.

Universidade de São Paulo

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Isolamento reprodutivo e dormência em duas linhagens alopátricas de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)

Frederico Hickmann

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

Piracicaba
2019

Frederico Hickmann
Engenheiro Agrônomo

Isolamento reprodutivo e dormência em duas linhagens alopátricas de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)

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

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

Piracicaba
2019

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

Hickmann, Frederico

Isolamento reprodutivo e dormência em duas linhagens alopátricas de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae) / Frederico Hickmann. - - Piracicaba, 2019.

67 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Percevejo-marrom-da-soja 2. Ecologia molecular 3. Isolamento reprodutivo. 4. Adaptação L. . I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, e minha namorada, Roque Wendelino Hickmann (in memorian), Crescência Hickmann e Karine Ines Bolson Moro, pelo amor, apoio, segurança e compreensão durantes os meus estudos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alberto Soares Corrêa pela confiança, orientação, amizade, pelos conhecimentos compartilhados e pelos conselhos que direta ou indiretamente contribuiram para concretização deste trabalho bem como possibilitaram meu crescimento pessoal e profissional.

Ao grupo familiar, especialmente pai, mãe, irmãos, cunhados e sobrinhos pelo suporte e apoio incondicional, compreesão por não estar mais presente. Pelas conselhos e apoio em todos os momentos.

Agradecer à minha namorada Karine Ines Bolson Moro pelo apoio, carinho, amor e compreensão. Agradeço por estar sempre ao meu lado.

Aos colegas e amigos do EntoMol (Laboratório de Ecologia Molecular de Artrópodes/USP-ESALQ), pelos conhecimentos compartilhados em biologia molecular, no auxilio nos experimentos e a amizade. Em especial agradecer pelos concelhos e orientação do Dr. Erick Cordeiro e Patrícia Soares pela ajuda nos experimentos e ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. Roberto Postali Parra e o Laboratório de Biologia de Insetos por ceder equipamentos e espaço físico para condução dos experimentos, em especial pelos conselhos da técnica de laboratório Neide Graciano Zério.

Ao Prof. Dr. Wesley Conde Godoy e ao Laboratório de Ecologia e Entomologia Florestal por ceder câmaras climáticas para execução dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Celso Omoto e o Laboratório de Manejo de Resistência de Artrópodes pela amizade e ajuda na condução dos experimentos.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia da Escoloa Superior de Agricultura Luiz de Queiroz pela disponibilidade e suporte.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia da Escoloa Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” por oferecer conhecimento e formação de qualidade e a confiança depositada em mim

A todos os colegas, amigos que ajudaram na coleta de insetos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela conseção da bolsa. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ) pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

EPÍGRAFE

“Look up at the stars and not down at your feet. Try to make sense of what you see, and wonder about what makes the universe exist. Be curious. ”.

Stephen Hawking

SUMÁRIO

RESUMO ***8***

ABSTRACT ***10***

1. INTRODUÇÃO GERAL **13**

1.1 *Euschistus heros* F. (HEMIPTERA: HETEROPTERA: PENTATOMIDAE) **13**

1.2 DINÂMICA POPULACIONAL DE *E. heros* **14**

1.3 DORMÊNCIA **16**

1.4 OBJETICO GERAL **18**

REFERÊNCIAS **18**

2 INCOMPATIBILIDADE REPRODUTIVA ENTRE LINHAGENS ALOPÁTRICAS DE Euschistus heros F. (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) ***25***

RESUMO **25**

ABSTRACT **25**

2.1. INTRODUÇÃO **26**

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS **28**

2.2.1 Coleta e manutenção de populações de *E. heros* em laboratório 28

2.2.2 Identificação molecular das linhagens de *E. heros* 28

2.2.3 Cruzamentos recíprocos entre linhagens de *E. heros* 30

2.3 RESULTADOS **31**

2.3.1 Identificação molecular das linhagens de *E. heros* 31

2.3.2 Cruzamentos recíprocos entre linhagens de *E. heros* 32

2.4 DISCUSSÃO **36**

REFERÊNCIAS **40**

3 EFEITO DE FOTOPERÍODO E TEMPERATURA EM DUAS LINHAGENS MITOCONDRIAIS DE Euschistus heros F. (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) ***45***

RESUMO **45**

ABSTRACT **47**

3.1 INTRODUÇÃO **47**

3.2 MATERIAS E MÉTODOS **49**

3.3 RESULTADOS **50**

3.4 DISCUSSÃO **59**

REFERÊNCIAS **63**

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS ***67***

RESUMO

Isolamento reprodutivo e dormência em duas linhagens alopátricas de *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)

O percevejo-marrom-da-soja, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae), é uma praga chave da soja na América do Sul. Recentemente, foi descoberto a presença de duas linhagens alopátricas de *E. heros* no Brasil. Uma linhagem de ocorrência predominante na região Norte/Nordeste (N) e outra predominate na região Sul (S) e uma zona sobreposição entre as linhagens no Cerrado. O encontro de dois pools gênicos pode representar aumento ou diminuição de vigor das populações mediado pelo grau de isolamento reprodutivo. O encontro das linhagens no Cerrado é uma hipótese para as explosões populacionais de *E. heros* em cultivos de soja e constante ocorrência em cultivos de algodão relatados nos últimos anos. Questões sobre o potencial adaptativo dessas linhagens são de grande importância para entendimento da dinâmica e dos surtos populacionais de *E. heros*. Assim, nossos objetivos foram: 1) verificar a presença de barreiras reprodutivas entre as duas linhagens alopátricas de *E. heros* que promova uma prole híbrida de baixo fitness; e 2) avaliar o efeito da temperatura e fotoperíodo no tempo de desenvolvimento e viabilidade de fases imaturas e na expressão da dormência nas linhagens alopátricas de *E. heros*. Cruzamentos recíprocos foram realizados com intuito de avaliar o desenvolvimento da prole híbrida quando comparada com a prole coespecífica. Os parâmetros biológicos e de tabela de vida evidenciaram que o cruzamento entre as duas linhagens não representou diminuição de fitness da prole híbrida, portanto, não existe incompatibilidade pós-zigótica entre as linhagens de *E. heros*. Adicionalmente, ovos das linhagens (S e N) foram incubados em câmaras climáticas sob diferentes regimes de luz (10: 14, 11,5: 12,5 e 14: 10 (L: E)); e temperaturas (14,18, 21 e 25 ºC). Ficou evidente que existe uma relação entre temperatura e fotoperíodo no tempo de desenvolvimento e viabilidade de *E. heros*. A temperatura de 18 ºC e fotoperíodo de 10: 14 (L:E) aumentam o tempo necessário para completar o ciclo e reduzem a viabilidade. Temperatura de 25 ºC e fotoperíodo de 14: 10 (L:E) diminuem tempo de desenvolvimento e aumentam a viabilidade nas fases imaturas das duas linhagens. A expressão do fenótipo da dormência foi positivamente afetada por temperaturas menores e fotoperíodos mais curtos, especialmente para a linhagem Sul. A linhagem Norte não expressou características fenotípicas de dormência mesmo sob condições de temperaturas baixas e dias curtos. As diferenças encontradas possivelmente estão relacionadas ao local de origem das duas linhagens. Assim, o encontro de dois pools gênicos onde não há barreira reprodutiva aumenta a diversidade genética nas populações e permite a combinação de alelos que podem aumentar o vigor das populações e a capacidade de adaptação a ambientes novos e perturbados, como o ambiente agrícola. Os resultados demonstram que as duas linhagens possuem respostas similares aos fatores de estresses abióticos nas fases imaturas e distintas na expressão do fenótipo da dormência. As respostas deste trabalho oferecem informações úteis para melhor entender a dinâmica populacional contemporânea e para implementação de estratégias menejo mais eficientes e sustentáveis de *E. heros* no cenário agrícola nacional.

Palavras-chave: Percevejo-marrom-da-soja; Ecologia molecular; Isolamento reprodutivo; Adaptação

ABSTRACT

Reproductive isolation and dormancy in two allopatric lineages of *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae)

The brown soybean stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae), is a key soybean pest in South America. It was recently discovered the presence of two allopatric lineages of *E. heros* in Brazil. A lineage predominantly occurring in the Northern/Northeast region (N) and another predominate in the Southern region (S) and an overlapping hybridization zone in the Cerrado region. The meeting of two gene pools may represent an increase or decrease in the vigor of populations in the absence of reproductive isolation. The reunion of the lineages in the Cerrado is a hypothesis for the expressive increase of the species in soybean cultivations and expansion of problems in the cotton crop. Questions about the adaptive potential of these lineages are of great importance for understanding the dynamics and population outbreaks of *E. heros*. The present study aims to: 1) verify the presence of reproductive barriers between the two lineages by means of a low fitness hybrid offspring; 2) to evaluate the effect of temperature and photoperiod on the development time and viability of immature phases and expression of dormancy in the allopatric lineages of *E. heros*. Reciprocal crosses were performed with the purpose of evaluating the development of the hybrid offspring when compared to the co-specific offspring. The biological and life table parameters showed that the crossbreeding between the two lineages did not represent a decrease in the fitness of the hybrid offspring. Therefore, there is no post-zygotic incompatibility among the lineages of *E. heros*. Additionally, eggs from both lineages (S and N) were incubated in climatic chambers under different light regimes (10: 14, 11,5: 12,5 and 14: 10 (L: E) and temperatures (14, 18, 21 and 25ºC). It was evident that there is a relationship between temperature and photoperiod in the development time and viability of *E. heros*. The temperature of 18 °C and photoperiod of 10: 14 (L: E) increase the time required to complete the cycle and reduce viability. Temperature of 25 °C and photoperiod of 14: 10 (L: E) decrease development time and increase viability in the immature phases of the two lineages. The expression of the dormancy phenotype was positively affected by shorter temperatures and shorter photoperiods, especially for the Southern lineage. The Northern lineage did not express phenotypic characteristics of dormancy even under low temperature and short-day conditions. The differences found are possibly related to the geographical origin of the two lineages. Thus, the meeting of two gene pools where there is no reproductive barrier increases the genetic diversity in populations and, allows the combination of alleles that can increase the vigor of populations and the ability to adapt to new and disturbed environments, such as the agricultural environment. The results demonstrate that the two strains have similar responses to the abiotic stress factors in the immature phases and distinct in the expression of the dormancy phenotype. The answers of this work offer useful information to better understand contemporary population dynamics and to implement

more efficient and sustainable management strategies of *E. heros* in the national agricultural scenario.

Keywords: Soybean brown stink bug; Molecular ecology; Reproductive isolation; Adaptation

12 .

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 *Euschistus heros* F. (HEMIPTERA: HETEROPTERA: PENTATOMIDAE)

A família Pentatomidae é a quarta maior família da subordem Heteroptera e compreende mais de 36 mil espécies, sendo que, são descritos 760 gêneros e 4100 espécies no Brasil (GRAZIA; FORTES; CAMPOS, 1999). O complexo de percevejos pentatomídeos tem grande importância econômica no cenário agrícola devido ao seu hábito alimentar polífago e causar danos às culturas atacadas, com redução de rendimento e qualidade (CORREA-FERREIRA; DE AZEVEDO, 2002; PANIZZI; SLANSKY, 1985). Dentre o complexo-percevejos o percevejo-marrom-da-soja, *Euschistus heros* é praga chave em cultivos de soja devido sua ampla distribuição de ocorrência e reduzida eficiência dos inseticidas químicos (PANIZZI; VIVAN, 1997; SOSA-GÓMEZ; SILVA, 2010).

O percevejo-marrom-da-soja tem essa denominação devido a sua coloração escura na fase adulta. Sua principal característica é a presença de uma mancha branca no ápice do escutelo (meia lua). Possui expansões laterais do pronoto em forma de espinhos pontiagudos que se desenvolvem no quinto estádio e completam sua formação na fase adulta. A postura de *E. heros* é de coloração amarelada e em fileira dupla que, geralmente são ovipositados sob as folhas ou vagens do hospedeiro (VILLAS-BÔAS; PANIZZI, 1980). As ninfas recém-eclodidas apresentam hábito gregário nas primeiras semanas de vida, sendo mais acentuado no primeiro instar sendo este hábito perdido após atingir o terceiro instar. As formas imaturas passam por cinco estádios de ninfa. No terceiro instar a espécie inicia a alimentação em estruturas reprodutivas do hospedeiro (GRAZIA et al., 1980). O potencial reprodutivo das fêmeas é variável, relacionada com a dieta e a constância alimentar das fêmeas durante a fase de ninfa (PINTO; PANIZZI, 1994; VILLAS BÔAS; PANIZZI, 1980).

Euschistus heros é abundante nos cultivos de soja entre os meses de novembro a abril período que completa três gerações. Quando a soja inicia a maturação o percevejo migra para outros hospedeiros como plantas daninhas ou culturas agrícolas como feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) (SORIA; DEGRANDE; PANIZZI, 2011) e girassol (*Helianthus annuus* L.) (FROTA; SANTOS, 2007) onde completa sua quarta geração. A espécie foi reportada em 21 hospedeiros na região Neotropical sendo que 6 (seis) são hospedeiros que permitem completar seu ciclo (SMANIOTTO; PANIZZI, 2015). Encerrado o ciclo de

desenvolvimento de seu hospedeiro primário (soja) *E. heros* busca refúgio sob folhas mortas caídas no solo e restos de cultura entrando em dormência permanecendo nesta condição até que as condições ambientais voltem a ser favoráveis (pode ficar nessa condição por até 7 meses) (KISHINO; ALVES, 1994; PANIZZI; NIVA, 1994).

A espécie vem aumentando sua proporção em território nacional sendo relatadadas acentuadas ocorrências especialmetne no Centro-Oeste e norte do Paraná. Atualmente trata-se da espécie mais abundante nos cultivos de soja do Brasil (KRINSKI et al., 2013). Danos a cultura da soja são majoritariamente observados nos estádios reprodutivos (ZAMBIAZZI et al., 2011), podendo ocorrer em todas as fases de desenvolvimento da cultura. O dano do ataque de *E. heros* a legumes e sementes ocorre com a introdução de aparato bucal e liberação de enzimas digestivas que afetam a produção e qualidade dos grãos produzidos (PANIZZI; SLANSKY, 1985). O nível de controle de percevejos para a produção de grãos é de 2 percevejos maiores que 0,5 cm por metro linear de fileiras de soja. Com o lançamento de novas variedades e novas metodologias empregadas este nível de controle vem sendo questionado por agentes de assistência técnica e produtores (CORRÊA-FERREIRA; PANIZZI, 1999). O controle de *E. heros* é majoritariamente via inseticidas químicos durante a fase vegetativa e reprodutiva da cultura. Vivan & Degrande (2012) constataram que sem controle percevejos fitófagos podem reduzir em até 80% o poder germinativo da semente e reduzir pela metade a produtividade da cultura da soja. O percevejo marrom passou de praga secundária na década de 1970 e tornou-se praga chave na cultura da soja. São apontados vários motivos para a mudança de status da praga, dentre eles o sistema de cultivo plantio direto, expansão da cultura da soja, mudanças climáticas e dinâmica populacional contemporânea da espécie.

