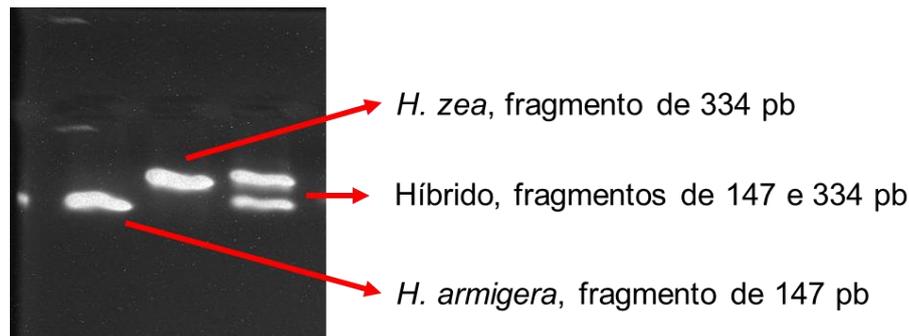
Os parâmetros biológicos avaliados foram (1) massa corpórea quando os insetos alcançavam os 7 e 14 dias após a emergência, onde aleatoriamente um total de 25 insetos por cada tratamento foram pesados; (2) Sobrevivência diária durante todo o estágio de desenvolvimento; (3) Porcentagem de sobrevivência ao dia 7 e ao dia 14; (4) Tempo de desenvolvimento larval, de pupa e de adulto e (5) Peso de pupa com 24 horas de idade.

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa RStudio, utilizando os pacotes Survival e Agricolae. Para as análises de peso de larvas e pupas e de tempo de duração de cada fase foi realizada uma ANOVA e uma comparação de médias entre tratamentos utilizando o teste de Tukey (P=0,05). Para avaliar a sobrevivência foi realizada uma curva de estimativa de Kaplan-Meier a qual determina a proporção de insetos que sobrevivem diariamente em cada um dos tratamentos.

### 4.2.4 Identificação molecular dos insetos

Os indivíduos, pais e filhos, foram genotipados seguindo a metodologia de Behere et al., 2008 (descrita no capítulo 1) e Perera et al., 2015 descrita a seguir. O DNA total foi extraído seguido o protocolo de CTAB (descrito no capítulo 1). O princípio deste marcador nuclear baseasse na amplificação de um fragmento utilizando primers específicos na região ribossomal “*Internal transcribed Spacer 1*” (ITS1) que difere no tamanho entre *H. armigera* e *H. zea*. A reação de PCR contém 1 µL de DNA (50ng/

$\mu\text{L}$ ), 4,85  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, 1  $\mu\text{L}$  de tampão (10X) (Thermo), 0,5  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 0,25  $\mu\text{l}$  de dNTP (2,5mM), 0,75  $\mu\text{l}$  de cada primer (5 pmols) e 0,15  $\mu\text{L}$  de Taq (5U/  $\mu\text{L}$ ) (Thermo). Os primers utilizados são ITS-F (5' GAG GAA GTA AAA GTC GTA ACA AGG TTT CC 3'), ITS-RHa (5' CGT TCG ACT CTG TGT CCT CTA GTG G 3') e ITS-RHz (5' TTG ATT GTT AAC GAA CGC GCC G 3'). O programa no termociclador consistiu em um passo inicial de desnaturação a 95°C durante 4 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C durante 0.5 minutos, 58°C por 0,5 minutos, e 72°C durante 1,5 minutos, terminando com um passo de extensão final a 72°C durante 10 minutos. Os fragmentos amplificados foram observados em gel de agarose 2.0%(p/v), *H. armigera* apresenta um fragmento de 147 pb, *H. zea* um fragmento de 334 pb e os indivíduos híbridos F1 apresentam à amplificação simultânea dos dois fragmentos (Figura 4.1).

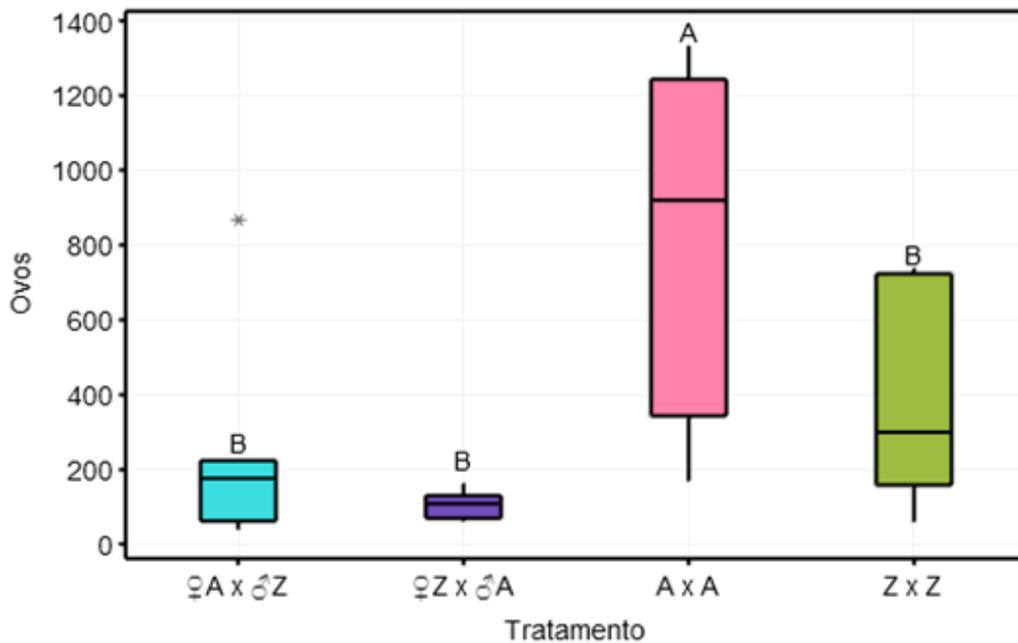


**Figura 4.1.** Gel de agarose demonstrando a amplificação específica do marcador ITS1 para *H. armigera*, *H. zea* e o híbrido.

### 4.3 RESULTADOS

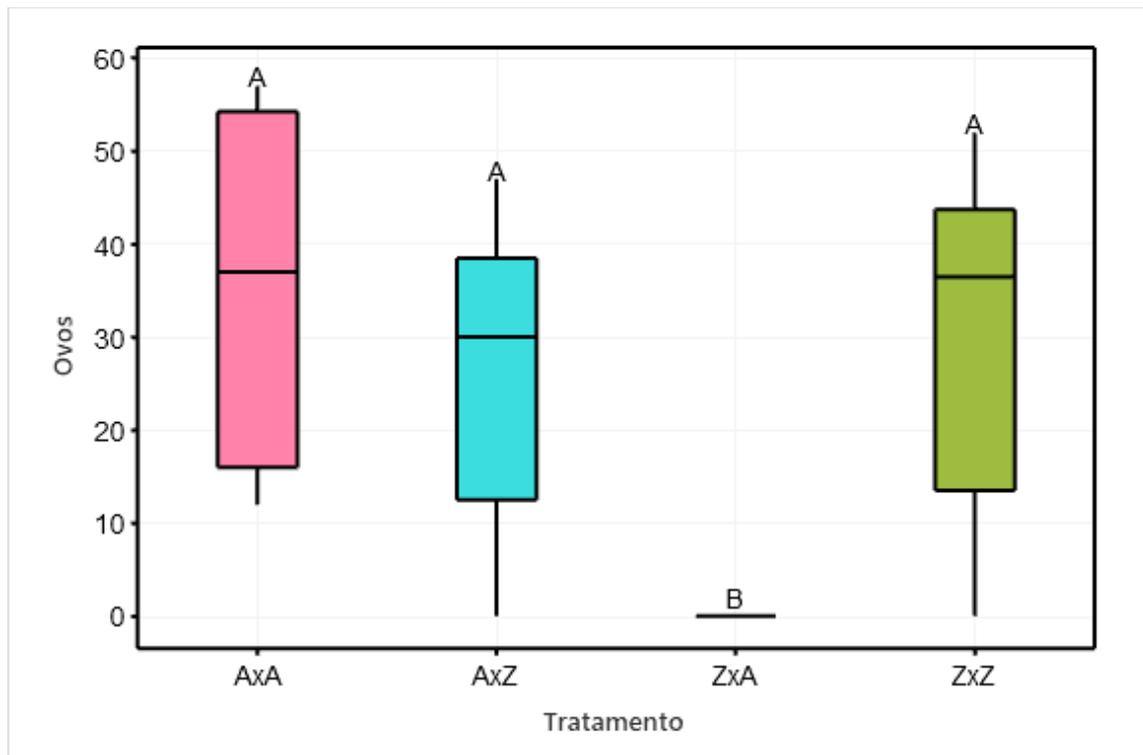
#### 4.3.1 Cruzamentos coespecíficos e interespecíficos de *H. armigera* e *H. zea*

O número total de ovos por tratamento foi significativamente superior para o cruzamento coespecífico de *H. armigera* = 837 ( $\pm 243$ ) ovos/fêmea, seguido pelo também cruzamento coespecífico de *H. zea* = 369,3 ( $\pm 99,7$ ), no entanto sem diferença significativa quando comparado com os cruzamentos interespecíficos, ♀ *H. armigera* \* ♂ *H. zea* = 231 ( $\pm 95,17$ ) e ♀ *H. zea* \* ♂ *H. armigera* = 105,9 ( $\pm 12,19$ ) ( $F_{(3; 23)} = 7,06$ ;  $P < 0,002$ ) (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Box plot representando o número de ovos resultantes de cruzamentos coespecíficos e interespecíficos de *H. armigera* e *H. zea*. Tratamentos com letras semelhantes não apresentaram diferenças estatísticas significativas no teste de Tukey ( $P=0,05$ ).

A viabilidade de ovos diferiu entre tratamentos ( $F_{(3; 23)} = 6,26$ ;  $P < 0,003$ ) uma vez que no tratamento ♀ *H. zea* \* ♂ *H. armigera* não houve eclosão dos ovos. Para os demais cruzamentos a viabilidade de ovos foi similar, nos cruzamentos coespecíficos *H. armigera*  $35,75 (\pm 9,92)$  e *H. zea*  $30,67 (\pm 7,60)$  e no cruzamento ♀ *H. armigera* \* ♂ *H. zea*  $26,56 (\pm 5,51)$  (Figura 4.3).

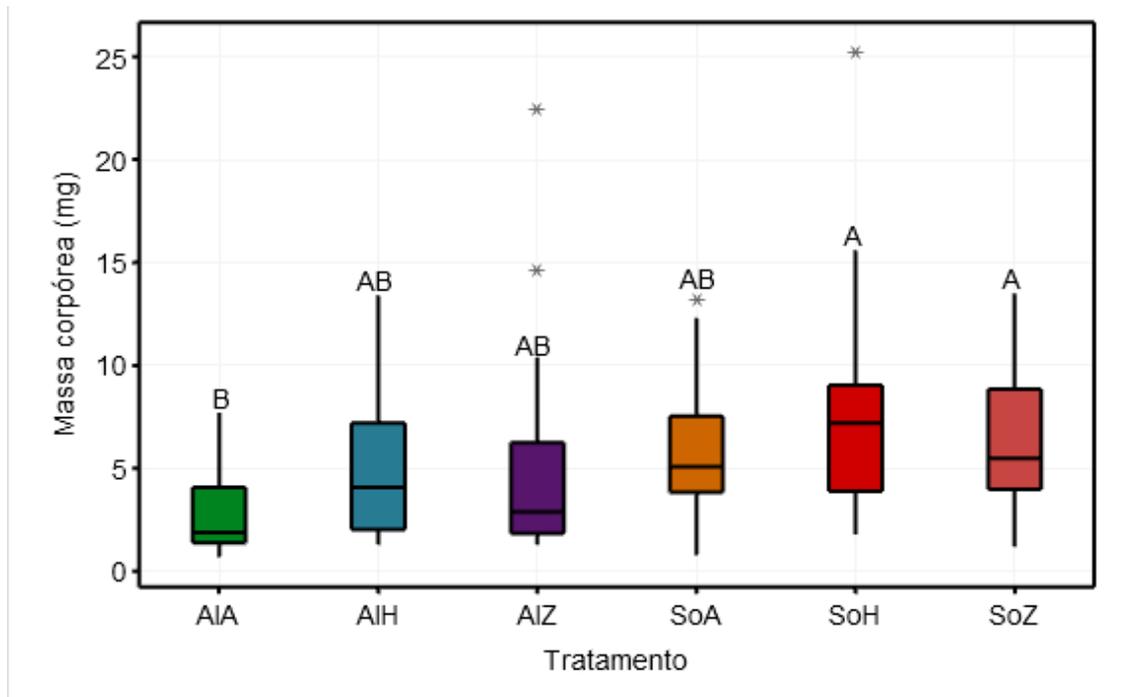


**Figura 4.3.** Box plot representando a viabilidade dos ovos resultantes de cruzamentos coespecíficos e interespecíficos de *H. armigera* e *H. zea*. Tratamentos com letras semelhantes não apresentaram diferenças estatísticas significativas no teste de Tukey ( $P=0,05$ ).

### 4.3.2 Bioensaio de desenvolvimento larval em diferentes hospedeiros

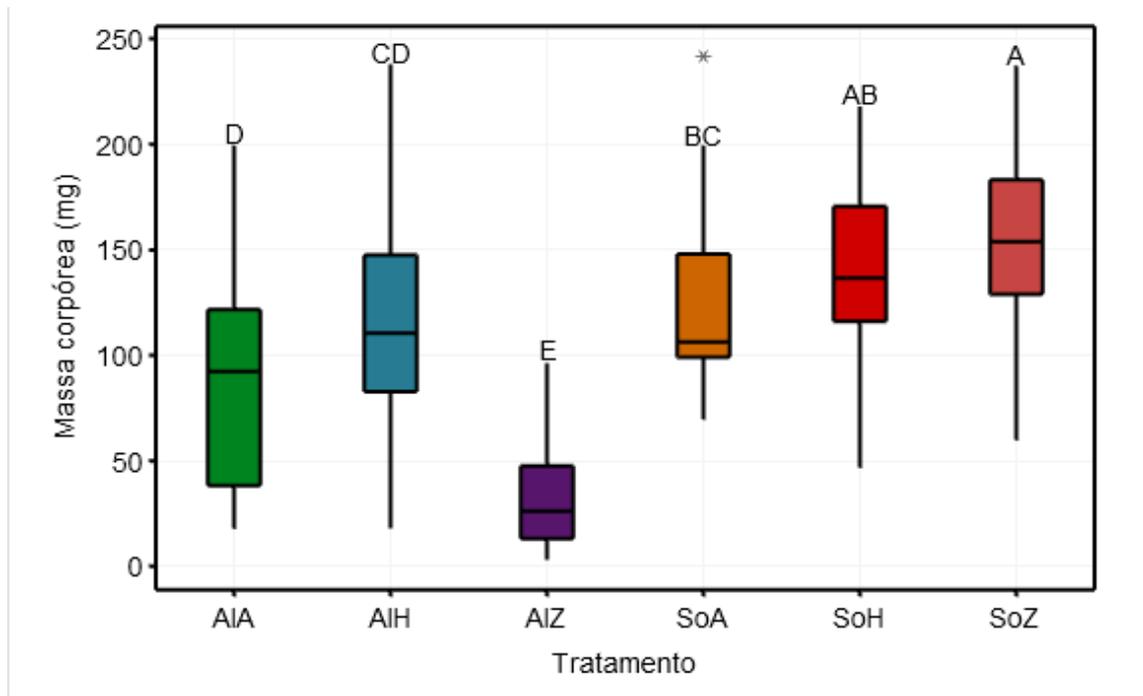
#### 4.3.2.1 Massa Corpórea

A massa corpórea das larvas variou entre tratamentos quando avaliados os indivíduos aos 7 dias ( $F_{(5; 144)} = 4,52$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 4.4). Os indivíduos com maior massa corpórea para todos os tratamentos foram aqueles que se alimentaram de soja; os valores obtidos foram híbrido em soja = 7,52 mg ( $\pm 1,034$ ), seguido por *H. zea* em soja = 6,54 mg ( $\pm 0,739$ ) e *H. armigera* em soja = 5,16 mg ( $\pm 0,64$ ). Entre os tratamentos nos quais o alimento ofertado foi algodão o maior índice de massa corpórea foi o obtido pelo híbrido x algodão = 4,88 mg ( $\pm 0,64$ ) seguido por *H. zea* em algodão = 4,80 mg ( $\pm 0,98$ ) e o tratamento com menor peso total foi *H. armigera* em algodão = 2,75 mg ( $\pm 0,37$ ). Quando comparados os indivíduos alimentados com soja em todas as espécies, estes só apresentaram diferenças significativas quando a comparação foi feita utilizando como referência o tratamento de *H. armigera* algodão, que foi o que apresentou os menores valores.



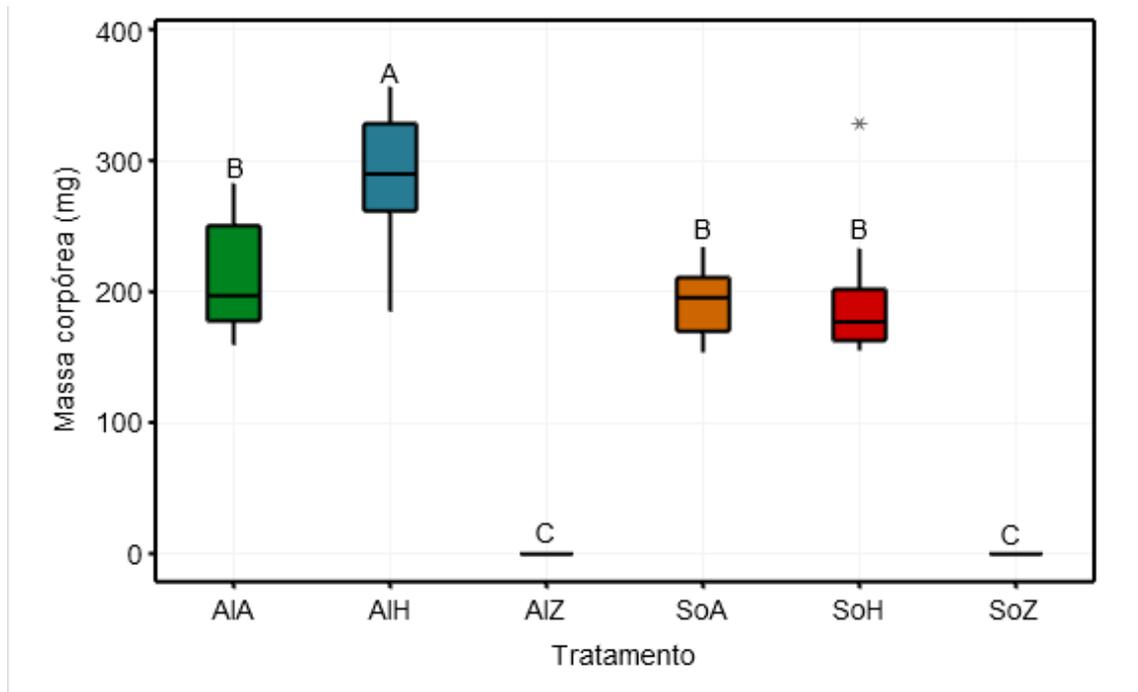
**Figura 4.4.** Box plot representando a massa corpórea (mg) das larvas aos 7 dias. Tratamentos com letras semelhantes não apresentaram diferenças estatísticas significativas no teste de Tukey ( $P=0,05$ ). *H. armigera* em algodão (AIA), *H. armigera* em soja (SoA), *H. zea* em algodão (AIZ), *H. zea* em soja (SoZ), Híbrido em algodão (AIH) e Híbrido em soja (SoH).

