

**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  
2020**

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

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

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

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

**Piracicaba**  
**2020**



## 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 de uma 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 encontrada 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 descritas 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 à 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 *Heliothine* 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: Heliothinae). *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: Heliiothinae) 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

### 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 polífagas, não conseguimos associar com a fonte alimentar dos estados larvais e conseqüente 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  $\text{CO}_2$  atmosférico por carboxilação da ribulose bifsosfato (RuBP) produzindo três moléculas de carbono e discriminam as moléculas de  $^{13}\text{C}$  apresentando valores entre  $-20/1000$  a  $-34/1000$ . Enquanto as plantas C4 incorporam o  $\text{CO}_2$  por carboxilação do fosfoenolpiruvato (PEP) produzindo quatro moléculas de carbono (Hobbie & Werner, 2004) e não discriminam as moléculas de  $^{13}\text{C}$ , 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  $^{13}\text{C}$  e  $^{12}\text{C}$  (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 CONCLUSÃO

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., 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.
- 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., 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.
- 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

#### 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 hibridizem 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 polívoros 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 a 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 CONCLUSÃO

A primeira pergunta que motivou o desenvolvimento deste trabalho buscava conhecer a presença de 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 espécie na América do Sul. Já *H. armigera* foi encontrada em uma ampla gama de hospedeiros, com exceção do milho.

A utilização de SNPs gerados a partir da técnica de GBS surgem como uma ótima alternativa pois abrangem diferentes regiões do genoma. 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. Para *H. armigera* obtivemos altos valores de  $F_{ST}$  entre algumas populações, no entanto não foi observado padrão de estruturação genética por distância (IBD – *isolation by distance*) ou por hospedeiro entre as populações dessa praga. Nós também identificamos híbridos putativos entre *H. armigera* e *H. zea* no Brasil.

## REFERÊNCIAS

- Alpert, P. (2006). The advantages and disadvantages of being introduced. *Biological Invasions*, 8(7):1523–1534.
- 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):5034–5039.
- 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., 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.
- 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., Czwienczek, 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 quarentine 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., Fatoetto, 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., Jermiin, L. S., McGaughan, 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

### 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, oligívoros, quando se alimentam de espécies de plantas de uma única família, ou monívoros 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 polívoras (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 polívoras, 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 Heliotínes 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 CONCLUSÃO

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.

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.

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: Heliiothinae). *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., Reising, 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

### 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; Futuyama & 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 do citocromo P450, as carboxylesterases e as UDP-glucosyltransferases (UGTs) (Kreml 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 CONCLUSÃO

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* e ♂ *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.



- Krempf, 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., Cheretemps, 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., Jongsma, 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.

## 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.