1.2 DINÂMICA POPULACIONAL DE *E. heros*

Nos últimos anos a distribuição e ocorrência de *E. heros* vem sofrendo mudanças na América do Sul. Na região Centro-Oeste do Brasil vem sendo reportado aumento expressivo da espécie em cultivos agrícolas. Este crescimento tem sido relacionado a melhor adaptação da espécie a regiões mais quentes como o Centro-Oeste (CIVIDANES; PARRA, 1994; PANIZZI; SLANSKY, 1985), ao sistema de cultivo (não revolvimento do solo), adensamento de plantas e sucessão de

culturas (PANIZZI, 2015). Em adição, Corrêa-Ferreira et al. (2010) constataram altas densidades populacionais inclusive durante a fase vegetativa da soja sendo apontados práticas inadequadas de manejo como desencadeadores deste fenômeno. Além disto a sua expansão vem sendo reportada com ataque de soja na região Norte do Brasil (OLIVEIRA et al., 2014) e recentemente foi detectado atacando soja na Argentina (SALUSO et al., 2011).

Em estudo recente SOARES et al. (2018) identificaram a ocorrência de duas linhagens alopátricas de *E. heros* no Brasil. Uma linhagem ocorre predominantemente na região da Mata Atlântica e Pampa do Brasil e outra predominantemente na Floresta Amazônica e Caatinga, estima-se que a divergência tenha ocorrido a 4,5 milhões de anos. Na região do Cerrado foi observada região de mistura das duas linhagens de *E. heros*. Em trabalho realizado por Sosa-Gómez et al. (2004), com populações do Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, verificaram que há um isolamento geográfico entre populações. Embora não conhecida, a capacidade dispersiva da espécie é considerada baixa e sugere que as duas linhagens estiveram separadas durante milhões de anos. O reencontro na região central do Brasil possivelmente está associado à expansão dos cultivos agrícolas e transporte de bens.

Um dos fatores determinantes na dispersão de espécies praga são o transporte de produtos e maquinários entre regiões. O movimento antropogênico de espécies pode atuar como força seletiva em uma população, selecionando populações com maior potencial invasivo com possibilidade de expansão, que quando se juntam tem um grande aumento de fitness e capacidade de adaptação, este fenômeno foi denominado "Bridgehead Effect" por Lombaert et al. (2010). Este efeito foi relatado em *Harmonia axyridis* (LOMBAERT et al., 2010), em *Solenopsis invicta* na China (YANG et al., 2012) e *Helicoverpa armigera* no Brasil (LEITE et al., 2017). A compatibilidade reprodutiva e as trocas adaptativas entre as linhagens podem gerar fenótipos híbridos altamente adaptados (FITZPATRICK; SHAFFER, 2007). Por outro lado, híbridos também podem apresentar comportamento meiótico irregular diminuindo seu fitness (SHAW, 1981). As implicações deste rencoontro pode representar incompatibilidades reprodutivas bem como favorecer a combinação de alelos distintos aumentando as chances de adaptação a novos ambientes. Tendo em vista o exposto, se fazem necessários estudos no que se

refere a incompatibilidades reprodutivas pré ou pós zigóticas para verificar qual o impacto do reencontro das duas linhagens de *E. heros* no cenário agrícola nacional.

1.3 DORMÊNCIA

A dormência é uma adaptação que permitiu que a classe insecta ocupe desde trópicos até os polos. O termo dormência ainda possui ambiguidade em seus usos e definições e costuma ser dividido em duas classes, quiescência e diapausa e é amplamente discutida nos trabalhos de DANKS, (1987); KOŠTÁL, (2006); MANSINGH, (1971) e TAUBER; TAUBER; MASAKI, (1986). Quiescência é definida por KOŠTÁL, (2006) e DANKS, (1987) como uma resposta imediata às condições ambientais desfavoráveis sem mudanças fisiológicas profundas sendo revertida rapidamente após as condições impostas serem revertidas. O mesmo autor define diapausa como uma mudança mais profunda e endógena mediada por sucessivas mudanças fisiológicas desencadeadas por pistas ambientais antecipadamente e seu fim não coincide obrigatoriamente com o término das condições de adversidade. O termo dormência abrange qualquer supressão de desenvolvimento adaptável que geralmente é acompanhada por uma supressão metabólica (KOŠTÁL, 2006).

A dormência em geral pode ser dividiva em três fazes distintas: pré-dormência, dormência e terminação da dormência. A pré-dormência é uma fase preparatória e se caracteriza por manter o desenvovlimento normal, porém os estímulos são acumulados (DANKS, 1987; KOŠTÁL, 2006; TAUBER; TAUBER; MASAKI, 1986). A partir do momento que é atingido ponto crítico e as mudanças fisiológicas e metabólicas são expressas, o inseto entra na fase de dormência e permanece assim por período programado ou reconhecer estimulos de mudanças ambientais (DANKS, 1987a; TAUBER; TAUBER; MASAKI, 1986). O término da dormência ocorre espontaneamente, promagramado ou via estímulos ambientais (DANKS, 1987a; MANSINGH, 1971). Este modelo simplificado representa em geral a sequência do fenótipo, porém é variável e peculiar à espécie.

A dormência pode ocorrer em qualquer fase de vida do inseto sendo espécie específica. Dormências embrionárias são comuns em muitos Lepidoptera, Hemiptera e em alguns Diptera, já na fase de larva é mais comumente reportado nos Lepidoptera, na fase de pupa é destacada em lepidópteros e dípteros, e por fim, dormência adulta é comum nas ordens Coleoptera, Hemiptera, Homoptera, Hymenoptera, Orthoptera e Neuroptera, bem como alguns Diptera e Lepidoptera

(DENLINGER, 2009). Em geral a dormência ocorre apenas uma única vez durante a vida dos insetos salvo raras exceções (TAUBER; TAUBER; MASAKI, 1986). Por exemplo, *Bombyx mori* possui dormência na fase embrionária, *Ostrinia nubilalis* no quinto estádio larval, *Hyalophora cecropia* em pupa e *Leptinotarsa decemlineata* como adulto (DENLINGER, 2009). A dormência pode ser obrigatória ou facultativa sendo dependente das características evolutivas da espécie ou do ambiente que ela ocupa.

Em Pentatomidae a indução da dormência pode ser desencadeada pelos fatores de fotoperíodo, temperatura, ou fator trófico, sendo o fotoperíodo (dias curtos) em ampla maioria das espécies estudadas o fator determinante (SAULICH; MUSOLIN, 2012). Contudo, existem espécies da família com dormência obrigatória na fase de ovo, como nas espécies *Apateticus cynicus* (JAVAHERY, 1994; JONES; COPPEL, 1963), *Picromerus bidens* (LARIVIERE; LAROCHELLE, 1961; MUSOLIN; SAULICH, 2000), na fase de ninfas *Pentatoma rufipes* (CASPERS, 1961) e em adultos nas espécies *Palomena angulosa* (HORI, 1986; HORI; KIMURA, 1993), *Menida scotti* ((KOSHIYAMA; FUJISAKI; NAKASUJI, 1994). A ampla maioria das espécies da família Pentatomidae expressa dormência facultativa na fase adulta induzida pelo fotoperído (SAULICH; MUSOLIN, 2012). Por outro lado, o fator temperatura isoladamente é reportado como indutor em *Andrallus spinidens* (SHINTANI et al., 2010). A ação conjunta de temperatura e fotoperíodo são relatados como fatores indutores em *Graphosoma lineatum* (JOHANSEN et al., 2010; MUSOLIN; SAULICH, 1995), *Scotinophara lurida* (LEE; AHN; KANG, 2001), *Podisus maculiventris* (MCPHERSON, 1982), *Aelia acuminata* L. (HODEK, 1977), *Acrosternum hilare* (MCPHERSON; TECIC, 1997). Também há casos onde a dormência é induzida por fotoperíodo juntamente com a escassez de alimento *G. rubrolineatum* (NAKAMURA; NUMATA, 1999), *Eu. rugosum* (IKEDA-KIKUE; NUMATA, 2001). Ou então a ação conjunta dos três fatores como em *Perillus bioculatus*, (HORTON; HINOJOSA; OLSON, 1998).

Em *E. heros* é observada dormência com repouso reprodutivo, redução alimentar e mudança comportamental na fase adulta. Adultos de ambos os sexos apresentam o fenômeno sazonalmente em região mais fria do Brasil (MOURÃO; PANIZZI, 2002). O principal indutor da dormência nesta espécie é o fotoperíodo (MOURÃO; PANIZZI, 2002). Mourão e Panizzi (2000a) relatam que as fases

sensíveis a indução de dormência em *E. heros* são de ovo ao 3º instar, sendo a fase crítica o 3º instar de desenvolvimento ninfal.

1.4 OBJETICO GERAL

O trabalho de SOARES et al. (2018) identificou duas linhagens alopátricas de *E. heros* provenientes de diferentes regiões do Brasil. Linhagens podem apresentar diferentes graus de isolamento reprodutivo e características adaptativas distintas promovendo diferentes respostas aos fatores bióticos e abióticos. Tendo em vista a escassez de estudos e as recentes descobertas sobre a estrutura populacional de *E. heros* no Brasil o objetivo geral deste trabalho foi estudar o isolamento reprodutivo e o comportamento de dormência das duas linhagens alopátricas de *E. heros*.

REFERÊNCIAS

CASPERS, H. **Land and Water Bugs of the British Isles.** London and New York: Akademie Verlag, Berlin, 1961. v. 46

CIVIDANES, F.; PARRA, J. R. Biologia em diferentes temperaturas e exigências térmicas de percevejos pragas da soja. II. *Euschistus heros* (Fabr.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 29, p. 1841–1846, 1 dez. 1994.

CORREA-FERREIRA, B. S.; DE AZEVEDO, J. Soybean seed damage by different species of stink bugs. **Agricultural and Forest Entomology**, v. 4, n. 2, p. 145–150, maio 2002.

CORRÊA-FERREIRA, B. S.; MACHADO, E. M.; HOFFMANN-CAMPO, C. B. **Sobrevivência e desempenho reprodutivo do percevejo marrom *Euschistus heros* (F.) na entressafra de soja**. Reunião de Pesquisa da Soja da Região Central do Brasil. **Anais**...Braília: 2010

CORRÊA-FERREIRA, B. S.; PANIZZI, A. R. Percevejos da Soja e seu Manejo. **Circular técnica/Embrapa CNPSo, ISSN 0100-6703 n.24**, p. 45, 1999.

DANKS, H. V. **Insect dormancy: an ecological perspective. Biological Survey of Canada (Terrestrial Arthorpods), Monograph Series**. Ottawa, p.439, 1987

DENLINGER, D. L. Diapause. In: RESH, V. H.; CARDÉ, R. T. (Eds.). . **Encyclopedia of Insects (Second Edition)**. Second Edi ed. San Diego: Academic Press, 2009. p. 267–271.

FROTA, R. T.; SANTOS, R. S. S. DOS. Pentatomídeos associados a cultivos de girassol no noroeste do estado do Rio Grande do Sul e ação de *Euschistus heros* (Fabricius, 1791) (Hemiptera: Pentatomidae) em aquênios. **Revista Biotemas**, v. 20, n. 4, p. 65–71, 2007.

GRAZIA, J. et al. Estudo das ninfas de pentatomídeos (Heteroptera) que vivem sobre soja (*Glycine max* (L.) Merrill): I – *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) e *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 9, p. 39–51, 1980.

GRAZIA, J.; FORTES, N.; CAMPOS, L. **Pentatomoidea. In: Brandão C, Cancello E (eds) Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. FAPESP**. [s.l.] FAPESP, 1999.

HODEK, I. Photoperiodic response in spring in three Pentatomidae (Heteroptera). **Acta Entomol. Bohemoslov**, v. 74, p. 209–218, 1977.

HORI, K. Effects of photoperiod on nymphal growth of *Palomena angulosa* Motschulsky (Hemiptera : Pentatomidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 21, n. 4, p. 597–605, 1986.

HORI, K.; KIMURA, A. Effects of Stationary photoperiod on diapause induction of *Eysarcoris lewisi* Distant (Heteroptera:Pentatomidae) and the developmental stage sensitive to stimulus for reproductive diapause. **Applied Entomology and Zoology**, v. 28, n. 1, p. 53–58, 1993.

HORTON, D. R.; HINOJOSA, T.; OLSON, S. R. Effects of photoperiod and prey type on diapause tendency and preoviposition period in *Perillus bioculatus* (Hemiptera: Pentatomidae). **The Canadian Entomologist**, v. 130, n. 03, p. 315–320, jun. 1998.

IKEDA-KIKUE, K.; NUMATA, H. Timing of diapause induction in the cabbage Bug *Eurydema rugosum* (Heteroptera: Pentatomidae) on different host plants. **Acta Soc. Zool. Bohemoslov.**, v. 65, p. 197–205, 2001.

JAVAHERY, M. Development of eggs in some true bugs (HEMIPTERA–HETEROPTERA). PART I. PENTATOMOIDEA. **The Canadian Entomologist**, v. 126, n. 02, p. 401–433, abr. 1994.

JOHANSEN, A. I. et al. Adaptive change in protective coloration in adult striated shieldbugs *Graphosoma lineatum* (Heteroptera: Pentatomidae): test of detectability of two colour forms by avian predators. **Ecological Entomology**, v. 35, n. 5, p. 602–610, out. 2010.

JONES, P. A.; COPPEL, H. C. Immature stages andbBiology of *Apateticus cynicus*

(Say) (Hemiptera: Pentatomidae). **The Canadian Entomologist**, v. 95, n. 07, p. 770–779, 31 jul. 1963.

KISHINO, K.; ALVES, R. T. **Relatório Técnico do Projeto Nipo-Brasileiro de Cooperação de Pesquisa Agropecuária. Pragas que atacam a soja na região dos Cerrados**. 1994.

KOSHIYAMA, Y.; FUJISAKI, K.; NAKASUJI, F. Mating and diapause in hibernating adults of *Menida scotti* Puton (Heteroptera: Pentatomidae). **Researches on Population Ecology**, v. 36, n. 1, p. 87–92, 1994.

KOŠTÁL, V. Eco-physiological phases of insect diapause. **Journal of Insect Physiology**, v. 52, n. 2, p. 113–127, 2006.

KRINSKI, D. et al. Oviposition preference of the neotropical brown stink bug *Euschistus heros* on artificial substrates of different colors. **Ciência Rural**, v. 43, n. 12, p. 2185–2190, dez. 2013.

LARIVIERE, M. C.; LAROCHELLE, A. Land and water bugs of the british isles. **Entomological news.**, v. 100, p. 133–146, 1961.

LEE, K.-Y.; AHN, K.-S.; KANG, H.-J. Host plants and life cycle of rice black bug, *Scotinophara lurida* (Burmeister) (Heteroptera: Pentatomidae). **Korean J. Appl. Entomol**, v. 40, n. 4, p. 309–313, 2001.

LEITE, N. A. et al. Pan-American similarities in genetic structures of *Helicoverpa armigera* and *Helicoverpa zea* (lepidoptera: Noctuidae) with implications for hybridization. **Environmental Entomology**, v. 46, n. 4, p. 1024–1034, 1 ago. 2017.

LOMBAERT, E. et al. Bridgehead effect in the worldwide invasion of the biocontrol harlequin ladybird. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9743, 17 mar. 2010.