Transcorridos 14 dias desde a inoculação das larvas, os indivíduos alimentados com soja continuaram com maior massa corpórea, sendo *H. zea* em soja o de maior valor com 155,07 mg ( $\pm 5,65$ ), seguido do híbrido em soja = 140,09 ( $\pm 6,07$ ) e *H. armigera* em soja = 124,54 mg ( $\pm 8,10$ ) ( $F_{(5; 238)} = 53,68$ ;  $P < 0,000$ ) (Figura 4.5). Destaca-se que quando alimentadas com algodão as larvas híbridas têm uma maior massa corpórea = 112,45 mg ( $\pm 6,81$ ) que seus progenitores, *H. armigera* em algodão = 86,24 mg ( $\pm 9,91$ ) e *H. zea* em algodão = 34,23 mg ( $\pm 3,83$ ) (Figura 4.5).



**Figura 4.5.** Box plot representando a massa corpórea das larvas aos 14 dias. Tratamentos com letras semelhantes não apresentaram diferenças estatísticas significativas no teste de Tukey ( $P=0,05$ ). *H. armigera* em algodão (AIA), *H. armigera* em soja (SoA), *H. zea* em algodão (AIZ), *H. zea* em soja (SoZ), Híbrido em algodão (AIH) e Híbrido em soja (SoH).

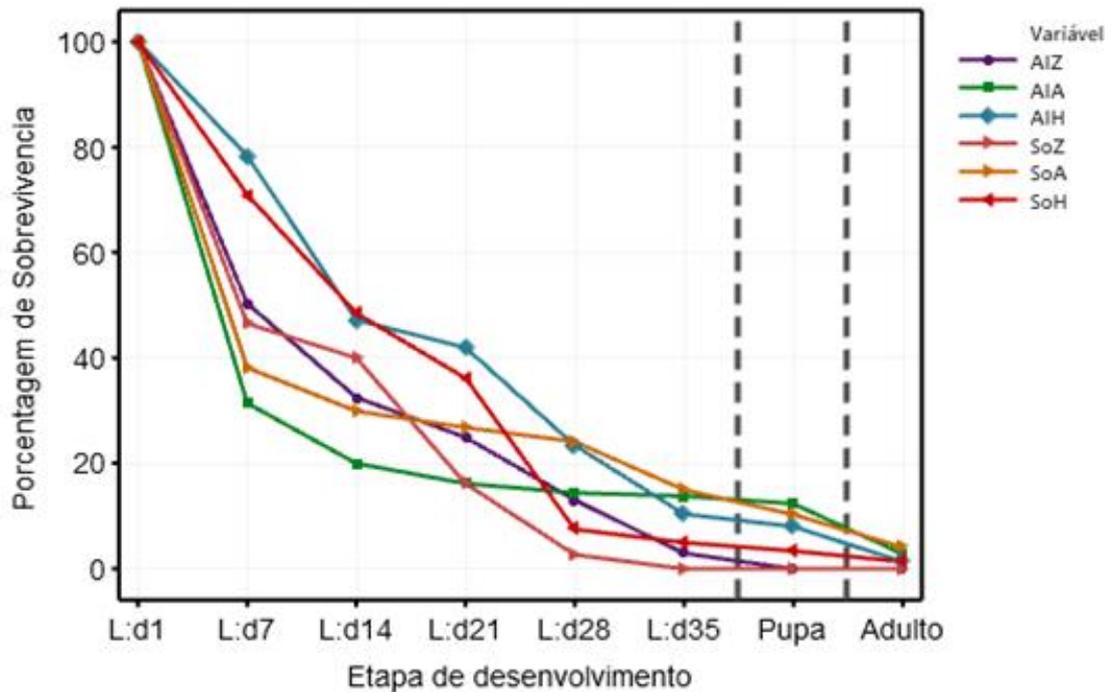
Na avaliação da massa corpórea das pupas, os indivíduos com uma maior massa corpórea foram os correspondentes ao tratamento híbrido alimentado de algodão = 286,57 mg ( $\pm 9,30$ ) e foram estatisticamente diferentes dos demais tratamentos ( $F_{(5;77)} = 165,42$ ;  $P < 0,001$ ) (Figura 4.6). Quando comparados *H. armigera* em algodão = 210,7 mg ( $\pm 10,82$ ), *H. armigera* em soja = 193,60 mg ( $\pm 8,39$ ) e o híbrido em soja = 192,3 mg ( $\pm 13,85$ ), entre eles não existiu diferença. Os indivíduos pertencentes aos tratamentos *H. zea* em algodão e *H. zea* em soja não alcançaram a fase de pupa.



**Figura 4.6.** Box plot representando a massa corpórea pupas 24 horas após sua formação. Tratamentos com letras semelhantes não apresentaram diferenças estatísticas significativas no teste de Tukey ( $P=0,05$ ). *H. armigera* em algodão (AIA), *H. armigera* em soja (SoA), *H. zea* em algodão (AIZ), *H. zea* em soja (SoZ), Híbrido em algodão (AIH) e Híbrido em soja (SoH).

#### 4.3.2.2 Sobrevivência

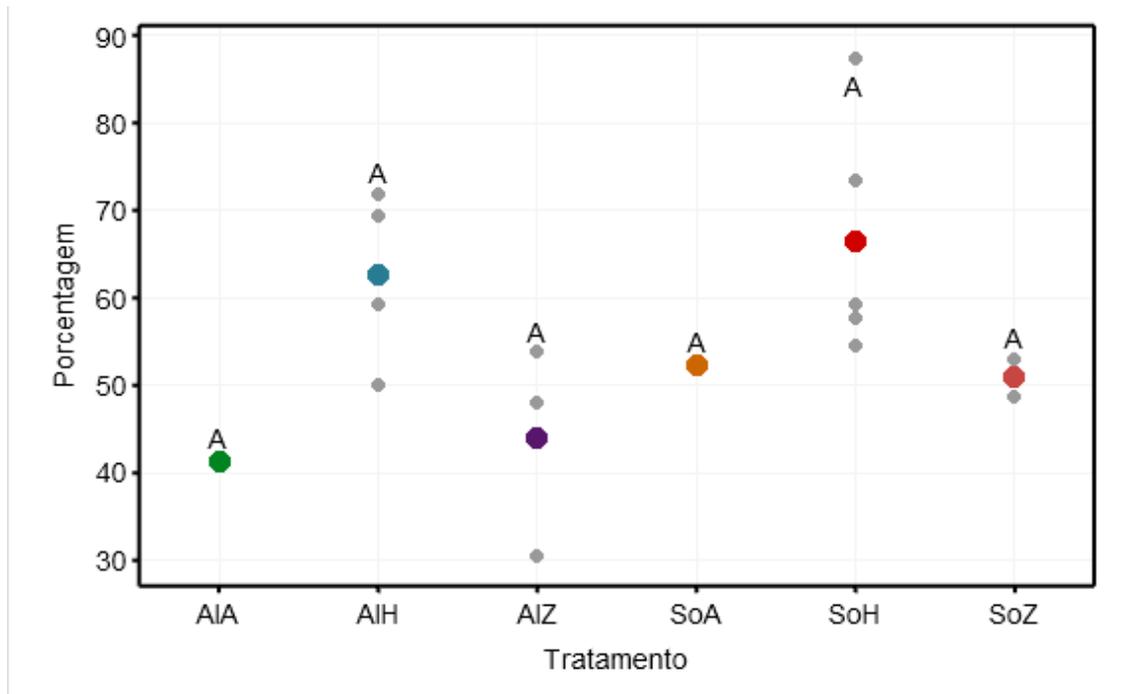
Foi quantificada a porcentagem de sobrevivência nos estágios de larva, pupa e adultos (Figura 4.7), as maiores taxas de mortalidade refletidas numa diminuição da porcentagem de insetos vivos aconteceu no período larval de 7 e 14 dias (L:d7 e L:d14) pelo que foram analisados por separado os tratamentos para conferir a possibilidade de diferenças estatísticas entre eles durante esses períodos de tempo (Figura 4.8 e 4.9).



**Figura 4.7.** Porcentagem de sobrevivência dos indivíduos semanalmente durante o período de larva, pupa e adultos. Ld1: dia de inoculação dos insetos. Porcentagem de larvas que sobreviveram nos dias 7, 14, 21, 28 e 35. *H. armigera* em algodão (AIA), *H. armigera* em soja (SoA), *H. zea* em algodão (AIZ), *H. zea* em soja (SoZ), Híbrido em algodão (AIH) e Híbrido em soja (SoH).

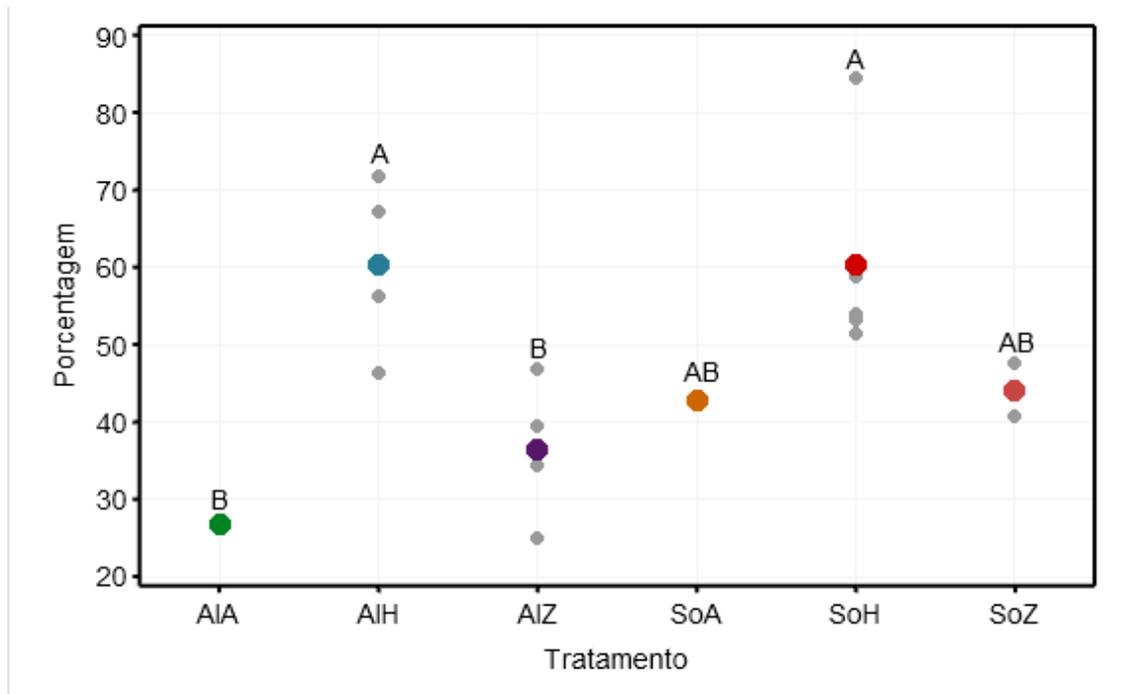
#### 4.3.2.3 Porcentagem de sobrevivência durante as primeiras semanas

A porcentagem de sobrevivência (Figura 4.8) nos 7 dias não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos ( $F_{(5; 12)} = 165,42$ ;  $P < 0,06$ ). Os valores das medias dos tratamentos estiveram entre o 40% e 70%, sendo híbrido em soja = 66,54% ( $\pm 5,01$ ), híbrido em algodão = 62,70% ( $\pm 5,02$ ), *H. armigera* em soja = 52,34% ( $\pm 0,00$ ), *H. zea* em soja = 50,94% ( $\pm 2,18$ ), *H. zea* em algodão = 44,06% ( $\pm 4,98$ ) e *H. armigera* em algodão = 41,41% ( $\pm 0,00$ ).



**Figura 4.8.** Gráfico de dispersão com as porcentagens de sobrevivência larval 7 dias após inoculação. *H. armigera* em algodão (AIA), *H. armigera* em soja (SoA), *H. zea* em algodão (AIZ), *H. zea* em soja (SoZ), Híbrido em algodão (AIH) e Híbrido em soja (SoH).

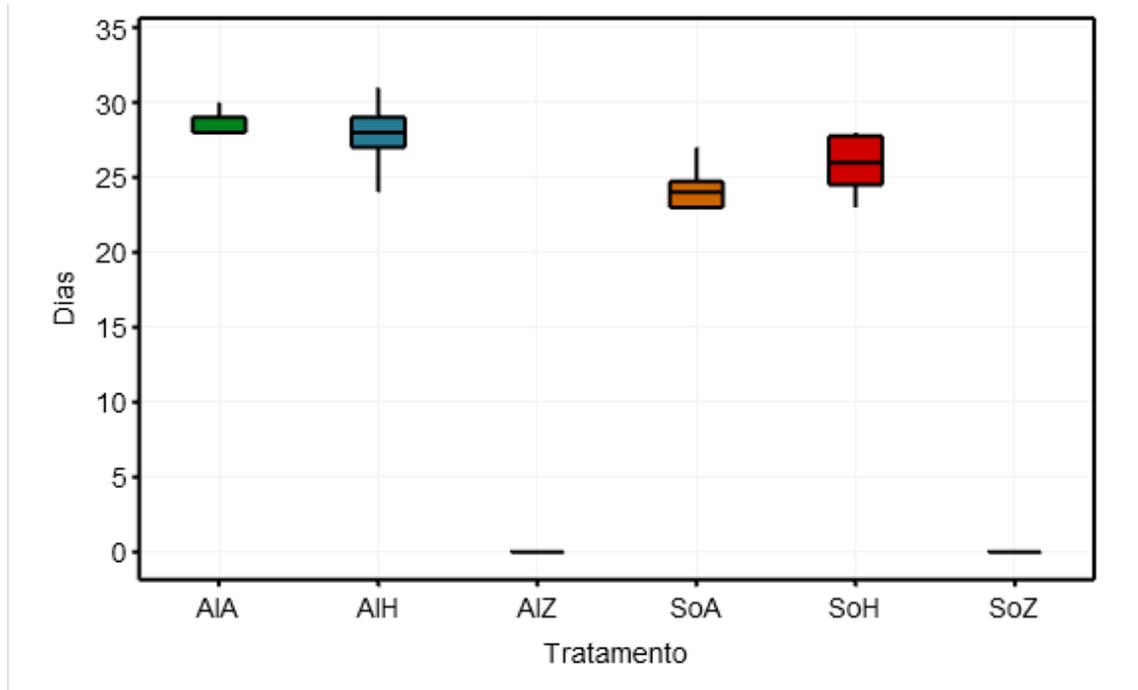
Quando os tratamentos foram avaliados e comparados no 14º dia ( $F_{(5; 12)} = 4,14$ ;  $P < 0,02$ ) (Figura 4.9), existiram diferenças entre os tratamentos onde a porcentagem de sobrevivência foi superior nos indivíduos híbridos sendo híbrido em algodão = 60,42% ( $\pm 5,72$ ), híbrido em soja = 60,21% ( $\pm 5,00$ ), seguidos de *H. zea* em soja = 44,15% ( $\pm 3,38$ ), *H. armigera* em soja = 42,86%, *H. zea* em algodão = 36,48% ( $\pm 4,6$ ) e por último *H. armigera* em algodão = 26,72%.



**Figura 4.9.** Gráfico de dispersão com as porcentagens de sobrevivência larval nos 14 dias após inoculação. *H. armigera* em algodão (AIA), *H. armigera* em soja (SoA), *H. zea* em algodão (AIZ), *H. zea* em soja (SoZ), Híbrido em algodão (AIH) e Híbrido em soja (SoH).

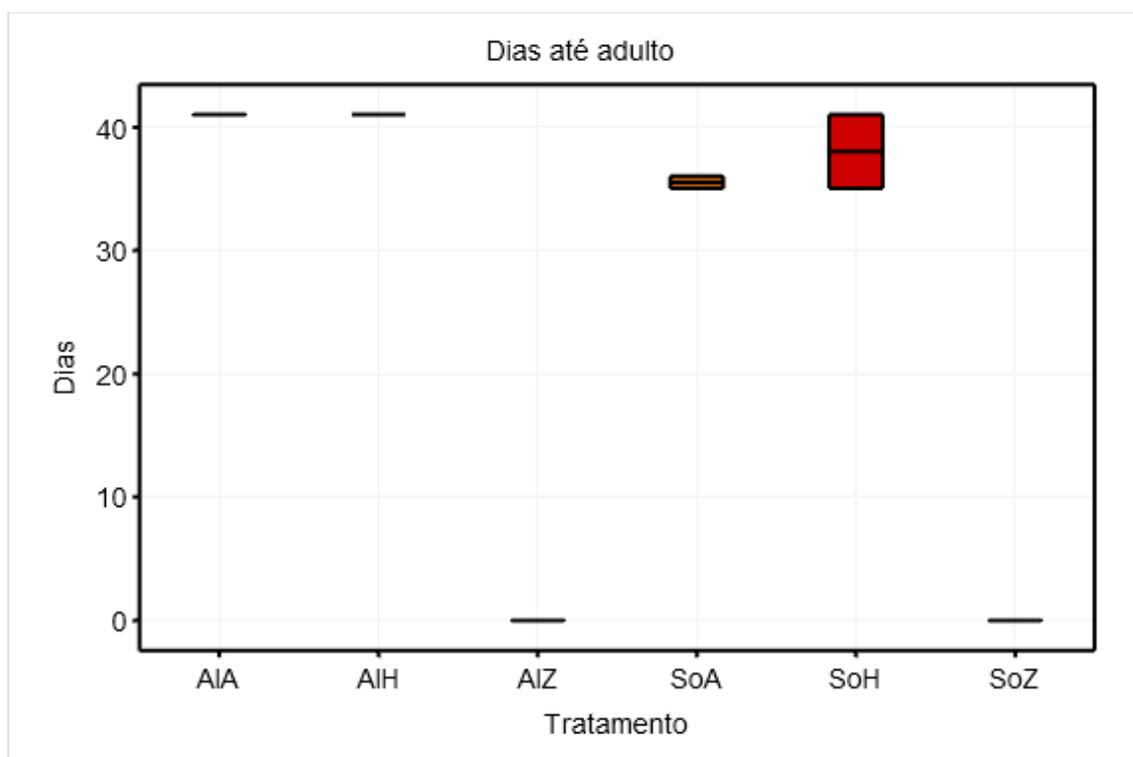
#### 4.3.2.4 Tempo de desenvolvimento requerido para trocar de estágio

Com relação ao tempo médio necessário para que um indivíduo alcance a fase de pupa  $F_{(5; 77)} = 1915,95; P < 0,001$ ) (Figura 4.10). Entre os tratamentos que chegaram a pupa, o maior tempo médio foram *H. armigera* em algodão = 28,71 dias ( $\pm 0,19$ ), seguido de híbrido em algodão = 28,04 dias ( $\pm 0,29$ ) sem diferenças estadísticas entre eles, posteriormente os valores para tratamentos foram: híbrido em soja = 26,08 dias ( $\pm 0,48$ ) e *H. armigera* em soja = 24,20 dias ( $\pm 0,48$ ). Os indivíduos pertencentes espécie *H. zea* não completaram a fase de pupa em nenhum dos alimentos.



**Figura 4.10.** Box plot representando o tempo necessário para chegar a fase de pupa. *H. armigera* em algodão (AIA), *H. armigera* em soja (SoA), *H. zea* em algodão (AIZ), *H. zea* em soja (SoZ), Híbrido em algodão (AIH) e Híbrido em soja (SoH).