MANSINGH, A. Physiological classification of dormancies in insects. **The Canadian Entomologist**, v. 103, n. 07, p. 983–1009, 31 jul. 1971.

MCPHERSON, J. E. **Pentatomoidea (Hemiptera) of Northeastern North America. Carbondale and Edwardsville**. Illinois: [s.n.].

MCPHERSON, J. E.; TECIC, D. L. Notes on the life histories of *Acrosternum hilare* and *Cosmopepla bimaculata* (Heteroptera: Pentatomidae) in Southern Illinois. **Great Lakes Entomol.**, v. 30, p. 79–84, 1997.

MOURÃO, A. P. M.; PANIZZI, A. R. Estágios ninfais fotossensíveis à indução da diapausa em *Euschistus heros* (Fabr.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 2, p. 219–225, jun. 2000.

MOURÃO, A. P. M.; PANIZZI, A. R. Photophase influence on the reproductive

diapause, seasonal morphs, and feeding activity of *Euschistus heros* (FABR., 1798) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE). **Braz. J. Biol**, v. 62, n. 2, p. 231–238, 2002.

MUSOLIN, D. L.; SAULICH, A. H. Summer dormancy ensures univoltinism in the predatory bug *Picromerus bidens*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 95, n. 3, p. 259–267, 1 jun. 2000.

MUSOLIN, D. L.; SAULICH, A. K. Factorial regulation of the seasonal cycle in the stink bug *Graphosoma lineatum* L. (Heteroptera, Pentatomidae).I. Temperature and photoperiodic responses. **Ėntomologicheskoe Obozrenie**, v. 74, n. 4, p. 736–743, 1995.

NAKAMURA, K.; NUMATA, H. Environmental regulation of abult diapause of *Graphosoma rubrolineatum* (Westwood) (Heteroptera : Pentatomidae) in southern and northern populations of Japan. **Applied Entomology and Zoology**, v. 34, n. 3, p. 323–326, 1999.

OLIVEIRA, C. M. G. DE et al. Relationship between pod permeability and seed quality in soybean. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 3, p. 273–281, 9 set. 2014.

PANIZZI, A. R. Growing problems with stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae): Species invasive to the U.S. and potential Neotropical invaders. **American Entomologist**, v. 61, n. 4, p. 223–233, 8 dez. 2015.

PANIZZI, A. R.; NIVA, C. C. Overwintering strategy of the brown stink bug in northern Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 29, p. 509–511, 1994.

PANIZZI, A. R.; SLANSKY, J. F. Review of Phytophagous Pentatomids (Hemiptera : Pentatomidae) Associated with Soybean in the Americas. [s.l.] Florida Entomological Society, 1985. v. 68

PANIZZI, A. R.; VIVAN, L. M. Seasonal abundance of the neotropical brown stink bug, *Euschistus heros*, in overwintering sites, and the breaking of dormancy. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 82, n. 2, p. 213–217, 1 fev. 1997.

PINTO, S. B.; PANIZZI, A. R. Performance of nymphal and adult *Euschistus heros* (F.) on milkweed and on soybean and effect of food switch on adult survivorship, reproduction and weight gain. **An. Soc. Entomol**, v. 23, p. 549–555, 1994.

SALUSO, A. et al. An invasive pentatomid pest in Argentina: neotropical brown stink bug, *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 6, p. 704–705, 2011.

SAS. **SAS/STAT User's Guide, Version 9.1.** Cary, NC, USA. SAS Institute, , 2002.

SAULICH, A. K.; MUSOLIN, D. L. Diapause in the seasonal cycle of stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae) from the Temperate Zone. **Entomological Review**, v. 92, n. 1, p. 1–26, mar. 2012.

SHINTANI, Y. et al. Seasonal occurrence and diapause induction of a predatory bug *Andrallus spinidens* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Entomological Science**, v. 13, n. 3, p. 273–279, 26 set. 2010.

SMANIOTTO, L. F.; PANIZZI, A. R. Interactions of selected species of stink bugs (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) from leguminous crops with plants in the Neotropics. **Florida Entomologist**, v. 98, n. 1, p. 7–17, mar. 2015.

SOARES, P. L. et al. The reunion of two lineages of the Neotropical brown stink bug on soybean lands in the heart of Brazil. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2496, 6 dez. 2018.

SORIA, M. F.; DEGRANDE, P. E.; PANIZZI, A. R. **Symptoms, injuries, yield reduction and quality loss of cotton attacked by the neotropical brown stink bug Euschistus heros (F.) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)**. Beltwide Cotton Conferences. **Anais**...Atlanta-GA: 2011Disponível em: <http://www.percevejos.com.br/wp-content/themes/somax/images/trabalhos/arquivos/Trabalho50.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2018

SOSA-GOMEZ, D. R. et al. Genetic differentiation among Brazilian populations of *Euschistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae) based on RAPD analysis. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 2, p. 179–187, abr. 2004.

SOSA-GÓMEZ, D. R.; SILVA, J. J. DA. Neotropical brown stink bug (*Euschistus heros*) resistance to methamidophos in Paraná, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 7, p. 767–769, jul. 2010.

TAUBER, M. J.; TAUBER, C. A.; MASAKI, S. **Seasonal Adaptations in Insects**. Oxford: Oxford University Press, 1986.

VILLAS-BÔAS, G. L.; PANIZZI, A. R. Biology of *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) on soyabean (Glycine max (L.) Merrill). **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, v. 9, n. 1, p. 105–113, 1980.

VIVAN, L. M.; DEGRANDE, P. E. Pragas da Soja. In: **Tecnologia e Produção: Soja e Milho 2011/2012**. Dourados: [s.n.]. v. 5p. 155–206.

YANG, C.-C. et al. Propagule pressure and colony social organization are associated with the successful invasion and rapid range expansion of fire ants in China. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 4, p. 817–833, 1 fev. 2012.

ZAMBIAZZI, E. V. et al. Controle biológico in-vitro do percevejo-marrom (*Euschistus heros*) com *Beauveria bassiana*. **Revista Trópica: Ciencias Agrárias e Biológicas**, v. 5, n. 3, p. 43, 2011.

24 .

2 INCOMPATIBILIDADE REPRODUTIVA ENTRE LINHAGENS ALOPÁTRICAS DE *Euschistus heros* F. (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

Resumo

O percevejo-marrom-da-soja, *Eushistus heros* F. (Hemiptera: Pentatomidae) é uma das pragas mais importantes da cultura da soja. Recentemente foi reportado a ocorrência de duas linhagens alopátricas de *E. heros*, uma de ocorrência prevalente na região da Floresta Amazônica e Caatinga e outra na Mata Atlântica e Pampas, com uma região de sobreposição das duas linhagens na região do Cerrado. O encontro de dois pools gênicos pode representar aumento ou diminuição de vigor das populações na ausência de isolamento reprodutivo. O encontro das linhagens no Cerrado é uma hipótese para o aumento expressivo da espécie em cultivos de soja e ampliação de problemas na cultura do algodão. Assim, o presente trabalho teve como objetivo verificar a presença de barreiras reprodutivas entre as duas linhagens por meio de uma prole híbrida de baixo fitness. Cruzamentos recíprocos foram realizados com intuito de avaliar o desenvolvimento da prole híbrida quando comparada com a prole coespecífica. Os parâmetros biológicos e de tabela de vida evidenciaram que o cruzamento entre as duas linhagens não representou diminuição de fitness da prole híbrida, portanto, não existe incompatibilidade pós-zigótica entre as linhagens de *E. heros*. Assim, o encontro de dois pools gênicos onde não há barreira reprodutiva aumenta a diversidade genética nas populações e permite a combinação de alelos que podem aumentar o vigor das populações e a capacidade de adaptação a ambientes novos e perturbados, como o ambiente agrícola. Coincidentemente, os surtos populacionais e falhas de controle reportadas em *E. heros* são frequentemente relatados em regiões de ampla mistura e, tudo indica hibridização, entre as duas linhagens de *E. heros*. Esses resultados podem guiar o desenvolvimento de novas estratégias de controle que buscam um manejo mais sustentável de *E. heros* no agroecosistema brasileiro.

Palavras-chave: Vigor híbrido; Cruzamentos recíprocos; Percecevejo-marrom-da-soja; Tabela de vida de fertilidade

Abstract

The soybean brown sting bug, *Eushistus heros* f. (Hemiptera: Pentatomidae) is one of the most important pests of the soybean crop. It was recently reported the occurrence of two allopatric lineages of *E. heros*, one of prevalent occurrence in the Amazon Forest and Caatinga region and another in the Atlantic Forest and Pampas, with an overlapping region in the Cerrado region. The reunion of two gene pools may represent an increase or decrease in the vigor of populations if reproductive isolation is absent. The meeting of the lineages in the Cerrado is a hypothesis for the

expressive increase of the species in soybean cultivations and expansion of problems in the cotton crop. Thus, the present study aimed to verify the presence of reproductive barriers between the two lineages by means of a low fitness hybrid offspring. Reciprocal crosses were performed with the purpose of evaluating the development of the hybrid offspring when compared to the co-specific offspring. The fertility life table parameters showed that the crossbreeding between the two lineages did not represent a decrease in the fitness of the hybrid offspring, so there is no post-zygotic incompatibility among *E. heros* lineages. Thus, the reunion of two gene pools where there is no reproductive barrier increases the genetic diversity among populations and allows the combination of alleles that can increase the vigor of populations and the ability to adapt to new and disturbed environments, such as the agricultural environment. Coincidentally, population outbreaks and control failures reported in *E. heros* are often reported in regions of wide mixture and, evidently, hybridization between the two lineages of *E. heros*. These results may guide the development of new control strategies that seek more sustainable management of *E. heros* in the Brazilian agroecosystem.

Keywords: Hybrid vigor; Reciprocal crosses; Soybean brown stink bug; Fertility life table.

2.1. Introdução

A soja (*Glycini max* L.), é uma das culturas agrícolas de maior importância econômica do Brasil ocupando área superior a 35 milhões de hectares com produção estimatida de 116 milhões de toneladas na safra 2017-2018 (CONAB, 2018). Dentre as pragas que acometem a soja, os percevejos fitófagos (complexo-percevejo da soja) são uma das principais pragas na cultura, especialmente durante o período reprodutivo (PIAS et al., 2017). Dentre as espécies de percevejos fitófagos que acometem a soja, *Eushistus heros* é a de maior importância por alimentar-se das estruturas reprodutivas causando danos diretos (sucção de seiva) e indiretos (redução de vigor da semente). Na década de 70 a ocorrência da espécie era esporádica sendo considerada praga secundária, porém atualmente é praga chave na cultura da soja, principalmente nas regiões do Cerrado brasileiro. Historicamente, a mudança de status de *E. heros* para praga primária é atribuída a fatores como expansão do cultivo da soja, cultivo de plantas geneticamente modificados e o aumento de adesão do sistema de cultivo plantio direto.

No entanto, recentemente Soares et al. (2018) identificaram a existência de duas linhagens alopátricas de *E. heros* no Brasil. A primeira de ocorrência predominate no Sul do Brasil, na região dos Pampas e Mata Atlântica e a segunda

de ocorrência no Norte/Nordeste do Brasil com ocorrência na região da Floresta Amazonica e Caatinga. Estima-se que a divergência entre as duas linhagens ocorreu a 4,5 milhões de anos. Na região do Cerrado as duas linhagens ocorrem simultaneamente (SOARES et al., 2018) e a hibridização entre essas duas linhagens pode ser mais um fator que favoreceu a recente explosão populacional de *E. heros* no Cerrado brasileiro, umas das principais fronteiras agrícolas da soja. A hipótese se baseia no fato que a região de reencontro das duas linhagens coincide com a região que vem registrando explosões populacionais da espécie. Assim, hibridização pode ser sugerida como um fator de incremento do vigor das populações que ocorrem na região. O encontro de dois pools genéticos diferentes, que não possuem isolamento reprodutivo, podem gerar populações de amplo vigor e de grande capacidade adaptativa capazes de se estabelecer em grande número mesmo em ambientes perturbados como os ambientes agrícolas (LOMBAERT et al., 2010; RAGLAND et al., 2015; YANG et al., 2012).

Quando dois pools genéticos sem isolamento reprodutivo se encontram, é comum haver um aumento do vigor hibrido devido a redução da frequência de alelos deletérios e interações benéficas oriundas da combinação de alelos anteriormente isolados em novas populações de um organismo (BARTON; HEWITT, 1989; GOMPERT; PARCHMAN; BUERKLE, 2012; HARRISON; LARSON, 2014). A compatibilidade reprodutiva e as trocas adaptativas entre as linhagens podem gerar fenótipos híbridos altamente adaptados (FITZPATRICK; SHAFFER, 2007). Por outro lado, híbridos também podem apresentar diminuição de seu fitness, caso as diferenças acumuladas durante o período de isolamento reprodutivo gerem incompatibilidades entre genes e consequentemente entre fenótipos (BARTON; HEWITT, 1989; SHAW, 1981).

A especiação decorre via acúmulo de barreiras reprodutivas até atingir completo isolamento reprodutivo. Em geral mais de uma barreira evolui até linhagens serem completamente isoladas, porém este fenômeno é variável entre grupos não se sabendo ao certo em que ponto da história evolutiva as barreiras reprodutivas são formadas (DOPMAN; ROBBINS; SEAMAN, 2009; WELLENREUTHER; VERCKEN; SVENSSON, 2010). Assim, para verificar se existe isolamento reprodutivo entre as linhagens alopátricas de *E. heros*, nosso objetivo foi avaliar o fitnnes da prole híbrida obtida de acasalamentos recíprocos entre as diferentes linhagens de *E. heros*.

2.2 Materiais E Métodos

2.2.1 Coleta e manutenção de populações de *E. heros* em laboratório

Foram realizadas coletas de populações de *E. heros* nas regiões Sul e Nordeste do Brasil. Na região Sul uma coleta foi realizada em Itapiranga, Santa Catarina (S - 27.144888 - O 53.731349). Na região Nordeste a coleta foi realizada em Balsas, Maranhão (S -7.229028 O-45.976479). As coletas dos espécimes foram realizadas em áreas de cultivos de soja. Após coleta os percevejos foram transportados e duas populações estabelecidas no Laboratório de Ecologia Molecular de Artrópodes nas dependências do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ-USP (Piracicaba, São Paulo, Brasil). As populações foram acondicionadas separadamente de acordo com local de coleta em gaiolas com as dimensões 36,5 x 25,5 x 14,4 cm (comprimento, largura e altura, respectivamente) e tampa telada com tecido organza. Massas de ovos foram acondicionadas em placas de Petri com raio de 4,5 centímetros. Ninfas após eclosão foram mantidas na placa até atingir 2º instar e posteriormente transferidas para gaiolas com dimensões 15,5 x 15,5 x 8,0 cm com tampa telada com tecido voil até atingir fase adulta. Após atingir fase adulta foram acondicionados em gaiolas de dimensões de 36,5 x 25,5 x 14,4 cm.

Foi oferecida dieta natural (grãos secos de soja (*Glycine max* L.), amendoim (*Arachis hypogaeae* L.) girassol (*Helianthus annuus* L.) e vagens de feijão verde (*Phaseolus vulgaris* L.) e água às populações de *E. heros*. As populações foram mantidas sob temperatura constante de 25 ± 1 ºC, umidade relative 60 ± 10 % com fotofase de 14h e escotofase de 10h.

2.2.2 Identificação molecular das linhagens de *E. heros*

Para identificação das linhagens foram utilizados marcadores moleculares mitocondriais do fragmento do gene Citocromo Oxidase I (COI) desenhados especificamente para o *E. heros* (5'-GTGGCTGATGTGAAGTATGCTC-3') e (5'-ACCGCACATGCATTTGTAATAA-3'). Doze indivíduos de cada população foram utilizados para identificação molecular da linhagem. Precedendo a amplificação dos fragmentos gênicos foram realizadas extrações de DNA seguindo o protocolo adaptado CTAB (DOYLE; DOYLE, 1990) descrito a seguir. Após retirada das amostras de tecido do álcool estas foram mantidas a temperatura ambiente para

permitir evaporação do etanol. O tecido da cabeça dos insetos foi macerado em tubos de 1,5 mL com nitrogênio líquido. Ao tubo contendo tecido macerado foram adicionados 512 µL de tampão de extração (500 µL de CTAB 2 %, 2 µL de β-mercapto-etanol e 10 µL de proteinase K (10mg/mL)) e nova maceração foi feita. Em seguida a solução foi colocada em vortex durante 10 segundos e incubado a 65 ºC durante 2 horas. Após adicionou-se 3 µL de RNAse (10 mg/mL), breve agitação em vortex e incubado a 37 ºC durante 3 horas. Após incubação a solução foi centrifugada a 13 mil rpm durante 5 minutos. Adicionou-se CIA (clorofórmio-álcool isoamílico 24:1) e centrifugou-se durante 20 minutos a 13 mil rpm. Em seguida transferiu-se a fase aquosa com uso de pipeta para novo tubo de 1,5 mL e repetiu-se a etapa do CIA. O sobrenadante foi transferido para novo tubo de 1,5 mL, adicionou-se 400 µL de isopropanol e incubou-se a -20 ºC por 8 horas. Após centrifugou-se a 13 mil rpm durante 30 minutos. Adicionou-se 500µL de etanol (PA), centrifugação durante 5 minutos a 13 mil rpm para lavar o pellet. Em seguida desprezou-se o liquido com cuidado para não perder o pellet. Repetiu-se a lavagem com etanol. O pellet foi mantido a temperatura ambiente durante 3 horas para secar. Em seguida o DNA foi resuspendido em água ultra pura autoclavada. A qualidade das amostras foi verificada via eletroforese e fotodocumentação.

As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25 µL contendo 80 ng de DNA total, 1,5 mM / µL de $MgCl_2$, 0,1 mM / µL de dNTPs, 0,4 pmol / µL de cada iniciador, 1 U de Taq DNA Polymerase e Tampão (10X Taq DNA Buffer). Os ciclos de PCR consistiram em desnaturação a 95 ° C durante 3 min, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 95 °C durante 30 s, anelamento a 54 °C durante 40 s, amplificação a 72 °C durante 1,5 min e extensão final a 72 °C por 10 min. Posteriormente, os produtos de PCR foram verificados via eletroforese utilizando gel de agarose (1,5% p / v) e fotodocumentados. Após amplificação as amostras passaram por purificação utilizando 0,33 µL de EXOI, 0,33 µL de FastAp e 0,34 µL de água ultrapura, juntamente com 10 µL de produto de PCR, mantidos a 37 °C durante 30 min, após a 80 °C durante 15 min. Em seguida foram adicionados 2,5 µL do iniciador. As amostras preparadas foram sequenciadas em sequenciador modelo Sanger no Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ, Universidade de São Paulo. As sequências obtidas foram alinhadas e editadas, caso necessário, no aplicativo Sequencher 4.1 (Gene Codes Corporation). Para confirmar a presença das linhagens Norte e Sul nas populações coletadas. Uma análise filogenética

utilizando o algoritmo de Verossimilhança foi rodada utilizando os indivíduos sequenciados no aplicativo MEGA X (KUMAR et al., 2018) com 10000 repetições e com o modelo evolutivo GTR+G+I.

2.2.3 Cruzamentos recíprocos entre linhagens de *E. heros*

Cruzamentos recíprocos foram realizados para verificar se existe algum isolamento reprodutivo entre as duas linhagens de *E. heros*. Os cruzamentos foram realizados com indivíduos adultos virgens selecionados aleatoriamente das populações Sul (Itapiranga SC) e Nordeste (Balsas MA) de laboratório. Os cruzamentos foram compostos de quatro tratamentos, T1, T2, T3 e T4 onde T1: fêmea Sul x macho Sul (♀Sx♂S); T2: fêmea Sul x macho Norte (♀Sx♂N); T3: fêmea Norte x macho Sul (♀Nx♂S); T4: fêmea Norte x macho Norte (♀Nx♂N). T1 e T4 são os tratamentos controle. Cada tratamento foi constituído de 15 repetições (15 casais). Os casais foram acondicionados em potes transparentes de polietileno com capacidade de 500 mL com tampa telada e substrato de postura (tecido de algodão cru). As condições ambientais dos ensaios foram 25 ± 1ºC, umidade relativa 60 ± 10% fotoperíodo (14 h luz, 10 h escuro). Dieta natural e água foi oferecida aos casais sem restrição.

Foram observados os parâmetros biológicos: período de pré-oviposição, número de posturas por fêmea, número de ovos por postura, período de incubação/desenvolvimento e viabilidade de ovos e fases imaturas (ninfas), período de desenvolvimento e viabilidade ovo-adulto, mortalidade diária de machos e fêmeas e a relação sexual (♀/ ♀+♂) da prole.

Os dados biológicos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, em delineamento inteiramente casualizado. Os dados foram analisados com o programa Past 3 (HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, 2001). A partir dos dados biológicos utilizando o método Jackknife foi possível estimar os parâmetros de tabela de vida de fertilidade - a taxa líquida de reprodução (Ro), o tempo médio de duplicação (TD), o intervalo médio entre geração (T), a taxa intrínseca de aumento (Rm) e a razão finita de aumento (λ) - (MAIA; LUIZ; CAMPANHOLA, 2000) e as comparações foram feitas com o teste t bilateral (“Lifetable.sas” SAS Institute, 2002).

As equações utilizadas para estimar os parametros propostos foram as seguintes:

$$R_0 = \sum l_x \, m_x$$

$$\mathbf{T} = \frac{\sum \mathbf{l_x \, m_x \, x}}{\mathbf{\Sigma \, l_x \, m_x}}$$

$$TD = \frac{Ln(2)}{(Rm)}$$

$$R_m = \frac{Ln \, R_m}{T}$$

$$\lambda = e^{-R_m}$$

Em que, x é a idade do indivíduo no tempo (idade do individuo no tempo o intervalo entre dois períodos de tempo consecutivos é representado pelo seu ponto médio, ou seja, a idade feminina mais 0,5), lx a sobrevivência específica e mx a fertilidade específica.

2.3 Resultados

2.3.1 Identificação molecular das linhagens de *E. heros*

O sequenciamento do gene mitocondrial COI confirmou a presença das duas linhagens alopátricas de *E. heros* nas populações de *E. heros* utilizadas no presente trabalho. Entre os 23 indivíduos (11 de Balsas-MA e 12 de Itapiranga-SC) que tiveram um fragmento de gene COI amplificados e sequenciado com sucesso, a respectivas linhagens foram corretamente associadas com a distribuição geográfica: Linhagem Norte para Balsas-MA e Linhagem Sul para Itapiranga-SC (Figura 1).

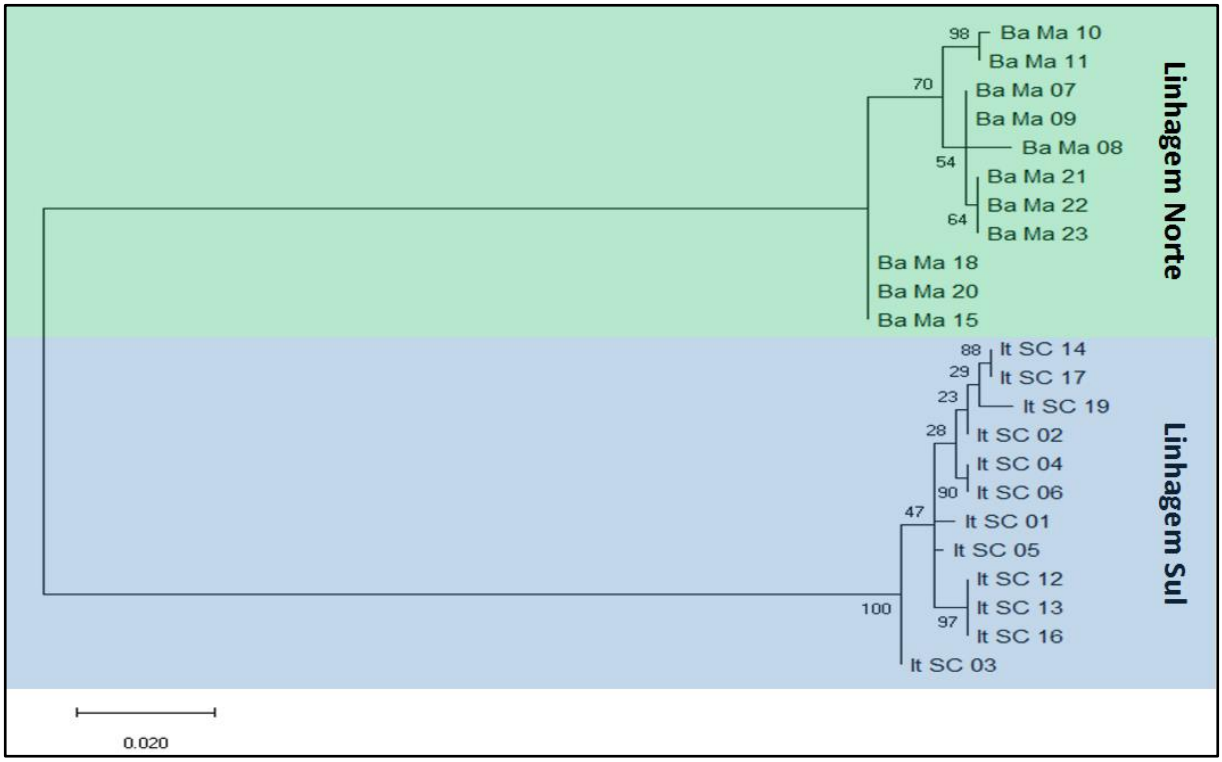

Figura 1. Análise filogenética de verossimilhança de um fragmento do gene Citocromo c oxidase Subunidade I (COI) de duas diferentes populações de *E. heros*.

2.3.2 Cruzamentos recíprocos entre linhagens de *E. heros*

Os parâmetros biológicos: período de pré oviposição, total de fêmeas que ovipositaram, número de oviposições por fêmea e número de ovos por oviposição não diferem entre os cruzamentos coespecificos e recíprocos das duas linhagens de *E. heros* (Tabela 1). O perído de pré oviposição variou de 14,08±0,90 (♀Sx♂S) à 15,46±2,10 (♀Nx♂S). O total de fêmeas que ovipositaram ocilou entre 73,33 % (♀N x ♂N) a 93,33 % (♀S x ♂N), fêmeas que não ovipositaram morreram antes do início da oviposição. O número de oviposições por fêmea foi de 18,77±3,12, 12,42±2,03, 22,38±4,04 e 9,91±2,10 para ♀Sx♂S, ♀Sx♂N, ♀Nx♂S e ♀Nx♂N, respectivamente. O número de ovos por oviposição variou de 6,16±0,91 (♀Nx♂N) a 9,48±1,12 (♀Sx♂N).

Tabela 1. Período de pré-oviposição, número de oviposição por fêmea e número de ovos por oviposição de cruzamentos coespecíficos e recíprocos de duas linhagens de *E. heros*. [a] SE (erro padrão). [b] Médias seguidas pela mesma letra em uma coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamento	Pré oviposição (dias)	Fêmeas que ovipositaram (%)	Oviposições/ fêmea	Número de ovos/oviposição
♀S x ♂S	14,08 ± 0,90[a]a[b]	86,00	18,77± 3,12 a	8,32 ± 0,72 a
♀S x ♂N	14,93 ± 2,01a	93,33	12,42± 2,03 a	9,48 ± 1,12 a
♀N x ♂S	15,46 ± 2,10a	86,00	22,38± 4,04 a	9,40 ± 0,70 a
♀N x ♂N	14,27 ± 1,92a	73,33	9,91± 2,10 ab	6,16 ± 0,91 a

O número total de ovos por fêmea que ovipositaram não diferiu, porém ocilou nos cruzamentos cooespeíficos de 144±28,04 e 60±3,98 (♀Sx♂S e♀Nx♂N, respectivamente) e recíprocos de 103±18,00 e 217±45,63 (♀Sx♂N, ♀Nx♂S, respectivamente) (Tabela 2). Para o parâmetro longevidade de fêmeas e machos não se observou diferença significativa entre tratamentos. A longevidade dos machos do cruzamento recíproco ♀Sx♂N foi de 40,27±4,28, inferior ao das fêmeas 52,33±6,89, nos demais cruzamentos as os machos foram mais longevos (Tabela 2).

Tabela 2. Total de ovos por fêmea, longevidade de fêmeas e machos e razão sexual da prole de cruzamentos recíprocos e coespecíficos de duas linhagens de *E. heros*. [a] SE (erro padrão). [b] Médias seguidas pela mesma letra em uma coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamento	Total/ovos/fêmea		Longevidade		♀/♀+♂
	Todas as fêmeas	Fêmeas que ovipositaram	Fêmeas	Machos	Razão Sexual
♀S x ♂S	124,87±27,49 [a]a[b]	144±28,04a	53,13±8,38a	65,00±6,53a	0,46 ± 0,05a
♀S x ♂N	96,40±18,07a	103±18,00ab	52,33±6,89a	40,27±4,28ab	0,61 ± 0,05a
♀N x ♂S	188,20±43,90a	217±45,63a	45,60±6,76a	65,45±6,50a	0,48 ± 0,04a
♀N x ♂N	44,53±12,38ab	60±13,98ab	34,13±4,30a	54,53±7,81a	0,45 ± 0,07a

O tempo de desenvolvimento das fases imaturas da prole dos cruzamentos coespecíficos e recíprocos não difere entre tratamentos (Tabela 3). Os dias de incubação dos ovos foram semelhantes para os quatro tratamentos demandando 5,75±0,13 (♀Sx♂N) a 6,31±0,19 (♀Nx♂N) dias. O tempo de desenvolvimento do primeiro instar variou de 3,63±0,13 a 4,18±0,23 dias (♀Sx♂S e ♀Nx♂S, respectivamente). Para completar o desenvolvimento do segundo instar a prole dos cruzamentos demandou de 4,78±0,47 (♀Nx♂N) a 6,37±0,48 (♀Sx♂S) dias. O terceiro instar apresentou médias entre 5,20±0,32 e 6,69±1,24 dias (♀Sx♂N e ♀Nx♂N, respectivamente). Para completar o desenvolviemnto do quarto instar os

tratamentos variaram entre 5,14±0,36 (♀Nx♂S) a 6,13±0,62 (♀Nx♂N) dias. Na quinta fase jovem foi verificado variação de 8,00±0,43 a 8,57±0,44 dias (♀Sx♂N e ♀Sx♂S, respectivamente). O período necessário para desenvolvimento ovo-adulto foi de 35,89±0,50 dias para ♀Sx♂S, 33,74±0,35 dias para ♀Sx♂N, 36,16±0,63 dias para ♀Nx♂S e 37,47±1,41 dias para ♀Nx♂N, sem diferença significativa.