Para chegar a adulto, os indivíduos que precisaram um menor número dias até a fase adulta foram os alimentados com soja *H. armigera* em soja = 35,5 dias ( $\pm 0,28$ ), a continuação o híbrido em soja = 38 dias ( $\pm 1,73$ ) e por último *H. armigera* e o híbrido alimentados de algodão 41 dias (Figura 4.11). É importante ressaltar que os indivíduos híbridos conseguiram se alimentar dos dois hospedeiros e completar as fases comportamento semelhante ao do seu progenitor *H. armigera*.



**Figura 4.11.** Box plot representando o tempo necessário para chegar a fase de adulto. *H. armigera* x algodão (AIA), *H. armigera* x soja (SoA), *H. zea* x algodão (AIZ), *H. zea* x soja (SoZ), Híbrido x algodão (AIH), Híbrido x soja (SoH).

#### 4.4 DISCUSSÃO

Confirmamos que os indivíduos das linhagens brasileiras de *H. armigera* e *H. zea* conseguem acasalar e formar uma prole híbrida em condições de laboratório. No entanto, a hibridação é assimétrica, visto que apenas o cruzamento interespecífico ♀ *H. armigera* e ♂ *H. zea* geraram uma prole híbrida enquanto o cruzamento ♂ *H. armigera* e ♀ *H. zea* não geraram descendentes. Vários testes preliminares realizados ao longo desse estudo apresentaram o mesmo padrão de isolamento reprodutivo entre *H. armigera* e *H. zea*. Uma hibridação assimétrica em maior proporção para a linhagem materna de *H. armigera* no Brasil também foi sugerida por Leite et al., (2017) e Anderson et al. (2018), que detectaram indivíduos híbridos putativos de *Helicoverpa* spp. com diferentes marcadores moleculares. Anderson et al. (2018) sequenciaram todo o genoma de indivíduos de *Helicoverpa* originados do Brasil e encontraram oito indivíduos híbridos com genes mitocondriais de *H. armigera* e apenas um com genes mitocondriais de *H. zea*.

Para ambos os cruzamentos interespecíficos, nós observamos cópulas entre os indivíduos de *H. armigera* e *H. zea* (dados não apresentados), o que sugere que

mecanismos pré-cópula não estão envolvidos no isolamento reprodutivo entre as espécies. Assim, mecanismos ainda não revelados durante o processo de cópula ou na viabilidade do zigoto impediram a produção de uma prole híbrida. As barreiras pre-zigóticas como incompatibilidade da genitália pode ser uma das explicações para o cruzamento entre fêmeas de *H. zea* e machos de *H. armigera* não terem sucesso na hibridação (Mallet, 2018). As duas espécies possuem apêndices genitais com aspectos morfológicos de forma e tamanho distintos (Pogue, 2004), o que pode ser um fator limitante para a fertilização de ovos e formação de uma prole híbrida. Esse fato pode ser reforçado pelo menor número de posturas e viabilidade de ovos, mesmo no cruzamento interespecífico que gerou prole viável. Outros fatores de isolamento pós-zigóticos como rearranjos cromossômicos e interações gênicas deletérias (teoria Dobzhansky–Muller) após a fecundação do zigoto podem explicar a não viabilidade da prole híbrida mesmo após uma cópula efetiva (Bordenstein & Drapeau, 2001; Brideau et al., 2006).

Ao contrário dos nossos experimentos, Laster & Hardee (1995) e Laster & Sheng (1995) obtiveram híbridos provenientes dos cruzamentos recíprocos entre *H. zea* da América do Norte e *H. armigera* da Rússia e China, respectivamente. Além disso, os híbridos obtidos nesses estudos foram férteis quando retrocruzados com sua linhagem progenitora. A linhagem de *H. zea* da América do Norte apresenta diferenças genéticas consistentes e fenotípicas distintas da linhagem de *H. zea* da América do Sul (Leite et al., 2017). Por exemplo, *H. zea* é uma praga-chave de soja na América do Norte e *H. zea* da América do Sul não é capaz de utilizar esse hospedeiro para completar o seu ciclo (Tipping et al., 2005; Coelho et al., 2020; Dourado et al., 2020). Além disso, eventos de resistência de *H. zea* a pesticidas são comumente repostados na América do Norte e são raros na América do Sul (Hutchison et al., 2007; Reisig & Kurtz, 2018). Essas diferenças genéticas poderiam influenciar no sucesso dos cruzamentos interespecíficos entre as linhagens de *H. armigera* e *H. zea*. Assim podemos sugerir que essa diferenciação entre as linhagens de *H. zea* nas Américas podem resultar em maior ou menor compatibilidade genética e morfológica com *H. armigera* e conseqüente diferenças no sucesso reprodutivo entre as linhagens, como reportado em outras espécies (Gröning & Hochkirch, 2008; Hovick & Whitney, 2014).

Os parâmetros de desenvolvimento larval das linhagens de *Helicoverpa* em folhas de soja e algodão foram similares entre as três linhagens de *Helicoverpa*, tanto para massa corpórea, tempo de desenvolvimento e taxa de sobrevivência. Vale

ressaltar que apesar de algumas diferenças significativas entre os tratamentos nos parâmetros de desenvolvimento larval, os três parâmetros foram variáveis entre as linhagens/tratamentos, onde nenhuma delas se destacou em todos os parâmetros de desenvolvimento larval nos dois hospedeiros. Por exemplo, para o tratamento *H. armigera* alimentando-se de algodão, os insetos apresentaram uma menor massa corpórea, porém maior probabilidade de sobrevivência durante todos os estádios de vida.

No entanto, no final da fase larval houve um aumento significativo da mortalidade de larvas antes da mudança para fase de pupa. Especificamente para *H. zea*, nenhum indivíduo foi capaz de completar o seu ciclo em ambos os hospedeiros. Esse resultado já era esperado para o hospedeiro de soja, mas não para o hospedeiro de algodão. Para um inseto utilizar uma planta como hospedeiro é necessário que a planta tenha todos os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento e, principalmente, que o inseto consiga detoxificar os compostos de defesa produzidos pelas plantas (Heckel, 2014; Heidel-Fischer & Vogel, 2015).

Aparentemente, *H. zea* foi capaz de obter os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento larval, no entanto, houve um bloqueio do desenvolvimento para a fase de pupa. Assim, duas hipóteses podem ser sugeridas, a primeira, uma deficiência nutricional apesar do ótimo desenvolvimento larval, o que não permitiu os indivíduos completarem o ciclo, e a segunda hipótese, a não detoxificação (ou parcial detoxificação) dos compostos de defesa da planta que afetam a capacidade de muda e metamorfose dos insetos. Os principais compostos nas plantas de algodão e soja são respectivamente o gossipol e as lipoxigenases que diminuem a qualidade dos nutrientes da planta e afetam processos fisiológicos dos insetos (Felton et al., 1994; Stipanovic et al., 2006)

Para os bioensaios de desenvolvimento das linhagens de *Helicoverpa*, nós escolhemos um hospedeiro que era relatado adequado para as duas espécies, o algodão, o que não foi confirmado para *H. zea*, e um hospedeiro adequado apenas para uma das espécies, a soja, uma vez que já tinham confirmado a presença de apenas *H. armigera* em soja em condições de campo e a capacidade de utilizar soja como recurso (Leite et al., 2014; Reigada et al., 2016; Pinto et al., 2017). Nossa escolha teve como objetivo potencializar as possíveis diferenças presentes na prole híbrida em relação as linhagens parentais quanto a utilização de diferentes

hospedeiros. Assim, nós observamos que a prole híbrida foi capaz de completar o seu ciclo em ambos os hospedeiros assim como a linhagem *H. armigera*, apesar de possuir apenas parte do genoma de *H. armigera*. O fato de não ter uma sobrevivência menor nem precisar de um tempo maior para seu desenvolvimento nos leva a sugerir que não apresentam degeneração híbrida no desenvolvimento durante a geração F1. No entanto, não conseguimos prever o que poderia acontecer com a viabilidade e fertilidade da prole híbrida em gerações subsequentes, onde retrocruzamentos com as duas espécies poderiam ocorrer livremente em condições de campo.

Aqui nós demonstramos a presença de uma prole híbrida assimétrica entre as linhagens brasileiras de *H. armigera* e *H. zea*, onde o cruzamento *H. armigera* fêmea e *H. zea* macho geraram descendentes. A presença de híbridos putativos com origem materna de *H. zea* em condições de campo (Leite et al., 2017; Anderson et al., 2018) sugere que essas espécies podem ter um maior sucesso de hibridação a campo do que em condições de laboratório devido ao baixo sucesso de acasalamento e viabilidade principalmente de *H. zea* em condições de laboratório. No entanto, de acordo com os nossos dados moleculares, as populações de *H. armigera* e *H. zea* continuam com pools genéticos bem característicos não aparentando a fusão das espécies (Capítulo 3).

O desempenho maior ou similar da prole híbrida nos hospedeiros de soja e algodão quando comparado as linhagens de *H. armigera* e *H. zea* demonstra a capacidade da prole híbrida de sobreviver em condições de campo em uma amplitude de hospedeiros similar a *H. armigera*. Assim, apesar da baixa viabilidade dos cruzamentos interespecíficos devido a uma hibridação assimétrica, esses indivíduos podem servir como ponte para introgressão de alelos e genes entre as espécies com grandes consequências para o manejo dessas pragas. Desta maneira o monitoramento constante de introgressões dessas espécies no campo se faz necessário para ajudar prever mudança na dinâmica de hospedeiros e outras características adaptativas importantes dessas espécies a longo da paisagem agrícola.

## REFERÊNCIAS

- Abbott, R., Albach, D., Ansell, S., Arntzen, J. W., Baird, S. J. E., Bierne, N., Boughman, J., Brelsford, A., Buerkle, C. A., Buggs, R., Butlin, R.K., Dieckmann, U., Eroukhmanoff, F., Grill, A., Cahan, S. H., Hermansen, J. S., Hewitt, G., Hudson, A. G., Jiggins, C., Jones, J., Keller, B., Marczeeski, T., Mallet, J., Matinez-Rodriguez, P., Most, M., Mullen, S., Nichols, R., Nolte, A. W., Parisod, C., Pfenning, K., Rice, A. M., Ritchie, M. G., Seifert, B., Smadja, C. M., Stelkens, R., Szymura, J. M., Vainola, R. e Zinner, D. (2013). Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 26: 229–246.
- Ali, J. G. e Agrawal, A. A. (2012). Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. *Trends in Plant Science*, 17(5): 293–302.
- Anderson, C. J., Tay, W. T., McGaughran, A., Gordon, K. e Walsh, T. K. (2016). Population structure and gene flow in the global pest, *Helicoverpa armigera*. *Molecular Ecology*, 25(21): 5296–5311.
- Anderson, Craig J., Oakeshott, J. G., Tay, W. T., Gordon, K. H. J., Zwick, A. e Walsh, T. K. (2018). Hybridization and gene flow in the mega-pest lineage of moth, *Helicoverpa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(19): 5034–5039.
- Arnemann, J. A., James, W. J., Walsh, T. K., Guedes, J. V. C., Smagghe, G., Castiglioni, E. e Tay, W. T. (2016). Mitochondrial DNA COI characterization of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Paraguay and Uruguay. *Genetics and Molecular Research*, 15(2): 1–8.
- Bass, C., Zimmer, C. T., Riveron, J. M., Wilding, C. S., Wondji, C. S., Kausmann, M., Field, Linda M., Williamsom, Martin S. e Nauen, R. (2013). Gene amplification and microsatellite polymorphism underlie a recent insect host shift. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 110(48): 19460–19465.
- Behere, G. T., Tay, W. T., Russell, D. A. e Batterham, P. (2008). Molecular markers to discriminate among four pest species of *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of Entomological Research*, 98(6): 599–603.
- Bentivenha, J. P. F., Paula-Moraes, S. V., Baldin, E. L. L., Specht, A., Da Silva, I. F. e Hunt, T. E. (2016). Battle in the New World: *Helicoverpa armigera* versus *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *PLoS ONE*, 11(12): e0167182.

- Bordenstein, S. R. e Drapeau, M. D. (2001). Genotype-by-environment interaction and the Dobzhansky-Muller model of postzygotic isolation. *Journal of Evolutionary Biology*, 14: 490–501.
- Brideau, N. J., Flores, H. A., Wang, J., Maheshwari, S., Wang, X. e Barbash, D. A. (2006). Two Dobzhansky-Muller genes interact to cause hybrid lethality in *Drosophila*. *Science*, 314(5803): 1292–1296.
- Burke, J. M. e Arnold, M. L. (2001). Genetics and the fitness of Hybrids. *Annual Review of Genetics*, 35: 31–52.
- Butt, A. e Cantu, E. (1962). Sex determination of Lepidopterous pupae.
- Coelho, M., Cook, D. R., Catchot, A. L., Gore, J., Lourenção, A. L. e Baldin, E. L. L. (2020). Simulated corn earworm, *Helicoverpa zea*, injury in an indeterminate soybean cultivar at various growth stages under non-Irrigated conditions in the southern United States. *Agronomy*, 10(1450): 1–10.
- Corrêa, A. S., Cordeiro, E. M. G. e Omoto, C. (2019). Agricultural insect hybridization and implications for pest management. *Pest Management Science*, 75: 2857–2864.
- Cunningham, J. P. e Zalucki, M. P. (2014). Understanding Heliothine (Lepidoptera: Heliothinae) pests: What is a host plant? *Journal of Economic Entomology*, 107(3): 881–896.
- Dourado, P. M., Pantoja-Gomez, L. M., Horikoshi, R. J., Carvalho, R. A., Omoto, C., Corrêa, A. S., Kim, Jae H., Martinelli, Samuel e Head, G. P. (2020). Host plant use of *Helicoverpa* spp. (Lepidoptera: Noctuidae) in the Brazilian agricultural landscape. *Pest Management Science*: 1–15.
- Felton, G. W., Bi, J. L., Summers, C. B., Mueller, A. J. e Duffey, S. S. (1994). Potential role of lipoxygenases in defense against insect herbivory. *Journal of Chemical Ecology*, 20(3): 651–666.
- Fitt, G. P. (1989). The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. *Annual Review of Entomology*, 34: 17–52.
- Gonçalves, R. M., Mastrangelo, T., Rodrigues, J. C. V., Paulo, D. F., Omoto, C., Corrêa, A. S. e 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(13): 7378–7401.
- Greene, G. L., Leppla, N. C. e Dickerson, W. A. (1976). Velvetbean caterpillar: A rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, 69(4): 487–488.

- Gripenberg, S., Mayhew, P. J., Parnell, M. e Roslin, T. (2010). A meta-analysis of preference-performance relationships in phytophagous insects. *Ecology Letters*, 13(3): 383–393.
- Gröning, J. e Hochkirch, A. (2008). Reproductive interference between animal species. *Quarterly Review of Biology*, 83(3): 257–282.
- Heckel, D. G. (2014). Insect detoxification and sequestration strategies. *Annual Plant Reviews* (47).
- Heidel-Fischer, H. M. e Vogel, H. (2015). Molecular mechanisms of insect adaptation to plant secondary compounds. *Current Opinion in Insect Science*, 8: 8–14.
- Hovick, S. M. e Whitney, K. D. (2014). Hybridization is associated with increased fecundity and size in invasive taxa: Meta-analytic support for the hybridization-invasion hypothesis. *Ecology Letters*, 17(11): 1464–1477.
- Hutchison, W. D., Burkness, E. C., Jensen, B., Leonard, B. R., Temple, J., Cook, D. R., Weinzierl, R. A., Foster, R. E., Rabaey, T. L. e Flood, B. R. (2007). Evidence for decreasing *Helicoverpa zea* susceptibility to pyrethroid insecticides in the midwestern United States. *Plant Health Progress*, 8(1): 1–11.
- Jackson, R. E., Bradley, J. R., Van Duyn, J., Leonard, B. R., Allen, K. C., Luttrell, R., Ruberson, J., Adamczyk, J., Gore, J., Hardee, D. D., Voth, R., Sivasupramaniam, S., Mullins, J. W. e Head, G. (2008). Regional assessment of *Helicoverpa zea* populations on cotton and non-cotton crop hosts. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 126(2): 89–106.
- Jones, C. M., Parry, H., Tay, W. T., Reynolds, D. R. e Chapman, J. W. (2019). Movement ecology of pest *Helicoverpa*: Implications for ongoing spread. *Annual Review of Entomology*, 64: 277–295.
- Laster, M. L. e Hardee, D. D. (1995). Intermating compatibility between North American *Helicoverpa zea* and *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Russia. *Journal of Economic Entomology*, 88(1): 77–80.
- Laster, M. L. e Sheng, C. F. (1995). Search for hybrid sterility for *Helicoverpa zea* in crosses between the North American *H. zea* and *H. armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from China. *Journal of Economic Entomology*, 88(5): 1288–1291.

- Leite, N. A., Correa, A. S., Michel, A. P., Alves-Pereira, A., Pavinato, V. A. C., Zucchi, M. I. e Omoto, C. (2017). Pan-American similarities in genetic structures of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) with implications for hybridization. *Environmental Entomology*, 46(4): 1024–1034.
- Leite, Natália A., Alves-Pereira, A., Corrêa, A. S., Zucchi, M. I. e 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.
- Mallet, J. (2018). Invasive insect hybridizes with local pests. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(19): 4819–4821.
- Naisbit, R. E., Jiggins, C. D. e Mallet, J. (2001). Disruptive sexual selection against hybrids contributes to speciation between *Heliconius cydno* and *Heliconius melpomene*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268(1478): 1849–1854.
- Perera, O. P., Allen, K. C., Jain, D., Purcell, M., Little, N. S. e Luttrell, R. G. (2015). Rapid identification of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) using ribosomal RNA internal transcribed spacer 1. *Journal of Insect Science*, 15(1): 1–10.
- Pinto, F. A., Mattos, M. V. V., Silva, F. W. S., Rocha, S. L. e Elliot, S. L. (2017). The spread of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) and coexistence with *Helicoverpa zea* in Southeastern Brazil. *Insects*, 8(87): 1–5.
- Pogue, M. G. (2004). a new synonym of *Helicoverpa zea* (Boddie) and differentiation of adult males of *H. zea* and *H. armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae: Heliethinae). *Annals of the Entomological Society of America*, 97(6): 1222–1226.
- Reigada, C., Guimarães, K. F. e Parra, J. R. P. (2016). Relative fitness of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on seven host plants: A perspective for IPM in Brazil. *Journal of Insect Science*, 16(1): 1–5.
- Reisig, D. D. e Kurtz, R. (2018). Bt Resistance implications for *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) insecticide resistance management in the United States. *Environmental Entomology*, 47(6): 1357–1364.
- Stipanovic, R. D., Lopez, J. D., Dowd, M. K., Puckhaber, L. S. e Duke, S. E. (2006). Effect of racemic and (+)- and (-)- gossypol on the survival and development of *Helicoverpa zea* larvae. *Journal of Chemical Ecology*, 32(5): 959–968.