Tabela 3. Tempo de desenvolvimento e viabilidade de fases imaturas (ninfas) da prole oriundos de cruzamentos coespecíficos e recíprocos de duas linhagens de *E. heros*. [a] SE (erro padrão). [b] Médias seguidas pela mesma letra em uma coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tempo de desenvolvimento (dias)							
Tratamento	Fase de ovo	1º instar	2º instar	3º instar	4º instar	5º instar	Ovo-Adulto
♀Sx♂S	5,89±0,16[a] a[b]	3,63±0,13a	6,37±0,48a	5,50±0,40a	5,76±0,29a	8,57±0,44a	35,89±0,50a
♀Sx♂N	5,75±0,13a	3,74±0,26a	5,47±0,42a	5,20±0,32a	5,82±0,26a	8,00±0,43a	33,74±0,35a
♀Nx♂S	6,10±0,24a	4,18±0,23a	5,16±0,32a	5,43±0,43a	5,14±0,36a	8,33±0,43a	36,16±0,63a
♀Nx♂N	6,31±0,19a	3,93±0,48a	4,78±0,47a	6,69±1,24a	6,13±0,62a	8,25±0,68a	37,47±1,41a
Viabilidade (%)							
Tratamento	Fase de ovo	1º instar	2º instar	3º instar	4º instar	5º instar	Ovo-Adulto
♀Sx♂S	77,95±3,68a	90,80±2,01a	69,93±8,35a	97,25±25,42a	68,07±7,82ab	95,80±3,24a	31,86±7,07a
♀Sx♂N	84,27±2,84a	80,75±7,03a	79,13±7,96a	89,69±5,97a	82,53±6,45a	93,96±4,03a	39,59±12,69a
♀Nx♂S	84,61±3,38a	68,93±4,72ab	77,79±5,30a	77,09±5,76a	94,51±3,68a	74,44±5,99a	20,66±5,72a
♀Nx♂N	73,70±4,60a	76,42±6,76a	69,39±8,02a	63,61±12,09a	81,07±13,41a	88,37±4,51a	19,83±6,38a

A viabilidade das fases jovens da prole híbrida e coespecífica não expressou diferença siginificativa quando comparados os quatro tratamentos (Tabela 3). As viabilidades observadas na fase de ovo foram de 73,70±4,60 % e 77,95±3,68 % para cruzamento ♀Nx♂N e ♀Sx♂S e 84,27±2,84 % e 84,61±3,38 % para os cruzamentos ♀Sx♂N, ♀Nx♂S, respectivamente. Para o primeiro instar a viabilidade foi de 90,80±2,01 % (♀Sx♂S), 80,75±7,03 % (♀Sx♂N), 68,93±4,72 % (♀Nx♂S) e 76,42±6,76 % (♀Nx♂N). No segundo instar a viabilidade foi de 69,93±8,35%, 79,13±7 %, 77,79±5,30 %, 69,39±8,02 % (♀Sx♂S, ♀Sx♂N, ♀Nx♂S e ♀Nx♂N, respectivamente). A viabilidade do terceiro instar variou de 63,61±12,09 % (♀Nx♂N) a 97,25±25,42 % (♀Sx♂S). O quarto instar teve uma variação de 68,07±7,82 %

(♀Sx♂S) à 94,51±3,68% (♀Nx♂S). No quinto instar a viabilidade foi de 95,80±3,24 % e 93,96±4,03 % quando a fêmea foi da linhagem Sul (♀Sx♂S, ♀Sx♂N, respectivamente) e de 74,44±5,99 % a 88,37±4,51 % quando a fêmea foi da linhagem Norte (♀Nx♂S e ♀Nx♂N, respectivamente). O menor valor de viabilidade ovo-adulto foi observado para cruzamentos com fêmeas da linhagem Norte com 19,83±6,38 % e 20,66±5,72 % de viabilidade (♀Nx♂N e ♀Nx♂S, respetivamente). A viabilidade ovo-adulto para cruzamentos com fêmeas da linhagem Sul foi de 39,59±12,69 % (♀Sx♂S) e 33,74±0,35 % (♀Sx♂N).

A razão sexual da prole híbrida e coespecífica não diferiu significativamente entre tratamentos. Foi observada razão sexual de 0,46±0,05, 0,61±0,05, 0,48±0,04 e 0,45±0,07 para os cruzamentos ♀Sx♂S, ♀Sx♂N, ♀Nx♂S e ♀Nx♂N, respectivamente (Tabela 2).

Os parâmetros estimados da tabela de vida de fertilidade (TBVF) diferem entre cruzamentos (Tabela 4). O cruzamento coespecífico ♀N x ♂N difere dos cruzamentos ♀S x ♂S, ♀S x ♂N, ♀N x ♂S para todos os parâmetros da tabela de vida de fertilidade exceto para o parâmetro T. Os parâmetros dos cruzamentos recíprocos foram iguais ou superiores quando comparados com os cruzamentos cooespecíficos.

O parâmetro R_0 (taxa líquida de reprodução), que representa a taxa de aumenta da população em cada geração, foi de 19,119 para ♀S x ♂S, 23,898 para ♀S x ♂N, 20,178 para ♀N x ♂S e 4,187 para ♀N x ♂N onde cruzamento coespecífico da linhagem Norte diferiu dos demais tratamentos. Para o parâmetro TD (tempo de duplicação), que representa o tempo necessário para dupliar a população, o cruzamento ♀N x ♂N demanda 12,103 dias, enquanto que, os cruzamentos ♀S x ♂S, ♀S x ♂N e ♀N x ♂S demandam 6,029, 4,909 e 6,116 dias para duplicar respectivamente, os resultados diferem entre si. O parâmetro T (intervalo médio entre geração), não diferiu entre nenhum cruzamento oscilando entre 22,218 (♀S x ♂N) e 26,805 (♀N x ♂S) dias. Para R_m (taxa intríseca de aumento), a capacidade inata de aumentar em número, os cruzamentos ♀S x ♂S, ♀S x ♂N, ♀N x ♂S aumentam 0,114, 0,14117 e 0,113, respectivamente, taxas significativamente superiores ao cruzamento ♀N x ♂N, com R_m de 0,057. O parâmetro λ (taxa finita de aumento), que representa o número de indivíduos adicionado à população por fêmea e que dará fêmea, o cruzamento ♀N x ♂N apresentou λ de 1,058, λ

significativamente inferior aos cruzamentos ♀S x ♂S, ♀S x ♂N e ♀N x ♂S (1,121, 1,151 e 1,120, respectivamente).

Tabela 4. Tabela de vida de fertilidade dos cruzamentos recíprocos e coespecíficos de duas linhagens de *E. heros* (método jackknife). [a] taxa reprodutiva líquida (Ro), tempo de duplicação (TD), intervalo médio entre geração (T), taxa intrínseca de aumento (Rm), taxa finita de aumento (λ); [b] médias seguidas pela mesma letra em uma coluna não diferem pelo teste t de student bilateral.

Tratamento	R_0[a]	TD (dias)	T (dias)	Rm	Lambda (λ)
♀S x ♂S	19,119a[b]	6,029a	25,460a	0,114a	1,121a
♀S x ♂N	23,898a	4,909a	22,218a	0,141a	1,151a
♀N x ♂S	20,178a	6,116a	26,805a	0,113a	1,120a
♀N x ♂N	4,187b	12,103b	25,678a	0,057b	1,058b

2.4 Discussão

Nossos resultados não indicaram isolamento reprodutivo entre as lihagens de *E. heros* em condições de laboratório e a hibridação entre as duas linhagens foi observada. Os parâmetros relacionados aos progenitores utilizados nos cruzamentos aqui definidos: período de pré-oviposição, número de oviposições, número de ovos por oviposição, total de ovos por fêmea e longevidade não diferem nos cruzamentos coespecíficos e recíprocos.

O período de pré-oviposição dos cruzamentos coespecíficos e recíprocos não diferem entre si. O período de pré-oviposição encontrado é inferior ao resultado de FORTES et al. (2006) que observaram 18,6 dias de pré-oviposição de *E. heros* em condições laboratoriais. Por outro, AZAMBUJA; DEGRANDE; PEREIRA, (2013) verificaram 9,76 dias de pré-oviposição período inferior ao encontrado neste trabalho. Pode-se observar que o período de pré-oviposição é variável entre populações da espécie, porém, verifica-se que as duas linhagens demandam período de pré-oviposição muito similar quando expostas às mesmas condições ambientais e alimentares.

A fertilidade das fêmeas utilizadas nos cruzamentos foi avaliada através de três parâmetros, número de oviposições, número de ovos por oviposição, total de ovos por fêmea. Os parâmetros não expressaram diferença significativa entre cruzamentos bem como linhagens e o número de ovos por oviposição muito pouco

ocilou entre tratamentos. Os valores foram inferiores aos encontrados em trabalhos com dieta natural com 266 e 453 ovos por fêmea encontrados por AZAMBUJA; DEGRANDE; PEREIRA, (2013) e FORTES et al., (2006), respectivamente. Embora ser observado variação na fertilidade das fêmeas estas não foram significativas representando que as duas linhagens de *E. heros* não se distinguem no que se refere a fertilidade.

A longevidade dos machos e fêmeas também não diferiu entre as duas linhagens. A longevidade dos adultos deste estudo foi menor que à encontrada por AZAMBUJA; DEGRANDE; PEREIRA, (2013) que foi de 83.2±12.13 e 72.0±15.76 dias (fêmeas e machos, respectivamente) e FORTES et al., (2006) que foi de 97.3 ± 6.89 e 98.0 ± 6.48 dias (fêmeas e machos, respectivamente). A longevidade maior dos machos, exeto para o tratamento três, corrobora com VILLAS-BÔAS; PANIZZI, (1980) que apontam menor longevidade de fêmeas em virtude dos gastos energéticos que a fêmea demanda para oviposição. A cópula é outro fator relacionado com longevidade em que indivíduos virgens de *E. heros* vivem mais quando comparados aos que copulam (COSTA et al., 1998). A longevidade dos adultos está relacionada a vários fatores, porém as duas linhagens não difereriram quanto a longevidade.

Os parâmetros da prole, tempo de desenvolvimento e viabilidade das fases imaturas não apresentaram diferenças significativas entre tratamentos. O período de desenvolvimento foi similar ao encontrado para *E. heros* por COSTA et al., (1998) que foi de 38,6 dias nas mesmas condições climáticas. COSTA et al., (1998), observou viabilidade acima de 69 % e CIVIDANES; PARRA, (1994) acima de 93 % para fases imaturas de *E. heros*, superior ao que foi encontrado no presente trabalho.

As duas linhagens possuem acentuadas diferenças genéticas entre elas, porém essa diferença não teve relação os parâmetros biológicos da prole híbrida. Resultado semelhante foi encontrado para populações com grandes diferenças genéticas e reduzido fluxo gênico de carrapatos *Dermacentor andersoni* onde os cruzamentos entre as duas populações não apresentaram diferenças significativas entre cruzamentos coespecíficos e reciprocos (LYSYK; SCOLES, 2008). No entanto, em *Tetranychus urticae* e *Conotrachelus nenuphar* foi constatado que havia incompatibilidade reprodutiva em cruzamentos entre populações de diferentes regiões (OVERMEER; VAN ZON, 1976; ZHANG; PFEIFFER, 2008). O mesmo efeito

foi confirmado em cruzamentos entre biótipos de *Bemisia tabaci* com alta incompatibilidade reprodutiva nos cruzamentos recíprocos (ELBAZ; LAHAV; MORIN, 2010; MARUTHI et al., 2004; SUN et al., 2011). É comum ser observado diferenças de viabilidade na prole híbrida quando existe diferenças genéticas, o que não foi evidenciado para as linhagens de *E. heros*.

Os parâmetros de TBVF apresentaram significativa diferença entre cruzamentos, porém os cruzamentos recíprocos expressaram valores iguais ou superiores aos coespecíficos. Os parâmetros de R_0 e T foram inferiores aos encontrados FORTES et al., (2006) e MENDOZA; DA ROCHA; PARRA, (2016), que constataram R_0 de 70,20 e 86,21 e T de 57,10 e 58,22, respectivamente para *E. heros*. Por outro lado R_m, e λ foram superiores aos verificados nos mesmos estudos de FORTES et al., (2006) e MENDOZA; DA ROCHA; PARRA, (2016) (R_m 0,076 e λ 1,079) exeto para o cruzamento coespecífco da linhagem Norte (R_m= 0,057 e λ=1,58). Os parametros de TBVF indica a capacidade de crescimento de uma população, os resultados demonstram que os cruzamentos recíprocos possuem capacidade igual ou superior no que se refere crescimento populacional dos cruzamentos coespecíficos.

Os resultados da TBVF constatam que o fitness da prole híbrida foi igual ou superior à prole coespecífica. O fitness da prole híbrida é uma das maneiras para determinar barreiras reprodutivas pós-zigoticas (BURKE; ARNOLD, 2001; MATSUBAYASHI; OHSHIMA; NOSIL, 2010). Neste sentido, os resultados aqui obtidos vão ao encontro do que foi reportado para *Spodoptera frugiperda* que observaram ausência de redução de fitness na prole hibrida nas raças arroz e milho (QUISENBERRY, 1991). Além disto, respostas de manutenção de fitness da prole híbrida são reportados inclusive entre cruzamentos de duas espécies de gafanhotos, *Chorthippus brunneus* e *C. jacobsi* (SALDAMANDO; TATSUTA; BUTLIN, 2005). Por outro lado, são reportadas redução de fitness da prole híbrida entre as raças de *S. frugiperda* (VELASQUEZ-VÉLEZ, 2011), em *Neoleucinodes elegantalis* (DÍAZ-MONTILLA et al., 2018) e em diferentes populações de *Tribolium castaneum* (DRURY; WADE, 2011). O fitness da prole híbrida não foi influenciado o que sugere a ausência de barreiras reprodutivas pós-zigoticas entre as duas linhagens de *E. heros*.

De acordo com os resultados de SOARES et al., (2018) as duas linhagens divergiram a 4,5 milhões de anos e possuem uma acentuada diferença genética entre elas. A especiação ocorre de forma gradual e vários fatores se fixam até atingir o isolamento reprodutivo entre espécies crípticas ou então linhagens. Os resultados indicam a ausência de incompatibilidade reprodutiva pós-zigotica entre as linhagens. Por outro lado, o método empregado “sem escolha” pode ter sido ineficiente em identificar o isolamento reprodutivo entre as linhagens. De acordo com WILEY et al., (2009) mais de uma barreira evolui concomitantemente e cruzamentos com possibidade de escolha são mais eficientes em identificar barreiras reprodutivas pré-zigóticas mais sutis. Além disto, o fitness dos híbridos pode ser afetado por efeitos espistáticos e diferenças no fitness pode ser expressa apenas após algumas gerações (FENSTER; GALLOWAY; CHAO, 1997; SCHUMER et al., 2015). Assim, faz-se necessário maiores estudos com as duas linhagens no que se refere a identificação de barreiras reprodutivas pré-zigoticas e pós-zigóticas. Mas aqui confirmamos que apesar das diferenças genéticas acentuadas, o reencontro das duas linhagens não parece haver qualquer barreira de fluxo gênico entre as mesmas.

A aparente ausência de incompatibilidade reprodutiva entre as duas lihagens de *E. heros* que ocorrem no Brasil vem ao encontro do atual status que a praga assumiu nas últimas décadas, de praga secundária nos anos 70 até praga chave em cultivos da soja. De acordo com SOARES et al., (2018) na região do Cerrado é onde está ocorrendo o rencoontro das linhagens e de acodo com o nosso trabalho um amplo fluxo gênico interespecífico entre as linhagens. Estudos demonstram que o encontro de dois pools genéticos diferentes aumenta o vigor das populações (MARTIN; JIGGINS, 2017; TAYLOR; LARSON; HARRISON, 2015). Embora enfatiza-se que maiores estudos são necessários para elucidar qual é o real impacto da hibridização entre linhagens nos surtos populacionais, adaptação a hospedeiros e no desenvolvimento de novas tecnologias para o controle sustentável de *E. heros* no cenário agrícola brasileiro.

REFERÊNCIAS

AZAMBUJA, R.; DEGRANDE, P. E.; PEREIRA, F. F. Comparative biology of *Euschistus heros* (F.) (Hemiptera: Pentatomidae) feeding on cotton and soybean reproductive structures. **Neotropical Entomology**, v. 42, n. 4, p. 359–365, 26 ago. 2013.

BARTON, N. H.; HEWITT, G. M. Adaptation, speciation and hybrid zones. **Nature**, v. 341, n. 6242, p. 497–503, 12 out. 1989.

BURKE, J. M.; ARNOLD, M. L. Genetics and the Fitness of Hybrids. **Annual Review of Genetics**, v. 35, n. 1, p. 31–52, 2001

CIVIDANES, F.; PARRA, J. R. Biologia em diferentes temperaturas e exigências térmicas de percevejos pragas da soja. II. *Euschistus heros* (Fabr.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 29, p. 1841–1846, 1 dez. 1994.

CONAB. **ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA DE GRÃOS**. Brasilia. Safra 2017/18.

COSTA, M. L. M. et al. ECOLOGIA, COMPORTAMENTO E BIONOMIA Biologia reprodutiva de *Euschistus heros* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). **An. Soc. Entomol. Brasil**, v. 27, n. 274, p. 559–568, 1998a.

COYNE, J. A.; ORR, H. A. **SPECIATION**. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2004.

DÍAZ-MONTILLA, A. E. et al. Reproductive incompatibility and fitness components in *Neoleucinodes elegantalis* races (Lepidoptera, Crambidae) from three Solanaceae hosts. **Caldasia**, v. 40, n. 2, p. 199–215, 1 jul. 2018.

DOPMAN, E. B.; ROBBINS, P. S.; SEAMAN, A. Components of reproductive isolation between North American pheromone strains of the european corn borer. **Evolution**, v. 64, n. 4, p. 881–902, 23 out. 2009.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13–15, 1990.

DRURY, D. W.; WADE, M. J. Genetic variation and co-variation for fitness between intra-population and inter-population backgrounds in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 24, n. 1, p. 168–176, jan. 2011.

ELBAZ, M.; LAHAV, N.; MORIN, S. Evidence for pre-zygotic reproductive barrier between the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 100, n. 05, p. 581–590, 17 out. 2010.

FENSTER, C. B.; GALLOWAY, L. F.; CHAO, L. Epistasis and its consequences for the evolution of natural populations. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, n. 7, p. 282–286, jul. 1997.

FITZPATRICK, B. M.; SHAFFER, H. B. Hybrid vigor between native and introduced salamanders raises new challenges for conservation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 40, p. 15793–15798, 2 out. 2007.

FORTES, P. et al. Development of a dry artificial diet for *Nezara viridula* (L.) and *Euschistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, v. 35, n. 5, p. 567–572, 2006a.

GOMPERT, Z.; PARCHMAN, T. L.; BUERKLE, C. A. Genomics of isolation in hybrids. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1587, p. 439–450, 2012.

HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P. . PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HARRISON, R. G.; LARSON, E. L. Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. **Journal of Heredity**, v. 105, n. S1, p. 795–809, 1 dez. 2014.

KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 1 jun. 2018.

LOMBAERT, E. et al. Bridgehead effect in the worldwide invasion of the biocontrol harlequin ladybird. **PLoS ONE**, v. 5, n. 3, p. e9743, 17 mar. 2010.

LYSYK, T. J.; SCOLES, G. A. Reproductive compatibility of Prairie and Montane populations of *Dermacentor andersoni*. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 6, p. 1064–1070, 1 nov. 2008.

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

MARTIN, S. H.; JIGGINS, C. D. Interpreting the genomic landscape of introgression. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 47, p. 69–74, 1 dez. 2017.

MARUTHI, M. N. et al. Reproductive incompatibility and cytochrome oxidase I gene sequence variability amongst host-adapted and geographically separate *Bemesia tabaci* populations (Hemiptera: Aleyrodidae). **Systematic Entomology**, v. 29, n. 4, p. 560–568, 1 out. 2004.

MATSUBAYASHI, K. W.; OHSHIMA, I.; NOSIL, P. Ecological speciation in phytophagous insects. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 134, n. 1, p. 1–27, 1 jan. 2010.

MENDOZA, A. C.; DA ROCHA, A. C. P.; PARRA, J. R. P. Lyophilized artificial diet for rearing the Neotropical *Euschistus heros* (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Insect Science**, v. 16, n. 1, p. 41, 28 abr. 2016.

OVERMEER, W. P. J.; VAN ZON, A. Q. Partial reproductive incompatibility between populations of spider mites (Acarina: Tetranychidae). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 20, n. 3, p. 225–236, 1 set. 1976.

PIAS, O. H. DE C. et al. Sampling grids for monitoring *Euschistus heros* infestation in soybean. **Bragantia**, v. 76, n. 3, p. 386–397, 8 jun. 2017.

QUISENBERRY, S. S. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strain reproductive compatibility. **The Florida Entomologist**, v. 74, n. 2, p. 194, 1991.

RAGLAND, G. J. et al. Differences in performance and transcriptome-wide gene expression associated with *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) larvae feeding in alternate host fruit environments. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 11, p. 2759–2776, 1 jun. 2015.

SALDAMANDO, C. I.; TATSUTA, H.; BUTLIN, R. K. Hybrids between *Chorthippus brunneus* and *C. jacobsi* (Orthoptera Acrididae) do not show endogenous postzygotic isolation. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 84, p. 195–203, 2005.

SAS. **SAS/STAT User's Guide, Version 9.1.** Cary, NC, USA. SAS Institute, , 2002.

SCHUMER, M. et al. Reproductive isolation of hybrid populations driven by genetic incompatibilities. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 3, p. e1005041, 13 mar. 2015.

SHAW, D. D. **Chromosomal hybrid zones in Orthopteroid insects**. In Atchley WR & Woodruff D (eds): 1. **Anais**...1981

SOARES, P. L. et al. The reunion of two lineages of the Neotropical brown stink bug on soybean lands in the heart of Brazil. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2496, 6 dez. 2018.

SUN, D. B. et al. Reproductive incompatibility between the B and Q biotypes of the whitefly *Bemisia tabaci* in China: genetic and behavioural evidence. **Bulletin of Entomological Research**, v. 101, n. 02, p. 211–220, 1 abr. 2011.

TAYLOR, S. A.; LARSON, E. L.; HARRISON, R. G. Hybrid zones: windows on climate change. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 30, n. 7, p. 398–406, 1 jul. 2015.

VELASQUEZ-VÉLEZ, M. Reproductive isolation between two populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in corn and rice fields from central Colombia. **Annals of the Entomological Society of America**, p. 826–833, 19 jul. 2011.

VILLAS-BÔAS, G. L.; PANIZZI, A. R. Biology of *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) on soyabean (Glycine max (L.) Merrill). **Anais da Sociedade Entomologica do Brasil**, v. 9, n. 1, p. 105–113, 1980.

WELLENREUTHER, M.; VERCKEN, E.; SVENSSON, E. I. A role for ecology in male mate discrimination of immigrant females in *Calopteryx damselflies*? **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 100, n. 3, p. 506–518, 29 jun. 2010.

WILEY, C. et al. Postzygotic isolation over multiple generations of hybrid descendents in a natural hybrid zone: how well do single-generation estimates reflect reproductive isolation? **Evolution**, v. 63, n. 7, p. 1731–1739, 1 jul. 2009.

YANG, C.-C. et al. Propagule pressure and colony social organization are associated with the successful invasion and rapid range expansion of fire ants in China. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 4, p. 817–833, 1 fev. 2012.

ZHANG, X.; PFEIFFER, D. G. Evaluation of reproductive compatibility of interstrain matings among plum curculio populations in the Eastern United States. **Environmental Entomology**, v. 37, n. 5, p. 1208–1213, 2008.

44 .

3 EFEITO DE FOTOPERÍODO E TEMPERATURA EM DUAS LINHAGENS MITOCONDRIAIS DE *Euschistus heros* F. (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

Resumo

Euschistus heros (F.) (Hemiptera: Pentatomidae), conhecido por percevejo-marrom-da-soja é uma das pragas chave da soja na América do Sul. Estudos de dinâmica populacional descobriram duas linhagens alopátricas de *E. heros* no Brasil. Uma linhagem de ocorrência na região Norte/Nordeste (N) e outra na região Sul (S) e uma zona de sobreposição no Cerrado, aparentemente sem barreiras reprodutivas entre as linhagens. Questões sobre o potencial adaptativo dessas linhagens são de grande importância para entendimento da dinâmica e dos surtos populacionais de *E. heros*. Com isso, nosso objetivo foi avaliar o efeito da temperatura e fotoperíodo no tempo de desenvolvimento e viabilidade de fases imaturas e expressão da dormência nas duas linhagens alopátricas de *E. heros*. Para tanto, ovos das linhagens (S e N) foram incubados em câmaras climáticas sob diferentes regimes de luz (10: 14, 11,5: 12,5 e 14: 10 (L: E) e temperaturas (14, 18, 21 e 25 ºC). Ficou evidente que existe uma relação entre temperatura e fotoperiodo no tempo de desenvolvimento e viabilidade. Temperatura de 18 ºC e fotoperíodo de 10: 14 (L:E) aumentam o tempo necessário para completar o ciclo e reduzem a viabilidade. Temperatura de 25 ºC e fotoperíodo mais longo 14: 10 (L: E) diminuem tempo de desenvolvimento e aumentam a viabilidade nas fases imaturas das duas linhagens. Observou-se respostas distintas quanto a expressão do fenótipo da dormência entre linhagens. A expressão do fenótipo da dormência foi positivamente afetada por temperaturas menores e fotoperíodos mais curtos, especialmente para a linhagem Sul. Os resultados demonstram que as duas linhagens possuem respostas similares aos fatores de estress abióticos nas fases imaturas. A linhagem Sul entra em dormência sob condições de fotoperíodo curto e a temperatura interage na expressão do fenótipo. A linhagem Norte não expressa dormência pelos parâmetros morfológicos sob condições de dias curtos. As respostas deste trabalho oferecem informações úteis para melhor entender a dinâmica populacional e o desenvolvimento de estratégias menejo mais eficientes e sustentáveis de *E. heros*.

Palavras-chave: Adaptação; Tempo de desenvolvimento; Viabilidade; Percevejo-marrom-da-soja.

46 .

4 EFFECT OF PHOTOPERIOD AND TEMPERATURE IN TWO MITOCHONDRIAL LINES OF *Euschistus heros* F. (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

Abstract

Euschistus heros (F.) (Hemiptera: Pentatomidae), the soybean brown stink bug, is a key soybean pest in South America. Population dynamics studies have found the presence of two allopatric slineages of *E. heros* in Brazil. A lineage of occurrence in the North / Northeast region (N) and another in the South region (S) and an overlaping area in the Cerrado, apparently without reproductive barriers between the lineages. Questions about the adaptive potential of these lineages are of great importance for understanding the dynamics and population outbreaks of *E. heros*. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effect of temperature and photoperiod on the development time and viability of immature phases and expression of dormancy of the allopatric lineages of *E. heros*. For this purpose, eggs from both lineages (S and N) were incubated in climatic chambers under different light regimes (10: 14, 11,5: 12,5 and 14: 10 (L: E) and temperatures (14, 18, 21 and 25 ºC). It was evident that there is a relationship between temperature and photoperiod at the development time and viability. Temperature of 18 ºC and photoperiod of 10: 14 (L: E) increase the time required to complete the cycle and reduce viability. Temperature of 25 °C and longer photoperiod 14: 10 (L: E) decrease development time and increase viability in the immature phases of both strains. Different responses were observed regarding the expression of the dormancy phenotype between lineages. The expression of the dormancy phenotype was positively affected by shorter temperatures and shorter photoperiods, especially for the Southern line. The results demonstrate that the two lineages have similar responses to the abiotic stress factors in the immature phases. The Southern lineage falls into dormancy under short photoperiod conditions and the temperature interacts with the expression of the phenotype. The Northern lineage does not express dormancy by morphological parameters under short day conditions. The responses of this work offer useful information to better understand population dynamics and the development of more efficient and sustainable management strategies of *E. heros*.

Keywords: Adaptation; Develpment time; Viability; Soybean brown stink bug

3.1 Introdução

A classe Insecta ocupa os mais diversos ambientes do planeta sendo encontrada desde regiões tropicais até os pólos. Os fatores abióticos e bióticos estão diretamente envolvidos no estabelecimento de uma espécie com destaque para o fotoperíodo, temperatura, humidade e fatores tróficos (DENLINGER, 1986). Devido a natureza ectotérmica dos insetos a temperatura está diretamente envolvida no seu desenvolvimento e metabolismo. O desenvolvimento das fases jovens e

reprodutivo são determinados pelo acúmulo de graus dia (RODRIGUES, 2004). O fotoperíodo embora geralmente não estar diretamente relacionado com o desenvolvimento é um sinal ambiental imutável e sazonal que em geral desempenha pepel sinalizador de mudanças ambientais (SAULICH; MUSOLIN, 2012). Assim, a sazonalidade climática bem como os fatores tróficos são um dos principais entraves para o estabelecimento de um organismo a um determinado ambiente.

Para superar as condições limitantes impostas pelo ambiente os insetos desenvolveram diversas estratégias de sobrevivência com destaque para a dormência. A dormência se caracteriza pela interupção no desenvolvimento no período desfavorável e sua retomada em período favorável permitindo maiores chances de sobrevivência (DENLINGER, 1986; DENLINGER; YOCUM; RINEHART, 2012; GILBERT, 2012). Os principais fatores indutores a dormência são o fotoperíodo e a temperatura bem como outros fatores bióticos que podem atuar isoladamente ou em conjunto, sendo espécie específica (DENLINGER, 1986).