- Subramanian, S. e Mohankumar, S. (2006). Genetic variability of the bollworm, *Helicoverpa armigera*, occurring on different host plants. *Journal of Insect Science*, 6(26): 1–8.
- Suits, R., Reisig, D. e Burrack, H. (2017). Feeding preference and performance of *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae on various soybean tissue types. *Florida Entomologist*, 100(1): 162–167.
- Tay, W. T., Soria, M. F., Walsh, T., Thomazoni, D., Silvie, P., Behere, G. T., Anderson, C. e Downes, S. (2013). A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *PLoS ONE*, 8(11): e80134.
- Tay, W. T., Walsh, T. K., Downes, S., Anderson, C., Jermiin, L. S., Wong, T. K. F., Piper, M. C., Chang, E. S., Macedo, I. B., Czepak, C., Behere, G. T., Silvie, P., Soria, M. F., Frayssinet, M. e Gordon, K. H. J. (2017). Mitochondrial DNA and trade data support multiple origins of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera, Noctuidae) in Brazil. *Scientific Reports*, 7: 1–10.
- Tipping, P. W., Holko, C. A. e Bean, R. A. (2005). *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) dynamics and parasitism in Maryland soybeans. *Florida Entomologist*, 88(1): 55–60.
- Zangerl, R. e Berenbaum, M. R. (1993). Plant chemistry , insect adaptations to plant chemistry and host plant utilization patterns. *Ecological Society of America*, 74(1):, 47–54.



## 5. EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE *Helicoverpa* spp. (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) COMO RESPOSTA A ALIMENTAÇÃO LARVAL EM DIFERENTES HOSPEDEIROS

### RESUMO

No processo de adaptação dos insetos herbívoros a diferentes fontes alimentares, múltiplas estratégias surgiram para assimilar os nutrientes e detoxificar compostos tóxicos produzidos pelas plantas. Estas estratégias diferem entre espécies de insetos e definem a diversidade de hospedeiros que o inseto pode utilizar bem como o seu desempenho biológico em um hospedeiro específico. *Helicoverpa zea* é catalogada como espécie irmã de *H. armigera* e os processos de especiação entre as espécies ainda não está completo uma vez que possuem capacidade de gerar uma prole híbrida. As duas espécies, apesar de muito similares geneticamente, apresentam amplitude de polifagia bem diferente, onde *H. armigera* é reconhecidamente mais polífaga que *H. zea*. No entanto, faltam informações de quais são os mecanismos genéticos envolvidos na maior polifagia de *H. armigera*. Desta forma, o objetivo do trabalho foi em analisar o perfil da expressão gênica de larvas de *H. armigera*, *H. zea* e de uma linhagem híbrida (♀ *H. armigera* \* ♂ *H. zea*) alimentadas em folhas de algodão e soja com intuito de identificar os principais genes envolvidos nos processos de utilização de hospedeiros em ambas as espécies. Como resultados obtivemos que os mecanismos adaptativos são influenciados pelas linhagens e pelo hospedeiro tendo padrões de expressão diferentes quando comparados entre elas. Nossas análises sugerem que o sucesso adaptativo de *H. armigera* a um número maior de hospedeiros parece estar ligado a um maior número e maior expressão de genes associados a detoxificação de compostos secundários (tóxicos) de plantas. A prole híbrida, conserva padrões do progenitor *H. zea*, no entanto seu perfil de transcrição foi mais similar a *H. armigera*. Os genes que se destacam como candidatos para a maior polifagia de *H. armigera* e da prole híbrida incluem *molting carboxipeptidase A*, *Chemosensory protein 15*, serine protease que estão presentes em *H. armigera* e na prole híbrida, mas não em *H. zea* e a expressão diferenciada de genes da família Citocromo P450.

**Palavras-chave:** Hibridação, adaptação a hospedeiros, RNAseq, enzimas detoxificativas

**Differential expression of *Helicoverpa* spp (Lepidoptera: Noctuidae) as a response to larval feeding in different hosts**

### ABSTRACT

In the adaption process of herbivorous insects to different host sources, multiple strategies have emerged to assimilate nutrients and detoxify toxic compounds obtained by plants. These strategies differ between insect species and define the diversity of hosts that the insect can use as well as its biological performance on a specific host. *Helicoverpa zea*

is classified as a sister species of *H. armigera* and the speciation processes between species is not complete, since they have the capacity to generate a hybrid offspring. These two species are very similar genetically, but they have a very different polyphage range, where *H. armigera* is known to be more polyphagy than *H. zea*. However, there is a lack of information on the genetic mechanisms involved in the greater polyphagia of *H. armigera*. Thus, the objective of the work was to analyze the gene expression profile of *H. armigera*, *H. zea*, and hybrid strain ( $\text{♀ } H. armigera * \text{♂ } H. zea$ ) larvae fed on cotton and soybean leaves in order to identify the main genes involved in the processes of using hosts in both species. We obtained that the gene expression profile are influenced by the strains and by the host having different expression patterns when compared between them. Our assessments that the adaptive success of *H. armigera* to a larger number of hosts appear to be linked to a greater number and expression of genes associated with the detoxification of secondary (toxic) plant compounds. The hybrid offspring maintains standards of the parent *H. zea*, however, its expression profile was more similar to *H. armigera*. The genes that stand out as candidates for the greatest polyphagy of *H. armigera* and hybrid offspring include the molting carboxypeptidase A, Chemosensory protein 15, and serine protease that are present in *H. armigera* and hybrid offspring, but not in *H. zea* and the differential expression of genes of Cytochrome P450 family.

**Keywords:** Hybridization, adaptation to hosts, RNAseq, detoxification enzymes

## 5.1 INTRODUÇÃO

A seleção da fonte alimentar por um inseto fitófago pode ser considerada um mecanismo adaptativo resultante de processos de coevolução entre insetos e plantas, onde os insetos desenvolvem estratégias para superar as barreiras físicas e químicas das plantas (Ehrlich & Raven, 1964). Os mecanismos de adaptação a hospedeiros também têm forte influência na diversificação da classe Insecta, onde existem vários relatos de eventos de especiação simpátrica dirigidos pela seleção de hospedeiros (Bush, 1969; Drès & Mallet, 2002; Futuyma & Agrawal, 2009).

A capacidade de metabolizar os compostos tóxicos das plantas e utilizá-las como fonte de alimento pode ser considerada como um dos maiores sucessos evolutivos dos artrópodes (Berenbaum, 2002; Després et al., 2007). Dentro das habilidades para inibir os sistemas de defesa da planta, encontra-se uma grande quantidade de enzimas com funções de detoxificação como as pertencentes ao grupo dos citocromo P450, as carboxilesterases e as UDP-glucosyltransferases (UGTs) (Krempl et al., 2016). O sequestro dos compostos tóxicos como os glicosídeos

cianogênicos com intervenção das  $\beta$ -glucosidases, que posteriormente podem servir como mecanismos de defesa do próprio herbívoro, também são mecanismos que permitem os insetos a utilizarem uma determinada espécie (ou grupo de espécies) como hospedeiro (Heckel, 2014; Simon et al., 2015). O acionamento das respostas bioquímicas com potencial detoxificativo depende da ativação de um ou mais genes como resposta aos estímulos alimentares (plasticidade fenotípica). Existem casos bastante específicos, como por exemplo, a produção de secreções (elicitores) salivares de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) que suprimem os níveis de nicotina da planta *Nicotiana tabacum* L. (Solanales: Solanaceae) (Musser et al., 2002; Gog et al., 2014).

Os mecanismos de adaptação das populações de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) e de *H. zea* têm sido alvo de vários estudos (Volpicella et al., 2003; Kotkar et al., 2009; Zhang et al., 2019), uma vez que entender os princípios de adaptação destas pragas de grande importância para a agricultura mundial nas diferentes culturas são informações úteis no desenvolvimento de novas e eficientes estratégias para o manejo e o controle sustentável dessas pragas. Historicamente, a espécie praga *H. armigera* encontrava-se restrita ao Velho Mundo e Oceania, mas desde o ano 2013 vem colonizando e se adaptando ao território brasileiro (Czepak et al., 2013; Tay et al., 2013) onde têm sido reportadas falhas nas estratégias de controle e sérios danos econômicos em várias regiões da América do Sul. Por sua vez, *H. zea* já era reportada no território brasileiro como praga de culturas do milho, tomate, algodão entre outras. *Helicoverpa armigera* e *H. zea* possuem uma grande similaridade morfológica e genética, sendo consideradas espécies irmãs com capacidade de acasalar e produzir descendentes híbridos em condições de laboratório e campo (Laster & Hardee, 1995; Anderson et al., 2018).

Para estudar os mecanismos responsáveis pela adaptação de um inseto a um determinado grupo de hospedeiros é bastante útil conhecer o perfil de transcritos desse organismo quando submetido a diferentes hospedeiros (Yu et al., 2016; Lowe et al., 2017; Birnbaum et al., 2017). Para isso, nós podemos utilizar uma técnica conhecida como RNAseq que utiliza plataformas de sequenciamento de larga escala (high throughput sequencing or next generation sequencing) para sequenciar o RNA mensageiro total de indivíduos e comparar o perfil de transcritos entre os insetos a

diferentes estímulos em uma fase de vida específica (Koenig et al., 2015; Roy et al., 2016; Malka et al., 2018).

Desta forma, utilizando a abordagem de RNAseq, nós submetemos insetos de *H. armigera*, *H. zea* e uma linhagem híbrida ( $\text{♀ } H. armigera * \text{♂ } H. zea$ ) a dois diferentes hospedeiros, soja e algodão (ver capítulo 4). Posteriormente, nós avaliamos o perfil de transcritos de larvas de terceiro instar nos tratamentos descritos acima utilizando a abordagem de RNAseq. Nosso objetivo com esse estudo é diagnosticar os principais genes associados a expressão desses diferentes fenótipos quando alimentados de dois hospedeiros. As informações aqui obtidas, além de contribuir para elucidar os mecanismos genéticos da polifagia dentro do gênero *Helicoverpa*, produzirá dados inéditos sobre o perfil de transcritos de uma prole híbrida que permitirá elucidar a capacidade da mesma de se adaptar a diferentes hospedeiros e de servir como um mecanismo evolutivo de ampliação de hospedeiros dentro das espécies de *Helicoverpa* no território brasileiro.

## 5.2 MATERIAL & MÉTODOS

### 5.2.1 Coleta, extração de RNA, preparo das amostras, construção da biblioteca e sequenciamento

Para avaliar o perfil da expressão diferencial de larvas de diferentes linhagens de *Helicoverpa* (*H. armigera*, *H. zea* e uma linhagem híbrida ( $\text{♀ } H. armigera * \text{♂ } H. zea$ )) sobre soja e algodão, nós organizamos os adultos de *Helicoverpa armigera* e *Helicoverpa zea* para obtermos acasalamentos coespecíficos e interespecíficos e consequentemente a prole desejada. Toda a metodologia da montagem dos casais e da manutenção das larvas nos diferentes hospedeiros está descrita detalhadamente no capítulo 4.

Assim, o delineamento experimental para obter o material biológico para o nosso RNAseq consistiu de 6 tratamentos: *H. armigera* em algodão (AIA), *H. armigera* em soja (SoA), *H. zea* em algodão (AIZ), *H. zea* em soja (SoZ), híbrido em algodão (AIH) e híbrido em soja (SoH). Para cada tratamento um conjunto de 3 lagartas do primeiro dia do terceiro instar com peso homogêneo ( $16\text{mg} \pm 1$ ) foi utilizando como repetição, sendo no total 3 repetições por tratamento.

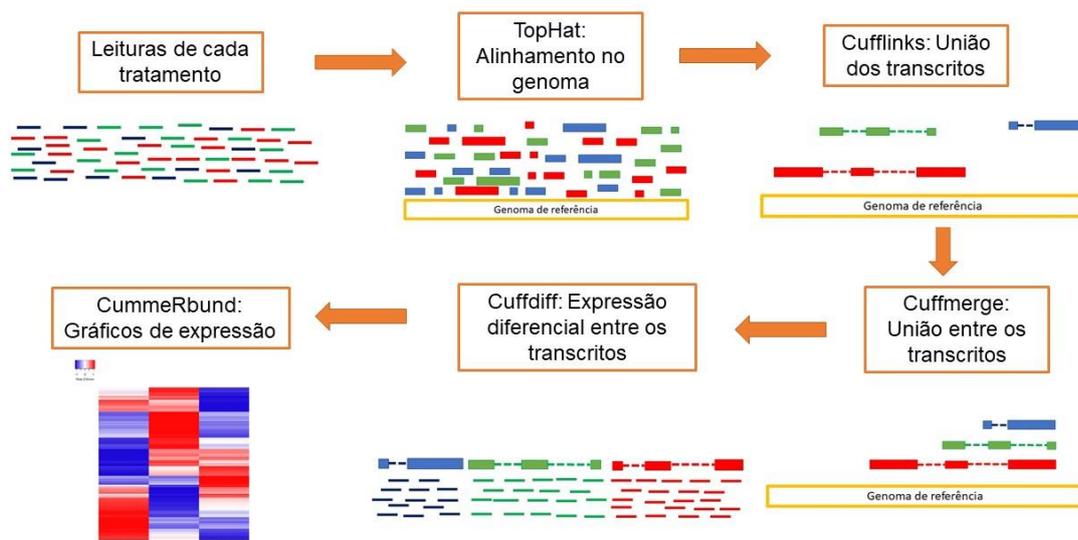
As extrações de RNA foram realizadas com o corpo inteiro das lagartas utilizando o kit (Quick-RNA zymo Research) de acordo com as indicações do

fabricante. O RNA total foi estocado em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para conservar a integridade do RNA que foi posteriormente conferida em gel de agarose 1% p/v e no equipamento bioanalyzer. As bibliotecas de cDNA foram preparadas seguindo o protocolo Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Prep LT e o sequenciamento do transcriptoma foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Animal, Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/ USP) utilizando o kit HiSeq SBS v4, com leituras pareadas de 100 bp (2x101) no HiSeq 2500.

### **5.2.2 Análises dos dados**

As leituras resultantes do sequenciamento foram inicialmente avaliadas no programma FastQC, onde foram conferidos os parâmetros como tamanho dos fragmentos, conteúdo de cada um dos nucleotídeos e a qualidade das sequências. Posteriormente as leituras foram filtradas e trimadas no programa Trimmomatic (Bolger et al. 2014) com o intuito de retirar ruídos presentes nas extremidades das leituras, assim como sequências de baixa qualidade.

Nas análises do transcriptoma foi seguido o protocolo conhecido como Tuxedo I (Figura 5.1), no qual a primeira etapa consiste no alinhamento das leituras utilizando o programa TopHat (Trapnell et al., 2012). Nessa etapa o total das leituras obtidas em cada tratamento foram comparadas e alinhadas como genoma de referência de *H. armigera* disponível no genbank (GCF\_002156985.1). Posteriormente, foi realizado a união dos transcritos utilizado o programa cuffmerge. Para determinar os transcritos que foram expressos de maneira diferente entre tratamentos foi utilizado o programa cuffdiff, utilizando para o cálculo  $\log_{10}$  dos FPKM (corresponde aos fragmentos por quilobase de transcrição por milhão de leituras mapeadas).



**Figura 5.1:** Protocolo de análises Tuxedo 1, adaptado de Trapnell et al., 2012.

Na determinação da expressão diferencial foi utilizado o pacote EdgeR v3.9, onde foi estabelecido para as análises nove grupos comparativos, separando os tratamentos de acordo a espécie e com o hospedeiro ofertado (Tabela 5.1). O parâmetro utilizado nas comparações correspondeu aos valores de FPKM obtidos em cada um dos tratamentos, sendo considerado como significativamente diferentes valores de expressão relativa (*fold change*) > 2 e significância de  $p < 0,05$ .

**Tabela 5.1.** Comparações entre tratamentos para determinar o nível de expressão dos genes.

Comparação	Tratamentos comparados	Código
C1	<i>H. armigera</i> em algodão * <i>H. armigera</i> em soja	AIA * SoA
C2	Híbrido em algodão * híbrido em soja	AIH * SoH
C3	<i>H. zea</i> em algodão * <i>H. zea</i> em soja	AIZ * SoZ
C4	<i>H. armigera</i> em algodão * híbrido em Algodão	AIA * AIH
C5	<i>H. armigera</i> em algodão * <i>H. zea</i> em algodão	AIA * AIZ
C6	Híbrido em algodão * <i>H. zea</i> em algodão	AIH * AIZ
C7	<i>H. armigera</i> em soja * híbrido em soja	SoA * SoH
C8	<i>H. armigera</i> em soja * <i>H. zea</i> em soja	SoA * SoZ
C9	Híbrido em soja * <i>H. zea</i> em soja	SoH * SoZ

Com o objetivo de responder as nossas perguntas com melhor clareza, as comparações foram divididas em 3 grandes grupos: (i) foi avaliada cada linhagem nos dois diferentes hospedeiros para saber o efeito do hospedeiro sobre a linhagem; (ii)

foi avaliada as três linhagens no hospedeiro algodão; e (iii) foi avaliada as três linhagens no hospedeiro soja. As comparações entre grupos foram realizadas com as listas de genes diferencialmente expressos utilizando o programa Venny v.2.1 (Oliveros, 2007-2015) e os heatmap foram construídos com os valores de expressão  $\log_2$  transformados ( $\log_2 \text{fold\_change}$ ) utilizando o programa Heatmapper (Babicki et al., 2016).

Para a fase de anotação funcional que corresponde a identificação e designação dos transcritos expressos foi utilizado o programa BLAST2GO (Conesa et al., 2005). Por último, as análises de “Enriquecimento” onde foi determinado o grupo funcional predominante em cada conjunto de tratamentos comparados foi realizada no programa Omics Box.

### **5.2.3 Validação de genes candidatos por qPCR**

Com o intuito de validar a expressão diferencial obtida entre tratamentos obtidas na análise de transcriptoma foi criada uma lista de genes candidatos com expressão diferente entre os tratamentos. Os genes utilizados foram escolhidos de acordo as respostas obtidas no grupo funcional, além disso, alguns foram reportados previamente na literatura como possíveis genes envolvidos em rotas digestivas e na detoxificação de compostos tóxicos da soja e do algodão (Tabela 5.2).

Utilizando como fita molde a sequência dos transcritos obtidos do nosso sequenciamento, foram desenhados primers/iniciadores na ferramenta de construção de primers do NCBI (Primer BLAST). Os primers precisavam cumprir as seguintes características: amplificar uma região entre 100-120 pares de bases e possuir uma temperatura de anelamento variando entre 58-60°C. Além disso, cada conjunto de primers foi analisado no programa idtdna na área "Oligo analyzer" e avaliados os parâmetros *Hairpin* > -2, *Selfdimer* > -5 e *Heterodimer* > -5. Após a confecção dos primers foi realizada uma PCR convencional com diferentes concentrações de primers e diferentes temperaturas de anelamento com o intuito de alcançar as melhores condições de PCR a serem utilizadas nas análises de qPCR.

**Tabela 5.2.** Primers utilizados na validação do transcriptoma, as sequencias dos iniciadores estão no sentido 5' – 3'.

Nome do Gene	Primer F (5' – 3')	Primer R (5' – 3')
P450 CYP18A1	TGT GTG ATC TCA TGT ATG TTG CG	CGC TCT AGA CTA GTT GCT GGT
Tyrosine hydroxylase	GCC GCT CTC TTG TCC TCA AT	CCT GGT AGG GTT GCA CAG AG
Alcohol dehydrogenase	CCC CCG CCA ACA TAG ACT AC	ACC GTC TTG CTA TTC GCC TT
Glyceraldehyde-3-phosphate	GAA GGG CAT CCT CGA CTA CA	GAA GGG CAT CCT CGA CTA CA

Para o qPCR, foi amplificado os genes nos 6 tratamentos utilizados no transcriptoma, com três repetições biológicas e duas repetições técnicas de cada amostra. Inicialmente, foram quantificadas e normalizadas amostras de RNA numa concentração de 2 ng/μg, a reação de transcriptase reversa foi feita com o Kit ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega®), seguindo as recomendações do fabricante, para confecção do cDNA que foi utilizado nas reações de qPCR.