Em Pentatomidae a dormêcia é uma característica amplamente distribuída na família. A dormência facultativa na fase adulta é a mais comum dentre Pentatomidae (SAULICH; MUSOLIN, 2012). A dormência somente é expressa se as fases sensíveis, que antecedem a fase que expressa o fenótipo, são expostas aos sinais de indução (TAUBER; TAUBER; MASAKI, 1986). A dormência facultativa permite ao organismo entrar ou não em dormência e a decisão é tomada por pistas oferecidas pelo ambiente bem como a condição nutricional à qual o organismo se encontra (HUNTER; MCNEIL, 1997). A dormência e sua expressão são uma condição peculiar à espécie e pode quando facultativa ser uma decisão a nível de indivíduo.

Em *E. heros* é observada dormência facultativa com repouso reprodutivo, redução alimentar e mudança comportamental na fase adulta. Adultos de ambos os sexos apresentam o fenótipo sazonalmente em região mais fria do Brasil (MOURÃO; PANIZZI, 2002). O principal indutor da dormência nesta espécie, aparentemente, é o fotoperíodo, fotofase inferior a 12 horas, condição característica que antecede o inverno na região Sul do Brasil (MOURÃO; PANIZZI, 2002). Mourão e Panizzi (2000a) identificaram que que até o terceiro intar a espécie é sensível á indução da dormência. A temperatura pode ser fator concomitante à expressão do fenótipo da dormência como em pentatomideos *Pizodorus guildinnii* (ZERBINO; ALTIER; PANIZZI, 2013), *Nezara viridula* (ALI; EWIESS, 1977; MUSOLIN; NUMATA, 2003).

Para a espécie *E. heros* não há evidências que a temperatura é ou não um fator ambiental relacionado na expressão do fenótipo da dormência.

A dinâmica populacional da espécie *E. heros* no Brasil é pouco conhecida e são raros os estudos sobre o tema. A existência de duas linhagens mitocondriais de *E. heros* no Brasil, uma predominante na região Amazônica e Caatinga e a segunda na região da Mata Atlântica e Pampas, com significativa divergência genética (SOARES et al., 2018), abrem questionamentos sobre o comportamento de dormência entre essas linhagens. As linhagens ocupam nichos muito distintos e estiveram sob condições ambientes diferentes especialmente no que se refere a regimes de luz e temperaturas, o que permite imaginar respostas distintas das linhagens quando submetidas a extresse abiótico. Desta forma, nosso objetivo foi verificar a influência da temperatura e do fotoperíodo sobre o desenvolvimento, viabilidade e expressão do fenótipo da dormência nas duas linhagens de *E. heros* que ocorrem no Brasil.

3.2 Materias e Métodos

Para avaliar a resposta de desenvolvimento e viabilidade e expressão do fenótipo de dormência das duas linhagens sob diferentes temperaturas e fotoperíodo ovos oriundos de populações de laboratório foram incubados sob três condições de fotoperíodo (14 h L: 10 h E; 11,5 h L: 12,5 h E; e 10 h L: 14 h E) e quatro temperaturas (14 ºC, 18ºC, 21ºC e 25ºC). Os tratamentos foram compostos pela combinação de linhagem (2) x fotoperíodo (3) x temperatura (4) (Ex: 14 h L: 10 h E a 21ºC, linhagem sul = T1), totalizando 24 tratamentos. Os experimentos foram conduzidos em câmaras climáticas tipo BOD com controle automático de fotoperíodo e temperatura. Para cada tratamento foram incubados aproximadamente 200 ovos de primeiro dia oriundos das populações de laboratório. Dieta natural e água foi ofertada aos insetos utilizados nos experimentos.

Foram avaliados nas duas linhagens os parâmetros biológicos: viabilidade de ovo, viabilidade das fases imaturas (ninfas), período de desenvolvimento de cada fase imatura, período de desenvolvimento ovo-adulto. Após 30 dias da emergência do adulto indivíduos foram mortos com álcool (PA) e em seguida dissecados sob steriomicroscópio de 50x. As medidas de tamanho de gônadas foram tomadas com sofware Leica versão 3.4 com régua digital. O desenvolvimento das gônadas foi classificado como: imaturas ou totalmente desenvolvidas, classificação adaptada de

Mourão e Panizzi (2002). Os indivíduos machos com testículos ≤ 1,5 mm foram considerados imaturos, testículos > 1,5 mm foram consideradas desenvolvidas. Para as gônadas femininas foi considerado imaturo, com ovaríolo ≤ 2,0 mm, com ausência de oócitos completamente desenvolvidos e desenvolvido com ovaríolo > 2,0 mm e com presença de oócitos completamente desenvolvidos. Foram dissecados vinte indivíduos para cada tratamento ou o total de adultos vivos do tratamento. Adutos da temperatura de 18 ºC não foram considerados por somente três indivíduos estarem vivos após 30 dias da emergência dos adultos. Ovos oriundos dos adultos dos tratamentos foram contabilizadas diariamente e mantidos em placas de Petri nas mesmas condições climáticas para constatar viabilidade dos ovos.

Os resultados para o tempo de desenvolvimento e viabilidade de fases imaturas foram submetidos a uma análise de variância multivariada de três vias (linhagem × temperatura x fotoperíodo) (PROC GLM com declaração MANOVA; SAS Institute, 2002). As médias de tempo de desenvolvimento e viabilidade de cada fase foram subsequentemente submetidas ao teste HSD de Tukey (P <0,05) (PROC GLM; SAS Institute, 2002). Os dados binomiais de presença (1) ou ausência (0) de gônodas desenvolvidas foram submetidos ao teste Qui-quadrado para verificar a proporção de gônadas desenvolvidas. As análises foram realizadas no programa Sigma Plot versão 11.0 (Systat Software, San Jose, CA).

3.3 Resultados

Nos tratamentos submetidos a temperatura de 14 ºC não houve nenhuma eclosão de ninfas de ambas as linhagens. Os ovos incubados alteraram a coloração, porém o desenvolvimento embrionário não foi completo. O regime de luz não teve relação com a viabilidade bem como o desenvolvimento para ambas as linhages.

Os resultados indicam que existe interação fotoperíodo x temperatura para tempo de desenvolvimento e viabilidade de ovos (Wilks' lambda = 0.4150, $df_{num/den}$ = 8/142, F = 9,8; P < 0.001). A ANOVA para o tempo de desenvolvimento de ovos mostrou diferença entre os tratamentos ($F_{(8;81)}$ =218,69; P < 0.001) sendo a maior média para o tratamento T= 18 ºC e 10: 14 (L:E) = 19,30±0,40 dias e a menor média para T= 25 ºC e 10: 14 (L:E) = 5,94±0,15 dias (Figura 2). A ANOVA para a viabilidade de ovos mostrou diferença entre tratamentos ($F_{(8;81)}$ =8,60; P < 0.001)

com maior média para T= 25 ºC e 14: 10 (L: E) = 82,4±2,23 % e a menor média para T= 18 ºC e 10: 14 (L: E) = 34,46±4,33 % (Figura 2).

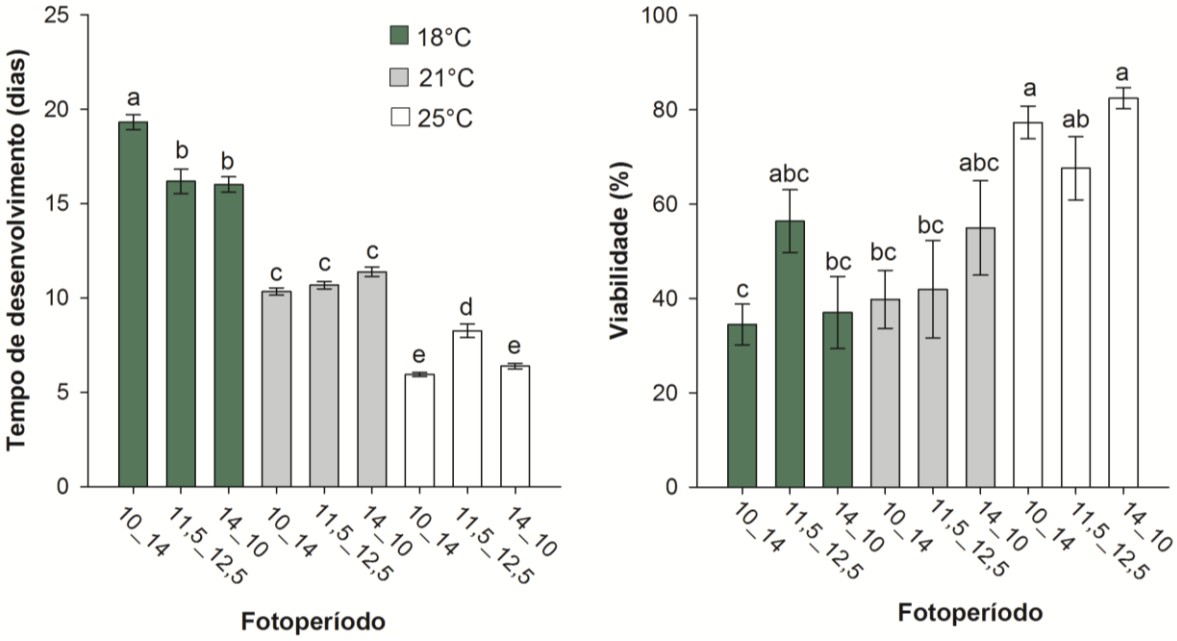

Figura 2. Tempo médio de desenvolvimento (± SE) e viabilidade média (± SE) de ovos de duas linhagens (S x N) de *E. heros* submetidas a diferentes temperaturas (18, 21 e 25 ºC) e regimes de luz (10: 14, 11,5: 12,5 e 14: 10 (L: E)). Colunas com letras distintas diferem entre si de acordo com teste de Tukey (P< 0,05).

Para o primeiro instar foi observada interação entre fotoperíodo x temperatura x linhagem para dias de desenvolvimento e viabilidade (Wilks' lambda = 0.7493, $df_{num/den}$ = 8/126, F = 2,44; P < 0.001). A ANOVA para o tempo de desenvolvimento das ninfas de primeiro instar mostrou diferença entre os tratamentos ($F_{(17;64)}$ =16,28; P < 0.001) com maior média para L= N, T= 18 ºC e 10: 14 (L: E) = 13,00±3,53 dias e a menor média para L= S, T= 25 ºC e 10: 14 (L: E) = 3,50±0,18 dias (Figura 3). A ANOVA para a viabilidade das ninfas de 1º instar mostrou diferença entre tratamentos ($F_{(17;64)}$ =5,21; P < 0.001) com maior média para o tratamento L= S, T= 25 ºC e 14: 10 (L: E) = 90,21±1,80 % e com menor média para o tratamento L= N, T= 25 ºC e 10: 14 (L: E) = 1,00±0,0 % (Figura 3).

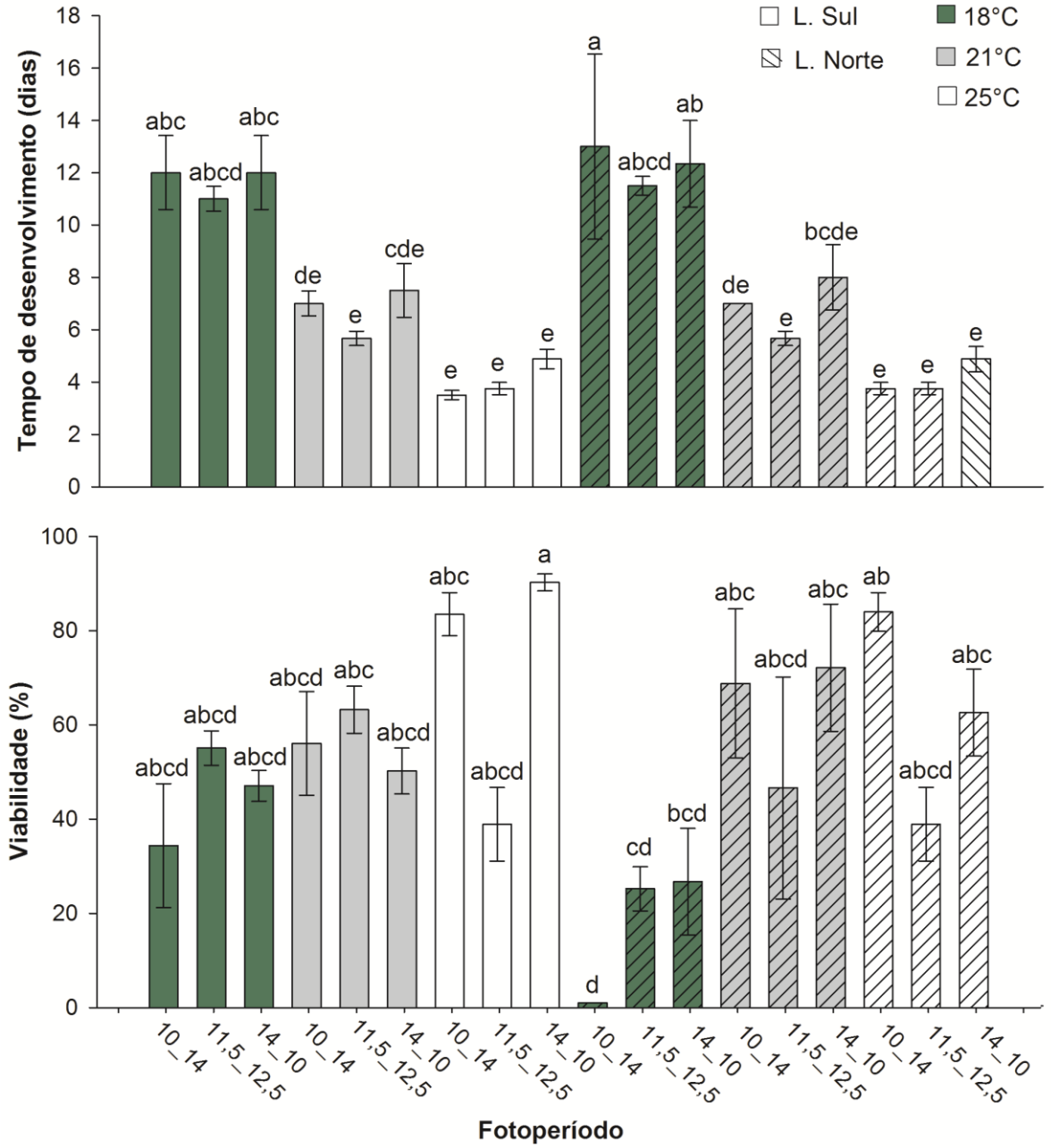

Figura 3. Tempo médio de desenvolvimento (± SE) e viabilidade média (± SE) de ninfas de 1º instar de duas linhagens (S x N) de *E. heros* submetidas a diferentes temperaturas (18, 21 e 25 ºC) e regimes de luz (10: 14, 11,5: 12,5 e 14: 10 (L: E)). Colunas com letras distintas diferem entre si de acordo com teste de Tukey (P< 0,05).