Na reação para cada um dos genes foram utilizados 2 μL de cDNA, 3,8 μL de Água, 0,3 μL de cada um dos primers e 3,6 μL de *Sybr Green*, o programa de amplificação consistiu num tempo inicial de 2 minutos de pré-aquecimento a 50°C, 10 minutos para desnaturação inicial a 95°C, 35 ciclos a 95°C por 0,25 minuto, 60°C por 0,5 minuto, para a curva de melt uma etapa inicial de 95°C por 0,25 minuto, 60°C por 1 minuto e 95°C por 0,25 minuto, e para finalizar a reação a 26°C por 2 minutos. As análises do qPCR foram realizadas no programa LinReg.

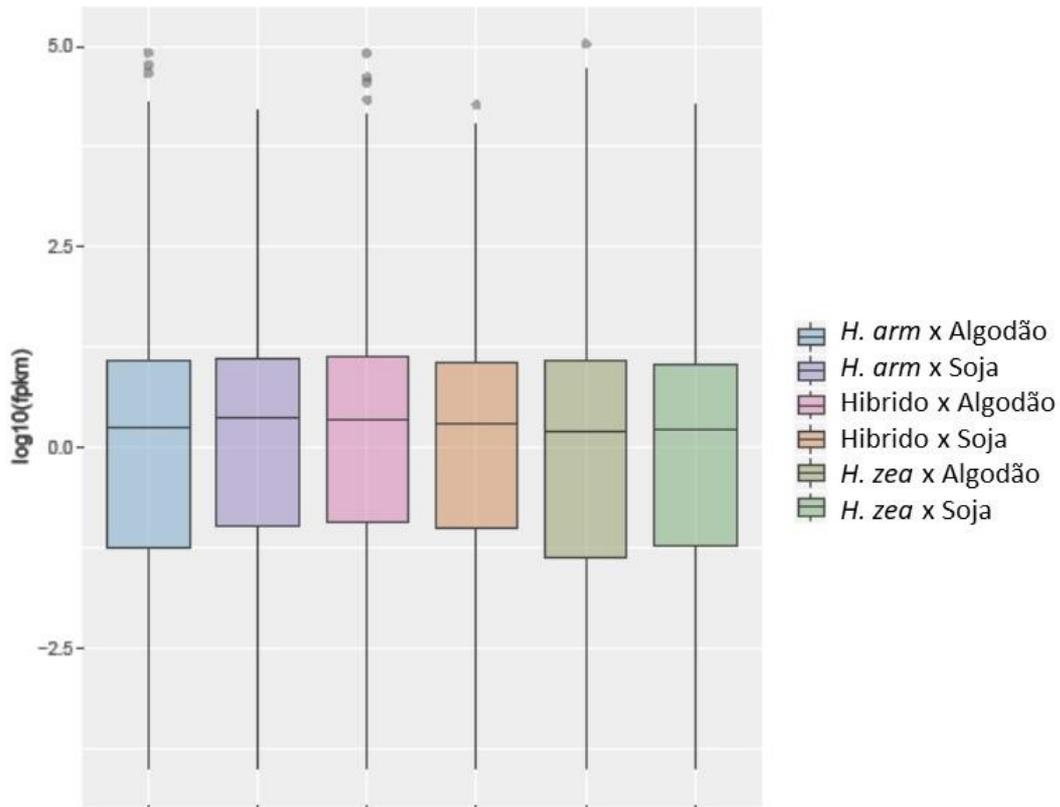
### 5.3 RESULTADOS

As amostras pertencentes a todos os tratamentos foram sequenciadas satisfatoriamente. Quando calculado o valor médio de milhões de leituras obtidas em cada uma das condições, os resultados foram homogêneos variando entre 16,63 M para o tratamento *H. armigera* em algodão e 18,23 M para o tratamento híbrido em soja (Tabela 5.3).

**Tabela 5.3.** Resumo das leituras obtidas, os valores são em milhões de sequências pareadas em cada tratamento

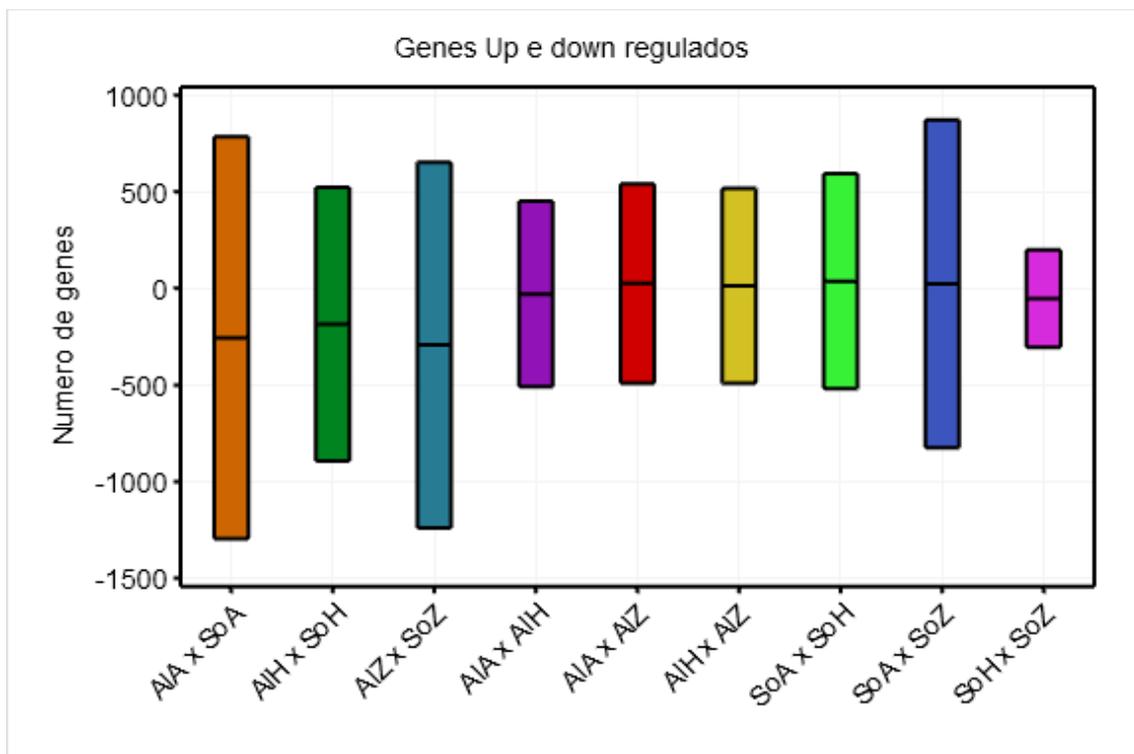
<b>Tratamento</b>	<b>Número de sequências (M)</b>
<i>H. armigera</i> em algodão	16,63
<i>H. armigera</i> em soja	18,10
Híbrido em algodão	17,13
Híbrido em soja	18,23
<i>H. zea</i> em algodão	17,00
<i>H. zea</i> em soja	17,96

Após trinar as sequências, para realizar o alinhamento foram utilizados diferentes programas e foi determinado que o Tophat utilizando como genoma de referência o de *H. armigera* foi aquele que apresentou os melhores resultados. Em seguida os arquivos com todas as *reads* foram mapeados, alinhados e montados no programa cuffdiff. Posteriormente, foi calculado o nível de expressão em cada um dos tratamentos, se algum dos tratamentos tivesse um valor diferente dos demais, esse fragmento poderia ser detectado como um erro de alinhamento. Porém, no nosso resultado, em todos os tratamentos os valores foram semelhantes e nenhum apresentou um número muito diferente de leituras quando comparados entre eles, refletindo que o número de leituras mapeadas foi similar entre tratamentos (Figura 5.2).



**Figura 5.2.** Box plot da distribuição dos FPKM para cada um dos tratamentos

O número total de genes expressos (*Up* e *Down regulated*) variou entre tratamentos (Figura 5.3). Um total de 2080 genes foram encontrados com diferenças de expressão quando comparamos *H. armigera* em algodão \* *H. armigera* em soja, seguido por 1892 genes entre *H. zea* em algodão \* *H. zea* em soja, 1659 genes entre *H. armigera* em soja \* *H. zea* em soja, 1415 genes entre híbrido em algodão \* híbrido em soja, 1112 genes em *H. armigera* em soja \* híbrido em soja, 1033 genes entre *H. armigera* em algodão \* *H. zea* em algodão, 1010 genes na comparação híbrido em algodão \* *H. zea* em algodão, 959 genes entre *H. armigera* em algodão \* híbrido em algodão e o menor número correspondente a 504 genes entre híbrido em soja \* *H. zea* em soja (Figura 5.3).



**Figura 5.3.** Número de genes totais com alta (*up*) e baixa (*down*) expressão em cada um dos tratamentos.

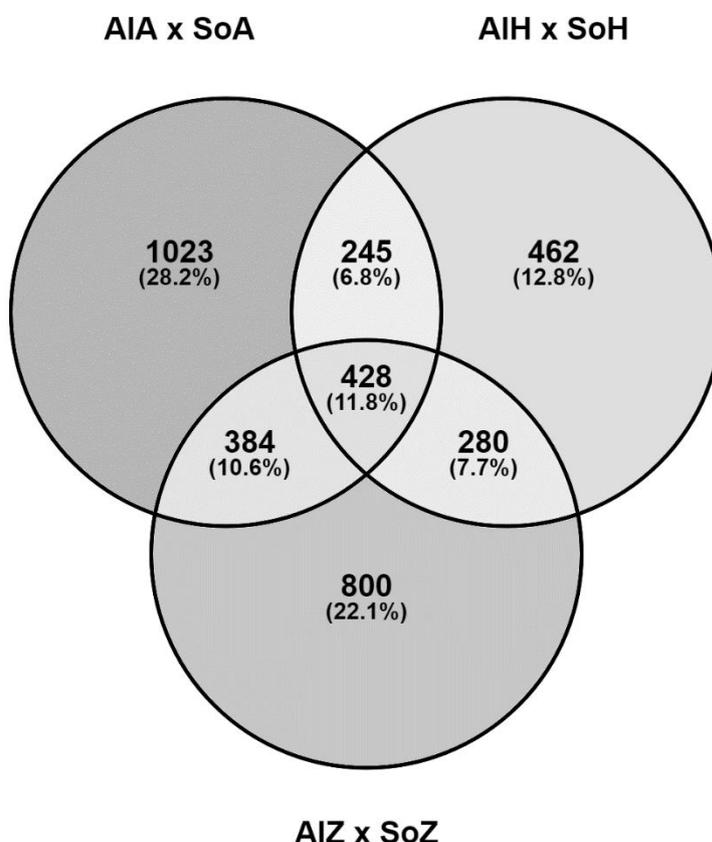
A proporção de genes significativos ( $P \leq 0,05$ , t-test; expressão relativa  $> 2$ ) com sobre ou baixa expressão entre as diferentes comparações também variou entre comparações dos tratamentos (Tabela 5.3). A comparação entre tratamentos que apresentou uma maior quantidade de genes com alta expressão foi *H. armigera* em soja \* *H. zea* em soja com um total de 873 genes sobre expressos, e a que apresentou um maior número de genes baixa expressão foi *H. armigera* em algodão \* *H. armigera* em soja sendo 1295 em total (Tabela 5.4).

**Tabela 5.4.** Número de genes com alta e baixa expressão em cada um dos tratamentos. Os valores correspondem à somatória de os genes com  $\log_2$  (*fold\_change*) positivo no caso da alta expressão e baixa quando o resultado era negativo.

<b>Tratamentos comparados</b>	<b>Genes de alta expressão</b>	<b>Genes de baixa expressão</b>
<i>H. armigera</i> em algodão * <i>H. armigera</i> em soja	785	1295
Híbrido em algodão * híbrido em soja	524	891
<i>H. zea</i> em algodão * <i>H. zea</i> em soja	655	1237
<i>H. armigera</i> em algodão * híbrido em algodão	452	507
<i>H. armigera</i> em algodão * <i>H. zea</i> em algodão	543	490
Híbrido em algodão * <i>H. zea</i> em algodão	520	490
<i>H. armigera</i> em soja * híbrido em soja	594	518
<i>H. armigera</i> em soja * <i>H. zea</i> em soja	873	822
Híbrido em soja * <i>H. zea</i> em soja	201	303

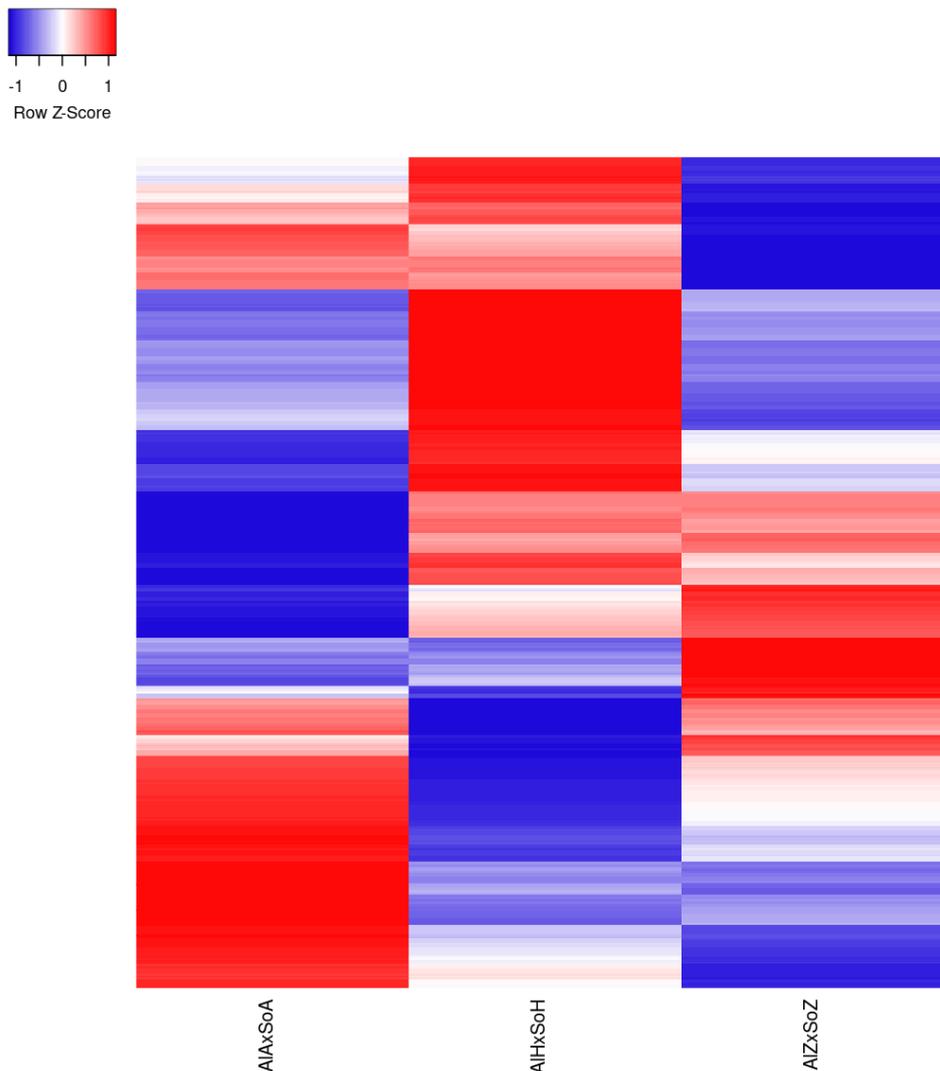
### 5.3.1 Comparação entre tratamentos com foco nas linhagens

Nas análises da expressão diferencial quando foram comparadas as três linhagens entre elas se alimentando de algodão e de soja, foram encontrados 428 genes que foram expressos em comum entre todos os tratamentos (Figura 5.4). Os tratamentos de *H. armigera* se alimentando de algodão e de soja apresentaram 1023 transcritos exclusivos de eles superando aos transcritos de *H. zea* se alimentando de algodão e de soja que apresentaram 800 e aos híbridos que por sua vez tiveram 462 sendo o grupo com o menor número de transcritos expressos exclusivos (Figura 5.4).



**Figura 5.4.** Diagrama de Venn representando o número de transcritos diferencialmente expressos comparando os indivíduos de *H. armigera*, *H. zea* e híbridos se alimentando de algodão e soja. *H. armigera* em algodão (AIA), *H. armigera* em soja (SoA), *H. zea* em algodão (AIZ), *H. zea* em soja (SoZ), híbrido em algodão (AIH) e híbrido em soja (SoH).

Quando foram avaliados os valores do log2 obtidos da proporção de cada tratamento dentro de cada comparação tendo como foco a separação entre linhagens, foi determinado que não existe um padrão de expressão dos transcritos (*up or down*) comuns para as três linhagens (Figura 5.5). Por exemplo, quando os transcritos estão em *up* em *H. armigera*, alguns deles encontram-se em *H. zea* como *up* também, porém são *down* na linhagem híbrida. Com relação aos híbridos eles tiveram transcritos *up regulated* em regiões em que nenhum dos seus progenitores apresentou essa característica sendo esses mesmos os de maior valor de log2 apresentaram na escala geral (Figura 5.5).



**Figura 5.5** Heatmap com os valores do log<sub>2</sub> dos transcritos diferencialmente expressos comparando os indivíduos de *H. armigera*, *H. zea* e híbridos se alimentando de algodão e soja. *H. armigera* em algodão (AIA), *H. armigera* em soja (SoA), *H. zea* em algodão (AIZ), *H. zea* em soja (SoZ), híbrido em algodão (AIH) e híbrido em soja (SoH).

Destacando os transcritos que apresentaram os maiores ou menores valores de log<sub>2</sub> (*up* e *down*) de cada grupo determinamos que em sua maioria encontrasse ligados a processos fisiológicos de alimentação, crescimento e defesa (Tabela 5.5). Na comparação dos transcritos entre as linhagens de *H. armigera* teve como resposta em algodão genes com incidência na detoxificação como *Molting carboxypeptidase A*, *Fatty acyl-CoA reductase*, *Glucose-methanol-choline oxidoreductase* e em soja respostas ligadas a *Serine protease*, *Trypsin* e *Carboxylesterase*.

O híbrido em algodão teve resposta das *UDP-glucosyltransferase* e do *Alcohol dehydrogenase 2*, em soja teve como resposta a *Alpha-tocopherol transfer protein*. *H. zea* em algodão teve expressão dos transcritos de *Very high density lipoprotein*. Nas três linhagens quando o alimento foi soja o mecanismo em comum foi a ativação da *Carboxylesterase*.

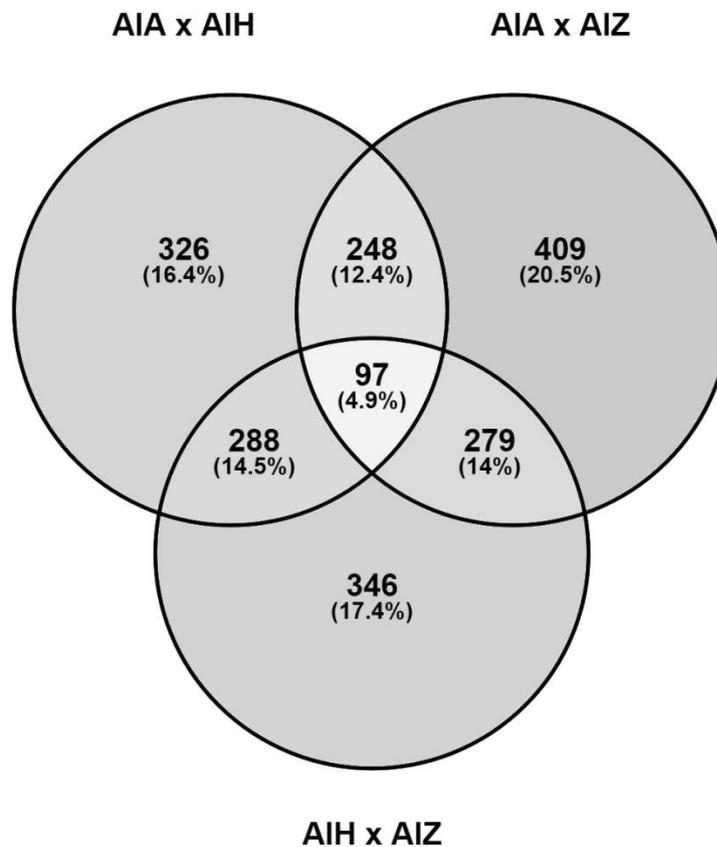
**Tabela 5.5.** Transcritos com os maiores e menores valores de log2 (*fold\_change*) em cada uma das comparações. Todos eles apresentaram diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ , t-test; expressão relativa  $> 2$ ).

<b><i>H. armigera</i> em algodão x <i>H. armigera</i> em soja</b>	
<b>Maiores valores nos transcritos</b>	<b>Menores valores nos transcritos</b>
<b>Up</b>	<b>Down</b>
<i>Molting carboxypeptidase A</i>	<i>Serine protease</i>
<i>Cuticle Protein</i>	<i>Trypsin (TLP)</i>
<i>Fatty acyl-CoA reductase</i>	<i>Alpha-amylase (GH13Amy-2)</i>
<i>Glucose-methanol-choline oxidoreductase</i>	<i>Protease (SerProx-4)</i>
<i>Chemosensory protein 15</i>	<i>Carboxylesterase</i>
<b>Híbrido em algodão x híbrido em soja</b>	
<i>UDP-glucosyltransferase</i>	<i>Cuticle protein CPH36</i>
<i>Lipoprotein</i>	<i>Alpha-tocopherol transfer protein</i>
<i>Alcohol dehydrogenase 2</i>	<i>H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 1</i>
<i>Fatty acid binding protein</i>	<i>Insect cuticle protein</i>
<i>Ecdysone oxidase</i>	<i>Carboxylesterase</i>
<b><i>H. zea</i> em algodão x <i>H. zea</i> em soja</b>	
<i>Very high density lipoprotein</i>	<i>Ecdysteroid kinase</i>
<i>Lactase-phlorizin hydrolase</i>	<i>Carboxyl/choline esterase</i>
<i>Growth/differentiation factor 8</i>	<i>Peptidoglycan recognition protein B</i>
<i>HpF2B chymotrypsinogen</i>	<i>Moricin (Mor)</i>
<i>Neutral lipase</i>	<i>Carboxylesterase</i>

### 5.3.2 Comparação entre tratamentos com foco no hospedeiro algodão

Realizamos as comparações entre os diferentes tratamentos tendo como parâmetro comum a dieta de folhas de algodão e determinamos que existem 97 genes que foram comuns a todos os tratamentos o que corresponde unicamente ao 4,9% do total de genes expressos (Figura 5.6). O tratamento *H. armigera* em algodão \* *H. zea* em algodão foi o que maior número de genes exclusivos, apresentou 409 no total,

seguido por híbrido em algodão \* *H. zea* em algodão com 346 e *H. armigera* em algodão \* híbrido em algodão com 326 (Figura 5.6).

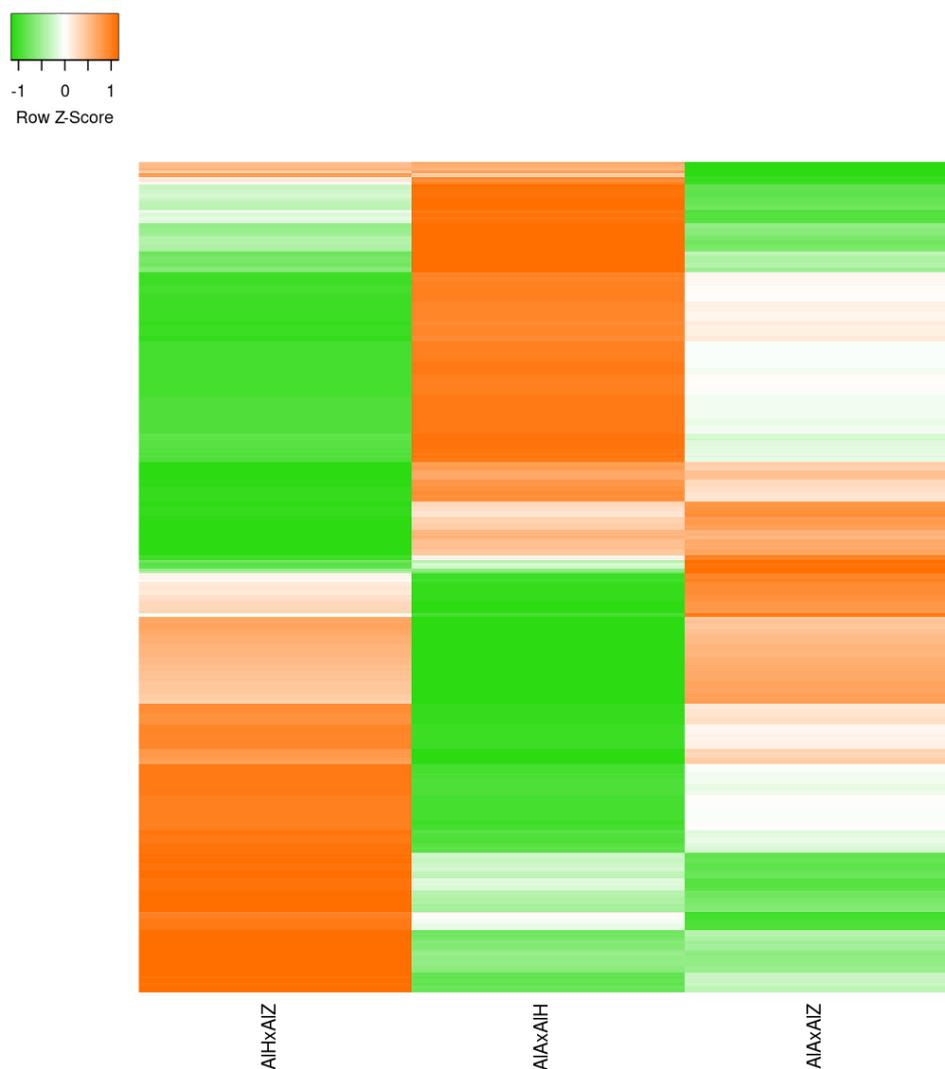


**Figura 5.6.** Diagrama de Venn representando o número de transcritos diferencialmente expressos, comparando os indivíduos de *H. armigera*, *H. zea* e híbridos alimentando-se exclusivamente de algodão. *H. armigera* em algodão (AIA), *H. zea* em algodão (AIZ) e híbrido em algodão (AIH).

Nos transcritos *up* e *down regulated* o resultado de maior relevância foi o apresentado pelo híbrido, já que na comparação com qualquer um dos seus progenitores os genes se expressaram de maneira *up* ou *down regulated*. Porém excetuando os transcritos representados nas linhas superiores do heatmap a resposta foi oposta quando comparado com *H. armigera* a quando comparado com *H. zea* (Figura 5.7).

Na coluna onde encontram representados os transcritos em comum das comparações entre os tratamentos *H. armigera* em algodão x *H. zea* em algodão existem espaços em branco em relação às outras comparações o que representa um reduzido número de transcritos comuns entre estes dois tratamentos (Figura 5.7).

Essa falta de transcritos em comum pode ter sido ocasionada pelo fato das duas espécies diferirem de maneira significativa no seu desempenho e viabilidade quando alimentadas com o hospedeiro algodão (capítulo 4).



**Figura 5.7** Heatmap com os valores do log2 dos transcritos diferencialmente expressos comparando os indivíduos de *H. armigera*, *H. zea* e híbridos se alimentando de algodão. *H. armigera* em algodão (AIA), *H. zea* em algodão (AIZ) e híbrido em algodão (AIH).

Quando analisamos os transcritos *up* e *down* regulated (Tabela 5.6) nas comparações de *H. armigera* e o híbrido alimentando-se de algodão obtivemos como resposta que *H. armigera* sobre expressa transcritos que tem relação com genes que influenciam no fortalecimento da cutícula e a muda além dos mecanismos de defesa

como a *Tyrosine-protein phosphatase* e a *Alpha-tocopherol transfer protein*. O mesmo acontece quando comparada com *H. zea*. O híbrido tem como resposta a ativação das *Serine proteases* e as *chymotrypsin*, além de genes ligados a detoxificação.

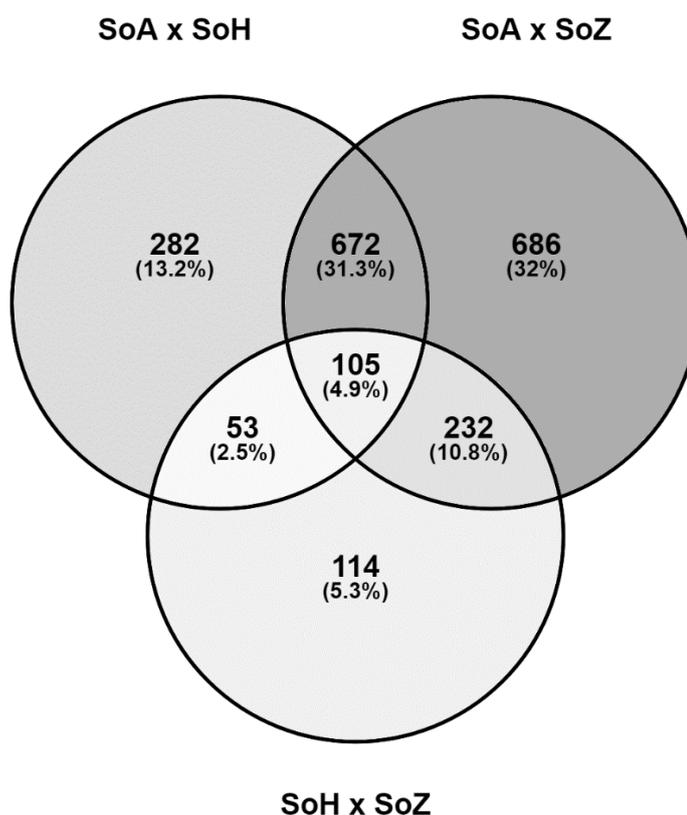
*Helicoverpa zea* quando comparada a *H. armigera* tem ativação de compostos de defesa e assimilação, porém não apresenta respostas ligadas a muda ou a cutícula. Quando comparamos o híbrido com *H. zea*, o híbrido tem um comportamento semelhante ao apresentado por *H. armigera* utilizando transcritos ligados a muda e a defesa como resposta.

**Tabela 5.6.** Transcritos com os maiores e menores valores de  $\log_2$  (*fold\_change*) em cada uma das comparações alimentados com algodão. Todos eles apresentaram diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ , t-test; expressão relativa  $> 2$ ).

<b>Algodão</b>	
<b><i>H. armigera</i> x Híbrido</b>	
<b>Maiores valores nos transcritos</b>	<b>Menores valores nos transcritos</b>
<b>Up</b>	<b>Down</b>
<i>Dirigent protein 10</i>	<i>Neutral lipase</i>
<i>cuticle protein</i>	<i>HpF2A chymotrypsin</i>
<i>Alpha-tocopherol transfer protein</i>	<i>Insect intestinal lipase</i>
<i>Molting carboxypeptidase A</i>	<i>Serine proteases</i>
<i>Tyrosine-protein phosphatase</i>	<i>Triacylglycerol lipase</i>
<b><i>H. armigera</i> x <i>H. zea</i></b>	
<i>Chemosensory Proteins</i>	<i>Fructosidase (GH32FruA-1)</i>
<i>Cuticular protein</i>	<i>Serine proteases</i>
<i>Moricin (Mor)</i>	<i>Hax10 carboxyl/choline esterase</i> <i>CCE016c</i>
<i>Tyrosine-protein phosphatase</i>	<i>Niemann-Pick type C2 protein Npc2-t01</i>
<i>Cytochrome P450 337B3v1</i>	<i>Neutral lipase (Lipn013)</i>
<b>Híbrido x <i>H. zea</i></b>	
<i>Chymotrypsinogen</i>	<i>Cuticle protein</i>
<i>KGHa033C10 carboxyl/choline esterase</i>	<i>Dirigent protein 10</i>
<i>Moricin (Mor)</i>	<i>keratin, type I cytoskeletal 10</i>
<i>Serine proteases</i>	<i>Alpha-tocopherol transfer protein</i>
<i>HaFLS01712 amylase</i>	<i>Hax10 carboxyl/choline esterase</i>

### 5.3.3 Comparação entre tratamentos com foco no hospedeiro soja

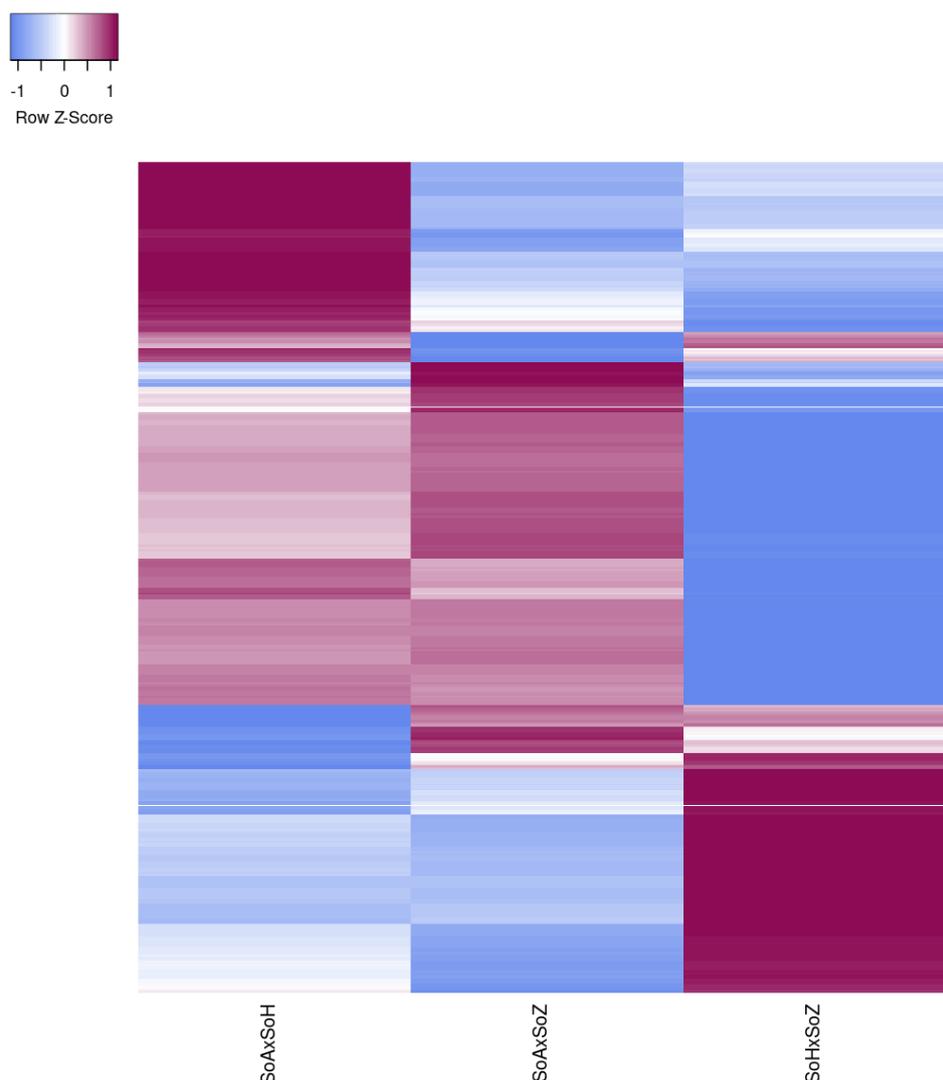
Quando os tratamentos comparados foram os que tinham como base a fonte de alimento soja, os transcritos comuns a todas as amostras foram 105 (Figura 5.8). Quando comparadas exclusivamente *H. armigera* em soja \* híbrido em soja com *H. armigera* em soja \* *H. zea* em soja o número de transcritos compartilhados foi de 672 sendo a comparação com maior número em comum. Já a comparação entre *H. armigera* em soja \* híbrido em soja com híbrido em soja \* *H. zea* em soja foi a que teve menor número de transcritos semelhantes sendo 53, que correspondem ao 2,5% do total dos avaliados nessa condição. A comparação com maior número de transcritos próprios foi *H. armigera* em soja \* *H. zea* em soja com 686, seguidos por *H. armigera* em soja \* híbrido em soja com 282 e por último híbrido em soja \* *H. zea* em soja com 114 (Figura 5.8).



**Figura 5.8.** Diagrama de Venn representando o número de transcritos diferencialmente expressos, comparando os indivíduos de *H. armigera*, *H. zea* e híbridos alimentando-se exclusivamente de soja. *H. armigera* em soja (SoA), *H. zea* em soja (SoZ) e híbrido em soja (SoH).

Nos transcritos expressos em cada condição os tratamentos que correspondem a *H. armigera* em soja \* híbrido em soja com *H. armigera* em soja e *H. zea* em soja apresentaram vários conjuntos de transcritos semelhantes *up regulated*. Esses mesmos foram identificados como *down regulated* quando a condição foi o híbrido em soja \* *H. zea* em soja (Figura 5.9). O conjunto correspondente a *H. armigera* em soja \* híbrido em soja teve ausência de alguns transcritos que correspondem aos catalogados como 0 (dispostos na parte inferior da coluna), esses mesmos transcritos na comparação *H. armigera* em soja \* *H. zea* em soja apresentaram valores *down regulated*, e na comparação híbrido em soja \* *H. zea* em soja teve genes *up regulated* (Figura 5.9).

Comparando os transcritos expressos quando avaliamos o hospedeiro de algodão e o hospedeiro de soja determinamos que quando alimentadas de algodão existem transcritos presentes de maneira *up* e *down regulated* em pelo menos duas das comparações. Porém existem muitos inexistentes na terceira comparação, a sua vez quando o hospedeiro é soja existem poucos transcritos que não são comuns aos três tipos de comparação (Figura 5.9).



**Figura 5.9** Heatmap com os valores do log2 dos transcritos diferencialmente expressos comparando os indivíduos de *H. armigera*, *H. zea* e híbridos se alimentando de soja. *H. armigera* em soja (SoA), *H. zea* em soja (SoZ) e híbrido em soja (SoH).

Avaliando os maiores e menores valores dos transcritos *up* e *down regulated* no hospedeiro soja (Tabela 5.7) na comparação entre *H. armigera* e o híbrido foram expressos em maior quantidade em *H. armigera* transcritos relacionados a *serine protease* e *cuticle protein*. Esta mesma resposta foi observada quando *H. armigera* foi comparada com *H. zea*.

Quando avaliamos a resposta do híbrido com relação a *H. zea* este apresentou como resposta a alta produção de transcritos de genes que tinham relação com *serine protease*, o citocromo P450 e as *UDP-glucosyltransferase*. *H. zea* nas

comparações com *H. armigera* e o híbrido teve aumento nos transcritos das serine protease e dos mecanismos do citocromo P450.

**Tabela 5.7.** Transcritos com os maiores e menores valores de log<sub>2</sub> (*fold\_change*) em cada uma das comparações alimentados com soja. Todos eles apresentaram diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ , t-test; expressão relativa  $> 2$ ).

<b>Soja</b>	
<b><i>H. armigera</i> x Híbrido</b>	
<b>Maiores valores nos transcritos</b>	<b>Menores valores nos transcritos</b>
<b>Up</b>	<b>Down</b>
<i>Chemosensory receptor 8</i>	<i>Alpha-tocopherol transfer protein</i>
<i>Serine protease</i>	<i>Laccase-4</i>
<i>Cuticle protein</i>	<i>Juvenile hormone acid methyltransferase</i>
<i>Chymotrypsin</i>	<i>Carboxypeptidase (Cpep-2)</i>
<i>Mucin-2</i>	<i>Venom carboxylesterase-6</i>
<b><i>H. armigera</i> x <i>H. zea</i></b>	
<i>Chemosensory receptor 8</i>	<i>HMG176</i>
<i>Cuticle protein</i>	<i>Serine protease</i>
<i>Glucose oxidase</i>	<i>Molt-regulating transcription factor HaHR3</i>
<i>Growth-blocking peptide</i>	<i>Cytochrome CYP338A2</i>
<i>Chemosensory Protein (CSP2)</i>	<i>Alpha-tocopherol transfer protein</i>
<b>Híbrido x <i>H. zea</i></b>	
<i>Serine protease</i>	<i>Molt-regulating transcription factor HaHR3</i>
<i>Glucose-methanol-choline oxidoreductase</i>	<i>P450 CYP321B1</i>
<i>Glucose Oxidase</i>	<i>HMG176</i>
<i>Cytochrome P450 337B3v1</i>	<i>MD-2-related lipid-recognition</i>
<i>UDP-glucosyltransferase</i>	<i>Insect cuticle protein</i>

#### **5.3.4 Anotação funcional e determinação de rotas metabólicas deferentes**

Nas análises de enriquecimento foram determinadas as rotas metabólicas dos conjuntos de genes que apresentavam uma expressão diferente entre tratamentos (Tabela 5.8). Nos tratamentos quando são comparados *H. armigera* em algodão \* *H. armigera* em soja, *H. zea* em algodão \* *H. zea* em soja, *H. armigera* em algodão \* híbrido em algodão e o híbrido em algodão \* *H. zea* em algodão obtivemos como resposta um número superior a 16 grupos gênicos funcionais (Tabela 5). Já quando comparamos *H. armigera* em soja \* híbrido em soja e também híbrido em algodão \*

híbrido em soja foram detectados genes que tinham relação com a atividade catalítica, com a atividade das oxidoreductases e no processo de oxidação redução. Desta forma, utilizando essas rotas metabólicas como base foram escolhidos genes que sirvam como candidatos para fazer a validação do transcriptoma.

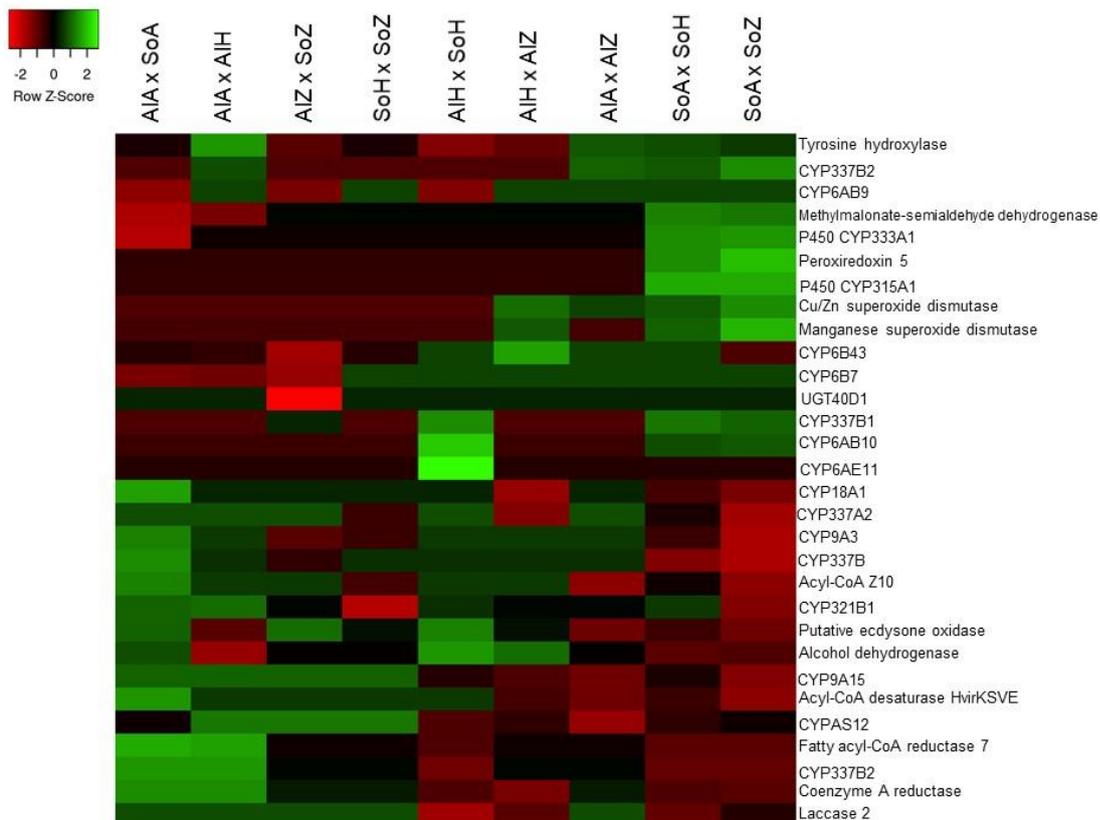
**Tabela 5.8.** Grupos funcionais responsáveis por processos metabólicos em cada uma das comparações realizadas entre tratamentos

<b>Tratamentos comparados</b>	<b>Número de grupos funcionais</b>
<i>H. armigera</i> em algodão * <i>H. armigera</i> em soja	31
Híbrido em algodão * híbrido em soja	2
<i>H. zea</i> em algodão * <i>H. zea</i> em soja	31
<i>H. armigera</i> em algodão * híbrido em algodão	31
<i>H. armigera</i> em algodão * <i>H. zea</i> em algodão	0
Híbrido em algodão * <i>H. zea</i> em algodão	16
<i>H. armigera</i> em soja * híbrido em soja	2
<i>H. armigera</i> em soja * <i>H. zea</i> em soja	3
Híbrido em soja * <i>H. zea</i> em soja	0

Utilizando as análises das rotas metabólicas como base e complementando com genes anteriormente reportados na literatura com possível incidência nos processos de detoxificação dos compostos tóxicos de algodão e soja, nós realizamos uma comparação do log2 desses transcritos e obtivemos como resultado a existência de respostas diferentes entre as linhagens (Figura 5.10).

Nas comparações entre tratamentos obtivemos dois grupos que apresentaram uma maior semelhança como resposta, o primeiro deles foi quando comparamos as condições *H. armigera* em algodão x *H. armigera* em soja com o grupo *H. armigera* em algodão x híbrido em algodão. A resposta similar sugere uma expressão semelhante (*up* e *down regulated*) como resposta ao alimento algodão. O segundo grupo corresponde a comparação entre *H. armigera* em soja x híbrido em soja com *H. armigera* em soja x *H. zea* em soja, o padrão de expressão semelhante entre tratamentos corresponde ao conjunto de respostas estimuladas pelo alimento soja.

Este resultado nos permite inferir a existência de respostas diferentes e de mecanismos de detoxificação diferentes como resposta a cada um dos hospedeiros ofertados. Além disso, podemos concluir que este grupo de transcritos pertencentes a genes de detoxificação e a certos processos fisiológicos são diretamente estimulados como resposta ao consumo de substâncias favoráveis ou desfavoráveis presentes nos hospedeiros ofertados aos insetos (Figura 5.10).

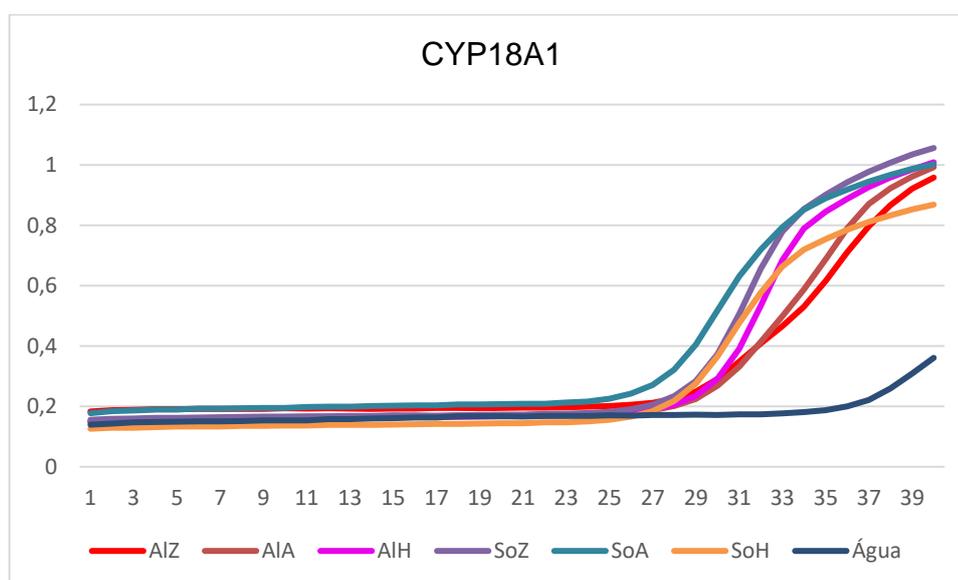


**Figura 5.10** Heatmap com os valores do log<sub>2</sub> da expressão dos genes escolhidos como candidatos em cada uma das comparações entre tratamentos. *H. armigera* em algodão (AIA), *H. armigera* em soja (SoA), *H. zea* em algodão (AIZ), *H. zea* em soja (SoZ), híbrido em algodão (AIH), híbrido em soja (SoH).

### 5.3.5 Validação de genes candidatos por qPCR

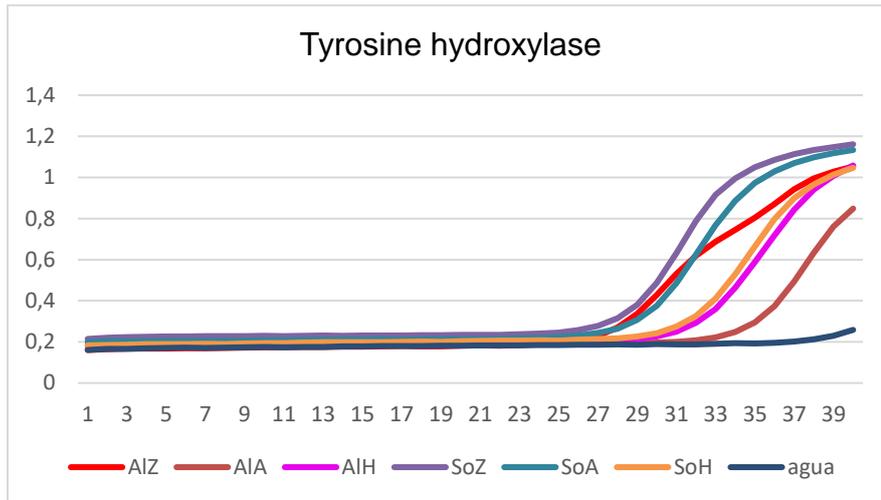
Com o intuito de conferir os resultados do transcriptoma e das análises da expressão diferencial dos transcritos, nós utilizamos a técnica de PCR em tempo real (qPCR) para avaliar o nível de expressão de três genes com intervenção direta nas rotas metabólicas (Figuras 5.11, 5.12 e 5.13) e um gene constitutivo (Figura 5.14). A quantificação mediante qPCR é determinada a quantidade inicial da fita molde através do número de ciclos requeridos para sua replicação mediante a avaliação do crescimento exponencial dos fragmentos amplificados. Assim, um número menor de

ciclos requeridos para a amplificação de um determinado transcrito pode ser traduzido como a presença em maior quantidade no tempo inicial. Para o gene CYP18A1 quando a amostra pertencia a *H. zea* em soja a quantidade de cópias gene foi maior em comparação com os outros tratamentos (Figura 5.11). A presença deste gene em todos os tratamentos com variação entre eles ratifica os resultados das análises do transcriptoma e do log2 da expressão diferencial.



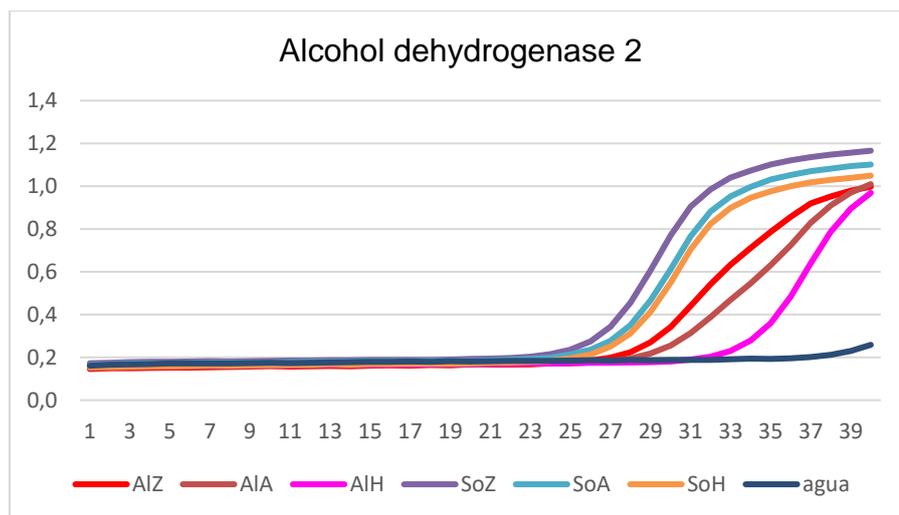
**Figura 5.11.** Quantificação por qPCR do gene CYP18A1. *H. armigera* em algodão (AIA), *H. armigera* em soja (SoA), *H. zea* em algodão (AIZ), *H. zea* em soja (SoZ), híbrido em algodão (AIH) e híbrido em soja (SoH).

No fragmento correspondente ao gene *Tyrosine hydroxylase* escolhido por apresentar entre os tratamentos respostas *up* e *down regulated* quando comparados entre eles, foi determinado que existia uma maior presença do gene na fita molde quando *H. zea* se alimentou com soja e com algodão, posteriormente *H. armigera* se alimentando de soja (Figura 5.12). A resposta dos híbridos aos dois alimentos foi semelhante, por último o tratamento com menos quantidade foi *H. armigera* algodão.



**Figura 5.12.** Quantificação por qPCR do gene Tyrosine hydroxylase. *H. armigera* em algodão (AIA), *H. armigera* em soja (SoA), *H. zea* em algodão (AIZ), *H. zea* em soja (SoZ), híbrido em algodão (AIH) e híbrido em soja (SoH).

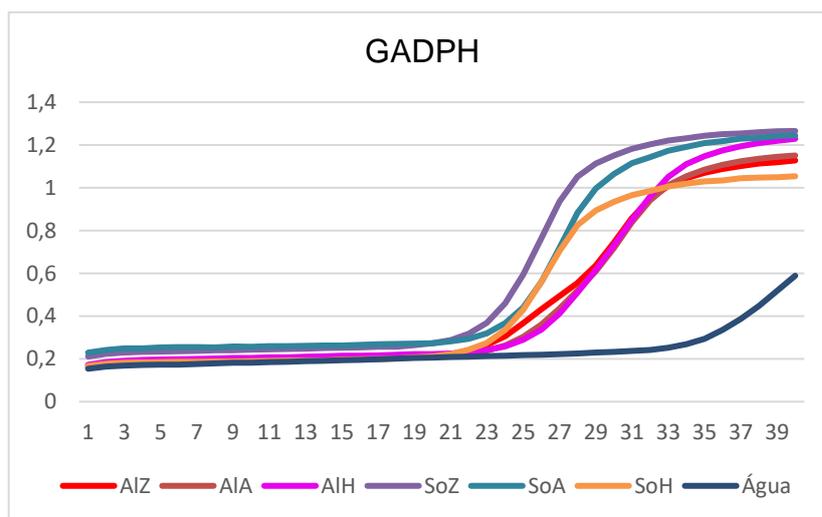
No gene *Alcohol dehydrogenase 2* os resultados obtidos apresentaram diferença entre os tratamentos dependendo do alimento ofertado. Sendo os indivíduos de *H. zea*, *H. armigera* e o híbrido em soja os que apresentaram maior quantidade inicial de transcritos deste gene. Entre os indivíduos alimentados com algodão o de maior quantidade foi *H. zea*, seguido por *H. armigera* e por último o híbrido (Figura 5.13).



**Figura 5.13.** Quantificação por qPCR do gene *Alcohol dehydrogenase 2*. *H. armigera* em algodão (AIA), *H. armigera* em soja (SoA), *H. zea* em algodão (AIZ), *H. zea* em soja (SoZ), híbrido em algodão (AIH) e híbrido em soja (SoH).

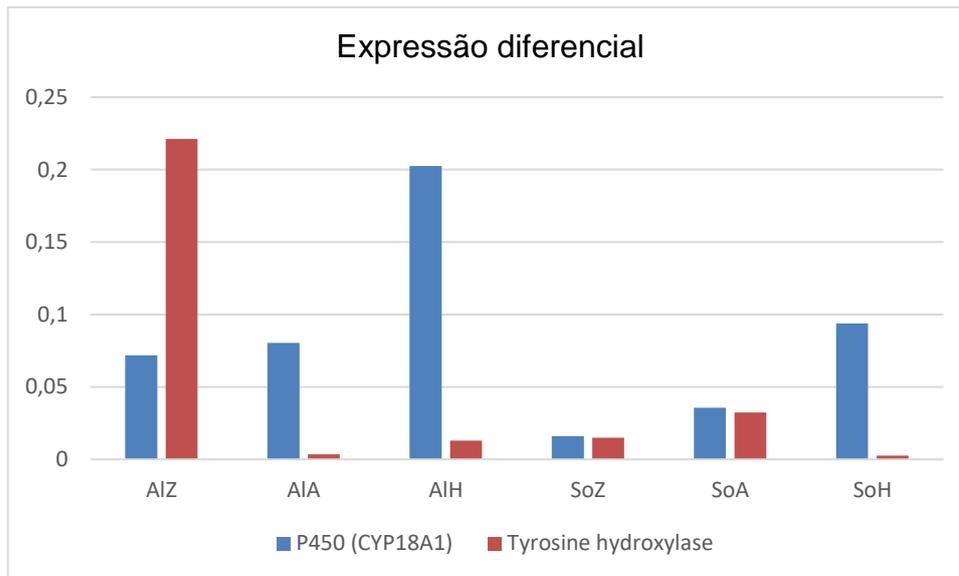
Como gene constitutivo foi escolhido o *Glyceraldehyde-3-phosphate*, que foi reportado por Gog et al., 2014 em *H. zea*. A amplificação de um gene constitutivo

comprova a existência de RNA e posteriormente de DNA de qualidade e ele serve para normalizar a quantificação da expressão dos transcritos. A eleição de um gene previamente reportado em *H. zea* teve além disso como objetivo comprovar a eficiência das análises já que o alinhamento inicial utilizou como genoma de referência o de *H. armigera*.



**Figura 5.14.** Quantificação por qPCR do gene Glyceraldehyde-3-phosphate. *H. armigera* em algodão (AIA), *H. armigera* em soja (SoA), *H. zea* em algodão (AIZ), *H. zea* em soja (SoZ), híbrido em algodão (AIH) e híbrido em soja (SoH).

Utilizando os valores dos genes expressos, a eficiência dos primers utilizados e eliminando os ruídos das amplificações a traves da normalização com o gene constitutivo foi determinada a quantidade inicial de cada transcrito (Figura 5.15). Como resultado foi obtido que o gene P450 CYP18A1 apresentou uma quantidade maior de transcritos no tratamento de híbrido alimentado de algodão, seguido do híbrido alimentado de soja. Já o gene *tyrosine hydroxylase* foi maior no tratamento de *H. zea* alimentada com algodão.



**Figura 5.15.** Quantificação por qPCR da expressão diferencial para validação do transcriptoma. *H. armigera* em algodão (AIA), *H. armigera* em soja (SoA), *H. zea* em algodão (AIZ), *H. zea* em soja (SoZ), híbrido em algodão (AIH) e híbrido em soja (SoH).

#### 5.4 DISCUSSÃO

Uma das características mais importantes dentro do processo de adaptação a hospedeiros está relacionada com a gama de genes disponíveis e prontos para acionar uma rota de resposta que permita ao inseto se defender dos compostos tóxicos do hospedeiro (Birnbaum, et al., 2017; Simon et al., 2015). Na contagem total de genes presentes em cada tratamento, os maiores números de genes sofrendo um tipo de expressão diferencial eram os presentes na comparação de *H. armigera* se alimentando de ambas as culturas seguida por *H. zea* se alimentando também das duas culturas. Isso reflete que o número de genes ativos nessa condição nas linhagens puras é maior nos progenitores do que nos indivíduos híbridos.

Uma das principais barreiras enfrentadas pelos híbridos de várias espécies são as interações dos genomas que podem resultar na ausência de capacidade de adaptação ao ambiente que o mesmo se encontra (Burke & Arnold, 2001). Essa dificuldade pode ser respaldada pela ausência de expressão de genes de detoxificação e com incidência em processos fisiológicos. Isso não parece ser o caso da linhagem híbrida de *Helicoverpa*, uma vez que os insetos foram capazes de sobreviver em ambos os hospedeiros. No entanto, não avaliamos outros parâmetros adaptativos e reprodutivos que podem inviabilizar a prole híbrida em alguma fase do seu desenvolvimento e reprodução (Mallet, 2018). Estudos realizados com populações brasileiras demonstram que apesar da detecção de híbridos putativos em condições de campo, *H. armigera* e *H. zea* permanecem com *pools* genéticos distintos

e a taxa de hibridação é relativamente baixa (Anderson et al., 2016; 2018; Leite et al., 2017; Gonçalves et al., 2019).

Um dos genes de maior relevância no estudo de detoxificação do gossipol em *H. armigera* foi o CYP6AE14, caracterizado inicialmente por Celorio-Mancera et al. (2011) e reportado como *up regulated* (Tao et al., 2012). Porém estudos realizados por Kreml et al. (2016) demonstram que não existe uma evidência direta de que seja especificamente esse gene o responsável da detoxificação do gossipol. No estudo realizado por Pearce et al. (2017) foi reportada a ausência deste gene em *H. zea*, no nosso trabalho nos não encontramos esse gene em *H. zea* porém encontramos um dos genes dessa família nos indivíduos híbridos.

Na identificação dos grupos de genes *up* e *down regulated* foram predominantes nas três linhagens grupos com ação detoxificativa como as serine protease e carboxilesterase que são grupos de genes previamente reportados com influência na detoxificação (Jin et al., 2019; Pearce et al., 2017; Souza et al., 2016). Na comparação entre os híbridos alimentados com algodão e soja, foram encontrados como sobre expressos (*Up regulated*) genes reconhecidos pelo seu potencial na adaptação a hospedeiros como as UDP-glucosiltransferase. Este gene foi previamente caracterizado em *H. armigera* quando alimentada com compostos contendo gossipol (Kreml et al., 2016).

Um dos genes com *up regulated* nas linhagens das *H. armigera* foi o *molting carboxipeptidase A*, também já reportado previamente como alta expressão em *H. armigera* (Dong et al., 2007). O grupo das carboxilpeptidases tem funções importantes dentro da digestão de compostos e atividades hormonais como, por exemplo, a muda nos insetos (Sui et al., 2009). Os valores do log2 quando o conjunto comparado corresponde a *H. armigera* em algodão e *H. armigera* em soja foi de 7,15x, reafirmando sua relação com o gossipol. Nos indivíduos de *H. zea* em algodão e *H. zea* em soja esse transcrito não foi encontrado. Fato que respaldam nossos dados de capítulos anteriores, onde os indivíduos de *H. zea* conseguem se alimentar, porém existem falhas no processo de metamorfose que não permitiu que estes cheguem à pupa e adulto. Isso torna esse gene um dos candidatos para diferenças de polifagia reportados entre *H. armigera* e *H. zea*.

*Chemosensory protein 15* aparece como *up regulated* quando comparadas entre elas as linhagens de *H. armigera* e os híbridos. Estes genes foram reportados

anteriormente em *Spodoptera litura* como resposta a diferentes estímulos e na adaptação de diferentes ambientes (Yi et al., 2017). Transcritos pertencentes à serine protease com funcionalidade reportada para adaptação a hospedeiro encontram se também nestas duas comparações porém em *down regulated* (Srinivasan et al., 2006). Já na comparação de *H. zea* alimentadas com algodão e soja os transcritos desses dois genes não foram encontrados. Assim podemos sugerir que esses genes também são mecanismos extremamente importantes para o sucesso de desenvolvimento completo ciclo de *H. armigera* e a linhagem híbrida sobre o hospedeiro algodão e soja e a falha no desenvolvimento de *H. zea*.

A fonte de alimento que corresponde a algodão é uma das mais estudadas em *H. armigera*. Estes estudos têm o objetivo de entender o efeito do gossipol e reconhecer a rota metabólica de inativação deste composto (Celorio-Mancera et al., 2011; Krempl et al., 2016). Os genes caracterizados no nosso trabalho, presentes nos indivíduos de *H. armigera* e no híbrido e ausentes em *H. zea* podem servir como possíveis candidatos para entender as rotas de detoxificação e consequente polifagia dentro do gênero *Helicoverpa*. Isso se deve a diferença nos nossos bioensaios biológicos, uma vez que a prole híbrida e *H. armigera* foram capazes de completar o ciclo no algodão e soja e *H. zea* foi incapaz de completar o ciclo em ambos os hospedeiros.

A presença de uma prole híbrida torna-se uma aliada para estudos adaptativos, uma vez que suas características fenotípicas podem ajudar a revelar padrões fisiológicos, bioquímicos e comportamentais. Baseado nos nossos estudos biológicos, a prole híbrida entre ♀ *H. armigera* \* ♂ *H. zea* teve desempenho similar a *H. armigera* sobre os hospedeiros soja e algodão. A análise dos transcritos expressos dessas três linhagens revelou alguns grupos de genes candidatos envolvidos na maior polifagia de *H. armigera* quando comparado a *H. zea*. Os principais grupos foram *molting carboxipeptidase A*, *Chemosensory protein 15*, *serine protease* que estão presentes em *H. armigera* e na prole híbrida, mas não em *H. zea* e a expressão diferenciada de genes da família Citocromo P450.

## REFERÊNCIAS

- Anderson, C. J., Tay, W. T., McGaughran, A., Gordon, K. e Walsh, T. K. (2016). Population structure and gene flow in the global pest, *Helicoverpa armigera*. *Molecular Ecology*, 25(21): 5296–5311.
- Anderson, Craig J., Oakeshott, J. G., Tay, W. T., Gordon, K. H. J., Zwick, A. e Walsh, T. K. (2018). Hybridization and gene flow in the mega-pest lineage of moth, *Helicoverpa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(19): 5034–5039.
- Babicki, S., Arndt, D., Marcu, A., Liang, Y., Grant, J. R., Maciejewski, A. e Wishart, D. S. (2016). Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Research*, 44: 147–153.
- Berenbaum, M. R. (2002). Postgenomic chemical ecology: from genetic code to ecological interactions. *Journal of Chemical Ecology*, 28(5): 873–896.
- Birnbaum, S. S. L., Rinker, D. C., Gerardo, N. M. e Abbot, P. (2017). Transcriptional profile and differential fitness in a specialist milkweed insect across host plants varying in toxicity. *Molecular Ecology*, 26(23): 6742–6761.
- Bolger, A. M., Lohse, M. e Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15): 2114–2120.
- Burke, J. M. e Arnold, M. L. (2001). Genetics and the fitness of hybrids. *Annual Review of Genetics*, 35: 31–52.
- Bush Guy L. (1969). Sympatric host race formation and speciation in frugivorous flies of the genus *Rhagoletis* (Diptera, Tephritidae). *Evolution*: 237–251.
- Celorio-Mancera, M. de la P., Ahn, S. J., Vogel, H. e Heckel, D. G. (2011). Transcriptional responses underlying the hormetic and detrimental effects of the plant secondary metabolite gossypol on the generalist herbivore *Helicoverpa armigera*. *BMC Genomics*, 12(575): 1–16.
- Conesa, A., Götz, S., García-gómez, J. M., Terol, J., Talón, M. e Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18): 3674–3676.
- Czepak, C., Albernaz, K. C., Vivan, L. M., Guimarães, H. O. e Carvalhais, T. (2013). First reported occurrence of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 43(1): 110–113.

- Després, L., David, J. P. e Gallet, C. (2007). The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(6): 298–307.
- Dong, D.-J., He, H.-J., Chai, L.-Q., Jiang, X.-J., Wang, J.-X. e Zhao, X.-F. (2007). Identification of genes differentially expressed during larval molting and metamorphosis of *Helicoverpa armigera*. *BMC Developmental Biology*, 7(73): 1–16.
- Drès, M. e Mallet, J. (2002). Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 357: 471–492.
- Ehrlich, P. R. e Raven, P. H. (1964). Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evolution*, 18(4): 586–608.
- Futuyma, D. J. e Agrawal, A. A. (2009). Macroevolution and the biological diversity of plants and herbivores. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(43): 18054–18061.
- Gog, L., Vogel, H., Hum-Musser, S. M., Tuter, J. e Musser, R. O. (2014). Larval *Helicoverpa zea* transcriptional, growth and behavioral responses to nicotine and *Nicotiana tabacum*. *Insects*, 5: 668–688.
- Gonçalves, R. M., Mastrangelo, T., Rodrigues, J. C. V., Paulo, D. F., Omoto, C., Corrêa, A. S. e 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(13): 7378–7401.
- Heckel, D. G. (2014). Insect detoxification and sequestration strategies. In *Annual Plant Reviews* (47).
- Jin, M., Liao, C., Fu, X., Holdbrook, R., Wu, K. e Xiao, Y. (2019). Adaptive regulation of detoxification enzymes in *Helicoverpa armigera* to different host plants. *Insect Molecular Biology*, 28(5): 628–636.
- Koenig, C., Bretschneider, A., Heckel, D. G., Grosse-Wilde, E., Hansson, B. S. e Vogel, H. (2015). The plastic response of *Manduca sexta* to host and non-host plants. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 63: 72–85.
- Kotkar, H. M., Sarate, P. J., Tamhane, V. A., Gupta, V. S. e Giri, A. P. (2009). Responses of midgut amylases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host plants. *Journal of Insect Physiology*, 55(8): 663–670.

- Krempl, C., Heidel-Fischer, H. M., Jiménez-Alemán, G. H., Reichelt, M., Menezes, R. C., Boland, W., Vogel, H., Heckel, D. G. e Joußen, N. (2016). Gossypol toxicity and detoxification in *Helicoverpa armigera* and *Heliothis virescens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 78: 69–77.
- Laster, M. L. e Hardee, D. D. (1995). Intermating compatibility between North American *Helicoverpa zea* and *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from Russia. *Journal of Economic Entomology*, 88(1): 77–80.
- Leite, N. A., Correa, A. S., Michel, A. P., Alves-Pereira, A., Pavinato, V. A. C., Zucchi, M. I. e Omoto, C. (2017). Pan-American similarities in genetic structures of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) with implications for hybridization. *Environmental Entomology*, 46(4): 1024–1034.
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S. e Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLOS Computational Biology*: 1–23.
- Malka, O., Santos-Garcia, D., Feldmesser, E., Sharon, E., Krause-Sakate, R., Delatte, H., Brunschot, S., Patel, M., Visendi, P., Mugerwa, H., Seal, S., Colvin J. e Morin, S. (2018). Species-complex diversification and host-plant associations in *Bemisia tabaci*: A plant-defence, detoxification perspective revealed by RNA-Seq analyses. *Molecular Ecology*, 27(21): 4241–4256.
- Mallet, J. (2018). Invasive insect hybridizes with local pests. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(19): 4819–4821.
- Musser, R. O., Hum-musser, S. M., Eichenseer, H., Peiffer, M., Murphy, J. B. e Felton, G. W. (2002). Caterpillar saliva beats plant defences. *Nature*, 416: 599–600.
- Oliveros, J.C. (2007-2015) Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>

- Pearce, S. L., Clarke, D. F., East, P. D., Elfekih, S., Gordon, K. H. J., Jermiin, L. S., McGaughran, A., Oakeshott, J. G., Papanikolaou, A., Perera, O. P., Rane, R. V., Richards, S., Tay, W. T., Walsh, T. K., Anderson, A., Anderson, C. J., Asgari, S., Board, P. G., Bretschneider, A., Campbell, P. M., Chertemps, T., Christeller, J. T., Coppin, C. W., Downes, S. J., Duan, G., Farnsworth, C. A., Good, R. T., Han, L. B., Han, Y.C., Hatje, K., Horne, I., Huang, Y. P., Hughes, D. S. T., Jacquín-Joly, E., James, W., Jhangiani, S., Kollmar, M., Kuwar, S. S., Li, S., Liu, N. Y., Maibeche, M. T., Miller, J. R., Montagne, N., Perry, T., Qu, J., Song, S. V., Sutton, G. G., Vogel, H., Walenz, B. P., Xu, W., Zhang, H. J., Zou, Z., Batterham, P., Edwards, O. R., Feyereisen, R., Gibbs, R. A., Heckel, D. G., McGrath, A., Robin, C., Scherer, S. E., Worley, K. C. e Wu, Y. D. (2017). Genomic innovations, transcriptional plasticity and gene loss underlying the evolution and divergence of two highly polyphagous and invasive *Helicoverpa* pest species. *BMC Biology*, 15(69): 15–63.
- Roy, A., Walker III, W. B., Vogel, H., Chattington, S., Larsson, M. C., Anderson, P., Heckel, D. G. e Schlyter, F. (2016). Diet dependent metabolic responses in three generalist insect herbivores *Spodoptera* spp. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 71: 91–105.
- Simon, J. C., D'Alençon, E., Guy, E., Jacquín-Joly, E., Jaquiéry, J., Nouhaud, P., Peccoud, J., Sugio, A. e Streiff, R. (2015). Genomics of adaptation to host-plants in herbivorous insects. *Briefings in Functional Genomics*, 14(6): 413–423.
- Souza, T. P., Dias, R. O., Castelhana, E. C., Brandão, M. M., Moura, D. S. e Silva-Filho, M. C. (2016). Comparative analysis of expression profiling of the trypsin and chymotrypsin genes from Lepidoptera species with different levels of sensitivity to soybean peptidase inhibitors. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 196–197: 67–73.
- Srinivasan, A., Giri, A. P. e Gupta, V. S. (2006). Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 11(1): 132–154.
- Sui, Y.-P., Liu, X.-B., Chai, L.-Q., Wang, J.-X. e Zhao, X.-F. (2009). Characterization and influences of classical insect hormones on the expression profiles of a molting carboxypeptidase A from the cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Insect Molecular Biology*, 18(3): 353–363.

- Tao, X.-Y., Xue, X.-Y., Huang, Y.-P., Chen, X.-Y. e Mao, Y.-B. (2012). Gossypol-enhanced P450 gene pool contributes to cotton bollworm tolerance to a pyrethroid insecticide. *Molecular Ecology*, 21: 4371–4385.
- Tay, W. T., Soria, M. F., Walsh, T., Thomazoni, D., Silvie, P., Behere, G. T., Anderson, C. e Downes, S. (2013). A brave new world for an old world pest: *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. *PLoS ONE*, 8(11): e80134.
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., Pimentel, H., Salzberg, S. T., Rinn, J. L. e Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, 7(3): 562–578.
- Volpicella, M., Ceci, L. R., Cordewener, J., America, T., Gallerani, R., Bode, W., Jongasma, M. A. e Beekwilder, J. (2003). Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. *European Journal of Biochemistry*, 270(1): 10–19.
- Yi, X., Qi, J., Zhou, X., Hu, M. Y. e Zhong, G. H. (2017). Differential expression of chemosensory-protein genes in midguts in response to diet of *Spodoptera litura*. *Scientific Reports*, 7(296): 1–11.
- Yu, Q. Y., Fang, S. M., Zhang, Z. e Jiggins, C. D. (2016). The transcriptome response of *Heliconius melpomene* larvae to a novel host plant. *Molecular Ecology*, 25(19): 4850–4865.
- Zhang, S., Gu, S., Ni, X. e Li, X. (2019). Genome size reversely correlates with host plant range in *Helicoverpa* species. *Frontiers in Physiology*, 10: 1–10.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas pesquisas desenvolvidas tínhamos como objetivos esclarecer a flutuação populacional, a existência de uma prole híbrida no campo e no laboratório entre *H. armigera* e *H. zea* e o comportamento alimentar destes indivíduos no Brasil. Com os nossos estudos conseguimos comprovar que *H. armigera* é a espécie predominante em todas as localidades amostradas, além disso, *H. armigera* e *H. zea* compartilham espacialmente e temporalmente os agroecossistemas brasileiros.

Foi observada a separação por hospedeiros entre as duas espécies, sendo *H. zea* exclusivamente encontrada na cultura do milho e *H. armigera* encontrada em uma ampla gama de hospedeiros, com exceção do milho; com relação a *H. zea* foi determinada a existência de um alto fluxo gênico entre as populações de diferentes estados brasileiros. Para *H. armigera* altos valores de  $F_{ST}$  foram encontrados entre algumas populações, mas sem uma clara estruturação por distância ou hospedeiro. Nossas análises indicaram a presença de indivíduos híbridos putativos no campo, em taxas variáveis dependendo da localidade.

Com o intuito de compreender um pouco mais sobre os indivíduos híbridos foram realizados em condições de laboratório cruzamentos entre as duas espécies. Determinamos que é possível obter indivíduos híbridos, porém essa hibridação é assimétrica já que apenas o cruzamento entre indivíduos fêmeas de *H. armigera* e machos de *H. zea* geraram prole. Esses híbridos conseguem se alimentar e se desenvolver nos hospedeiros algodão e soja, refletindo uma semelhança ao progenitor *H. armigera*. Uma resposta semelhante ocorreu quando foi explorado o perfil dos genes transcritos em resposta aos estímulos alimentares.

*Helicoverpa armigera* apresentou alta capacidade de dispersão e polifagia tornando-se a principal praga do gênero no Brasil. Os eventos de hibridação entre *H. armigera* e *H. zea* devem ser considerados no manejo dessas pragas no Brasil, uma vez que introgressões adaptativas pode alterar completamente o sucesso de táticas de controle e a dinâmica de hospedeiros entre as espécies.