Os resultados indicam que existe interação fotoperíodo x temperatura para tempo de desenvolvimento e viabilidade de ninfas de segundo instar (Wilks' lambda = 0.6809, $df_{num/den}$ = 8/116, F = 3,07; P < 0,001). A ANOVA para o tempo de desenvolvimento de ninfas de 2º instar mostrou diferenças entre tratamentos ($F_{(8;67)}$ =11,66; P < 0.001) com maior média para o tratamento T = 18 ºC e 10: 14 (L: E) = 18± 0,00 dias e com a menor média para o tratamento T= 25 ºC e 14: 10 (L: E) =

6,00±0,30 dias (Figura 4). A ANOVA para a viabilidade de ninfas de segundo instar demonstrou diferenças entre tratamentos ($F_{(8;67)}$ =4,35; P < 0,003) com maior média registrada para o tratamento T= 21 ºC e 11,5: 12,5 (L: E) = 82,34±5,00 % e a menor média para o tratamento T= 18 ºC e 10: 14 (L: E) = 5,55±0,00 % (Figura 4).

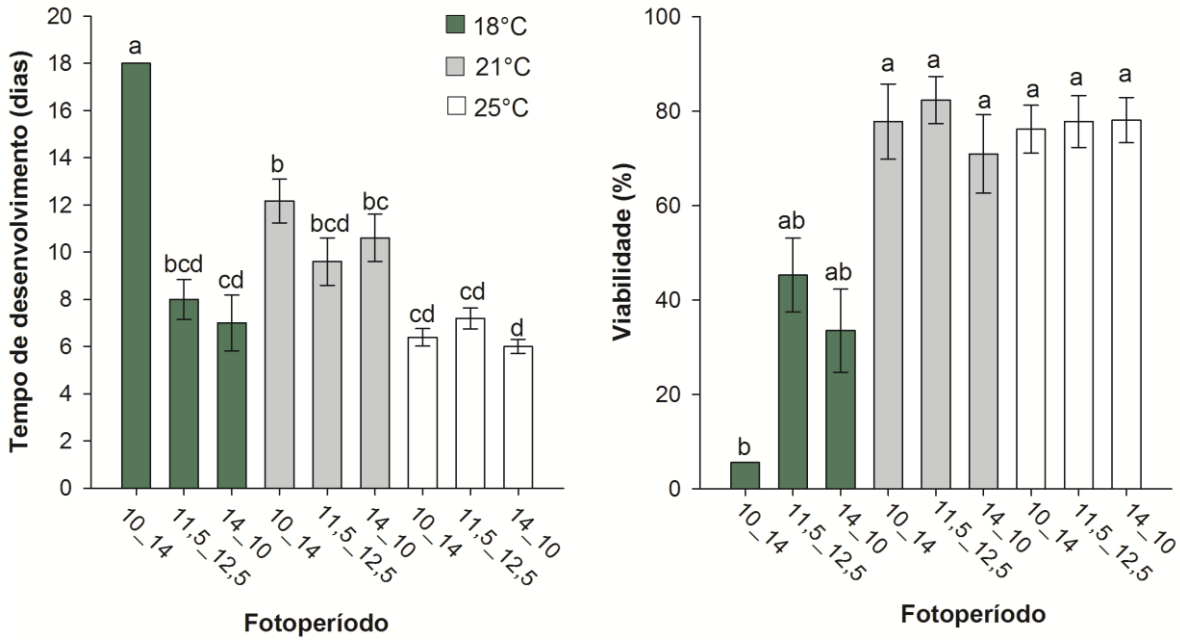

Figura 4. Tempo médio de desenvolvimento (± SE) e viabilidade média (± SE) de ninfas de 2º instar de duas linhagens (S x N) de *E. heros* submetidas a diferentes temperaturas (18, 21 e 25 ºC) e regimes de luz (10: 14, 11,5: 12,5 e 14: 10 (L: E)). Colunas com letras distintas diferem entre si de acordo com teste de Tukey (P< 0,05).

Os resultados indicam que existe interação fotoperíodo x temperatura para tempo de desenvolvimento e viabilidade de ninfas de terceiro instar (Wilks' lambda = 0.4332, $df_{num/den}$ = 4/112, F = 14,60; P < 0,001). A ANOVA para o tempo de desenvolvimento de ninfas de 3º instar mostrou diferenças entre tratamentos ($F_{(7;63)}$ =35,01; P < 0.001) com maior média para o tratamento T = 18 ºC e 11,5: 12,5 (L: E) = 24,00± 1,63 dias e com a menor média para o tratamento T= 25 ºC e 11,5: 12,5 (L: E) = 5,14±0,56 dias (Figura 5). A ANOVA para a viabilidade de ninfas de terceiro instar demonstrou diferenças entre tratamentos ($F_{(7;63)}$ =3,13; P < 0,006) com maior média registrada para o tratamento T= 21 ºC e 14: 10 (L: E) = 86,00±5,22 % e a menor média para o tratamento T= 21 ºC 11,5: 12,5 (L: E) 25,56±10,10 % (Figura 5).

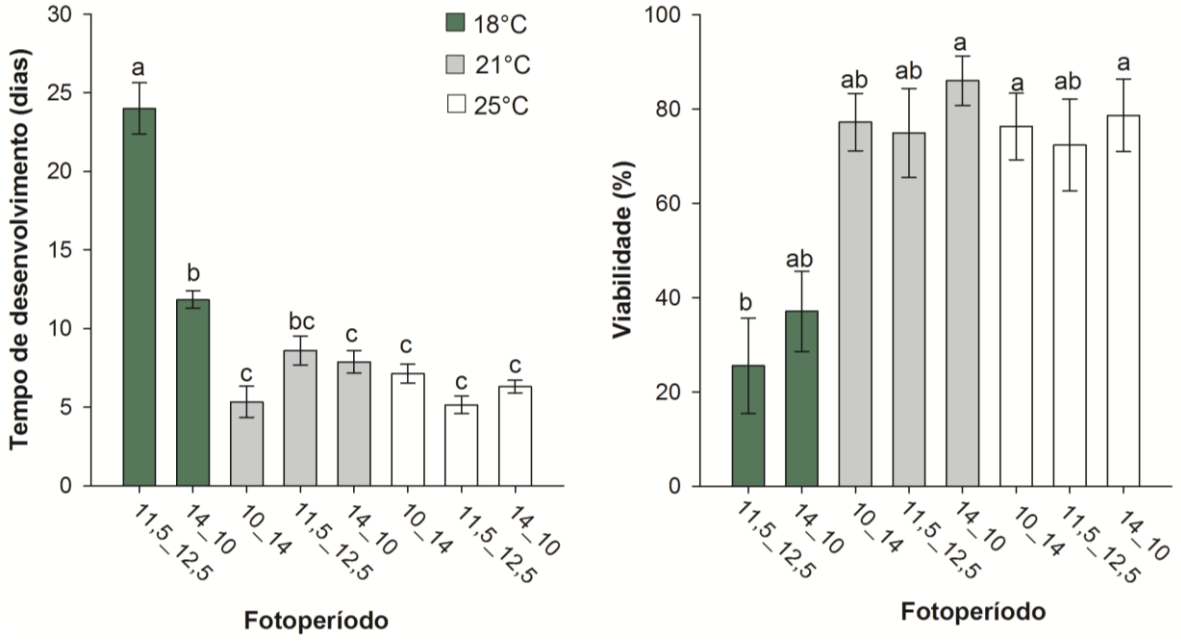

Figura 5. Tempo médio de desenvolvimento (± SE) e viabilidade média (± SE) de ninfas de 3º instar de duas linhagens (S x N) de *E. heros* submetidas a diferentes temperaturas (18, 21 e 25 ºC) e regimes de luz (10: 14, 11,5: 12,5 e 14: 10 (L: E)). Colunas com letras distintas diferem entre si de acordo com teste de Tukey (P< 0,05).

Os resultados indicam ausência de interação para os fatores temperatura, fotoperiodo e linhagem em ninfas de 4º instar. A temperatura foi o fator que influenciou no tempo de desenvolvimento, porém não influenciou na viabilidade de ninfas de quarto instar (Wilks' lambda = 0.2013, $df_{num/den}$ = 4/104, F = 31,95; P < 0,001). A ANOVA para o tempo de desenvolvimento de ninfas de 4º instar mostrou diferenças entre tratamentos ($F_{(2;66)}$ =121,63; P < 0.001) com maior média para o tratamento T = 18 ºC = 19,56± 1,64 dias e com a menor média para o tratamento T= 25 ºC = 5,86±0,16 (Figura 6).

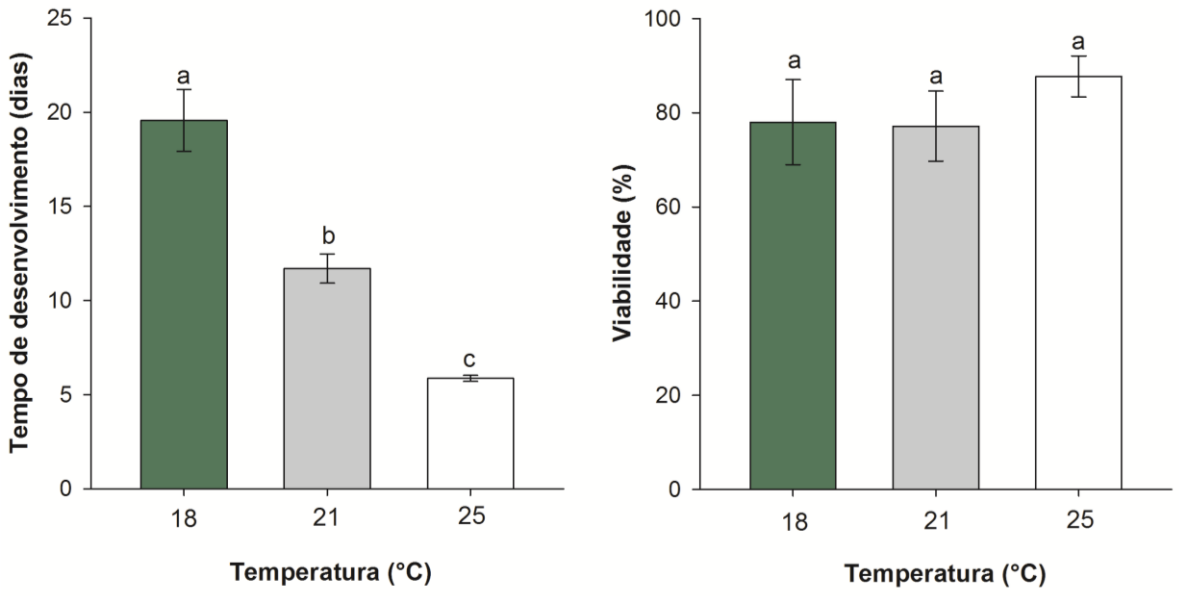

Figura 6. Tempo médio de desenvolvimento (± SE) e viabilidade média (± SE) de ninfas de 4º instar de duas linhagens (S x N) de *E. heros* submetidas a diferentes temperaturas (18, 21 e 25 ºC) e regimes de luz (10: 14, 11,5: 12,5 e 14: 10 (L: E)). Colunas com letras distintas diferem entre si de acordo com teste de Tukey (P< 0,05).

Os resultados demonstram a temperatura influencia no tempo de desenvolvimento ninfas de quinto instar (Wilks' lambda = 0,3336, $df_{num/den}$ = 4/84, F = 13,84; P < 0,001). A ANOVA para o tempo de desenvolvimento de ninfas de 5º instar mostrou diferenças entre tratamentos ($F_{(5;52)}$ =17,49; P < 0.001) com maior média para o tratamento T = 18 ºC = 18,00± 2,82 dias e com a menor média para o tratamento T= 25 ºC = 8,82±0,30 dias (Figura 7).

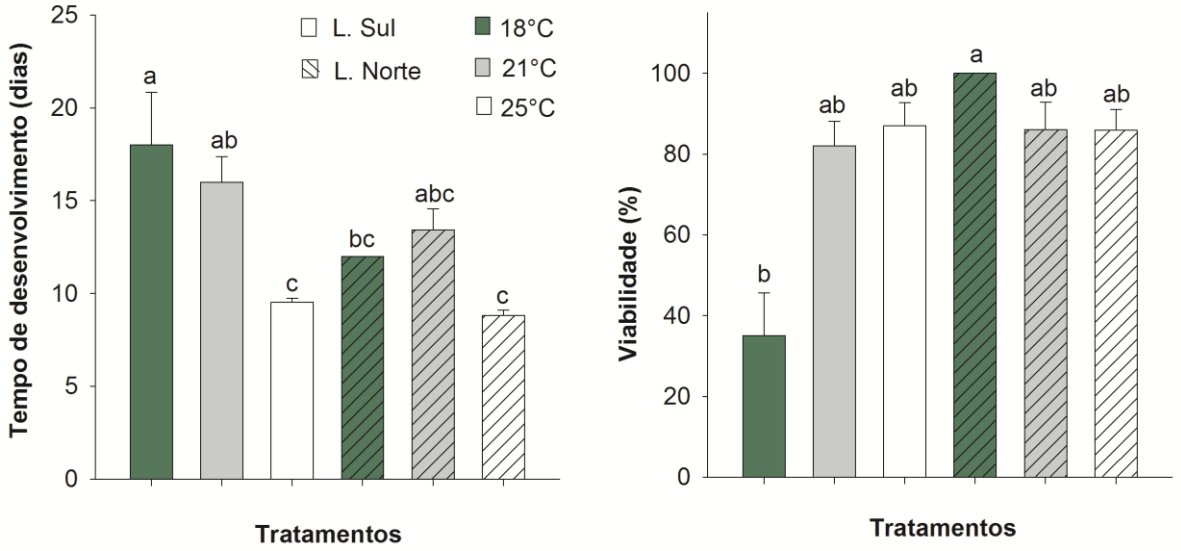

Figura 7. Tempo médio de desenvolvimento (± SE) e viabilidade média (± SE) de ninfas de 5º instar de duas linhagens (S x N) de *E. heros* submetidas a diferentes temperaturas (18, 21 e 25 ºC) e regimes de luz (10: 14, 11,5: 12,5 e 14: 10 (L: E)). Colunas com letras distintas diferem entre si de acordo com teste de Tukey (P< 0,05).

Os resultados indicam que existe interação linhagem x temperatura para tempo de desenvolvimento e viabilidade das fases imaturas (ovo-adulto) (Wilks' lambda = 0.7613, $df_{num/den}$ = 4/84, F = 3,07; P < 0,0207). Além disso, foi verificado que existe interação temperatura X fotoperíodo para tempo de desenvolvimento e viabilidade das fases imaturas (ovo-adulto) (Wilks' lambda = 0.4689, $df_{num/den}$ = 6/84, F = 6,44; P < 0,0001). A ANOVA para o tempo de desenvolvimento ds fases imaturas (ovo-adulto) mostrou diferenças entre tratamentos ($F_{(11;38)}$ =102,92; P < 0.001) com maior média para o tratamento L= S, T = 21 ºC 14:10 (L: E) = 64,67± 0,87 dias e com a menor média para o tratamento L= N e T= 25 ºC = 37,20±0,71 dias (Figura 8). A ANOVA para a viabilidade das fases imaturas (ovo-adulto) demonstrou diferenças entre tratamentos ($F_{(11;38)}$ =4,06; P < 0,006) com maior média registrada para o tratamento L= S, T= 25 ºC e 14: 10 (L: E) = 43,06±6,37 % e a menor média para o tratamento L= S, T= 21 ºC e 10: 14 (L: E) = 6,12±1,29 % (Figura 8).

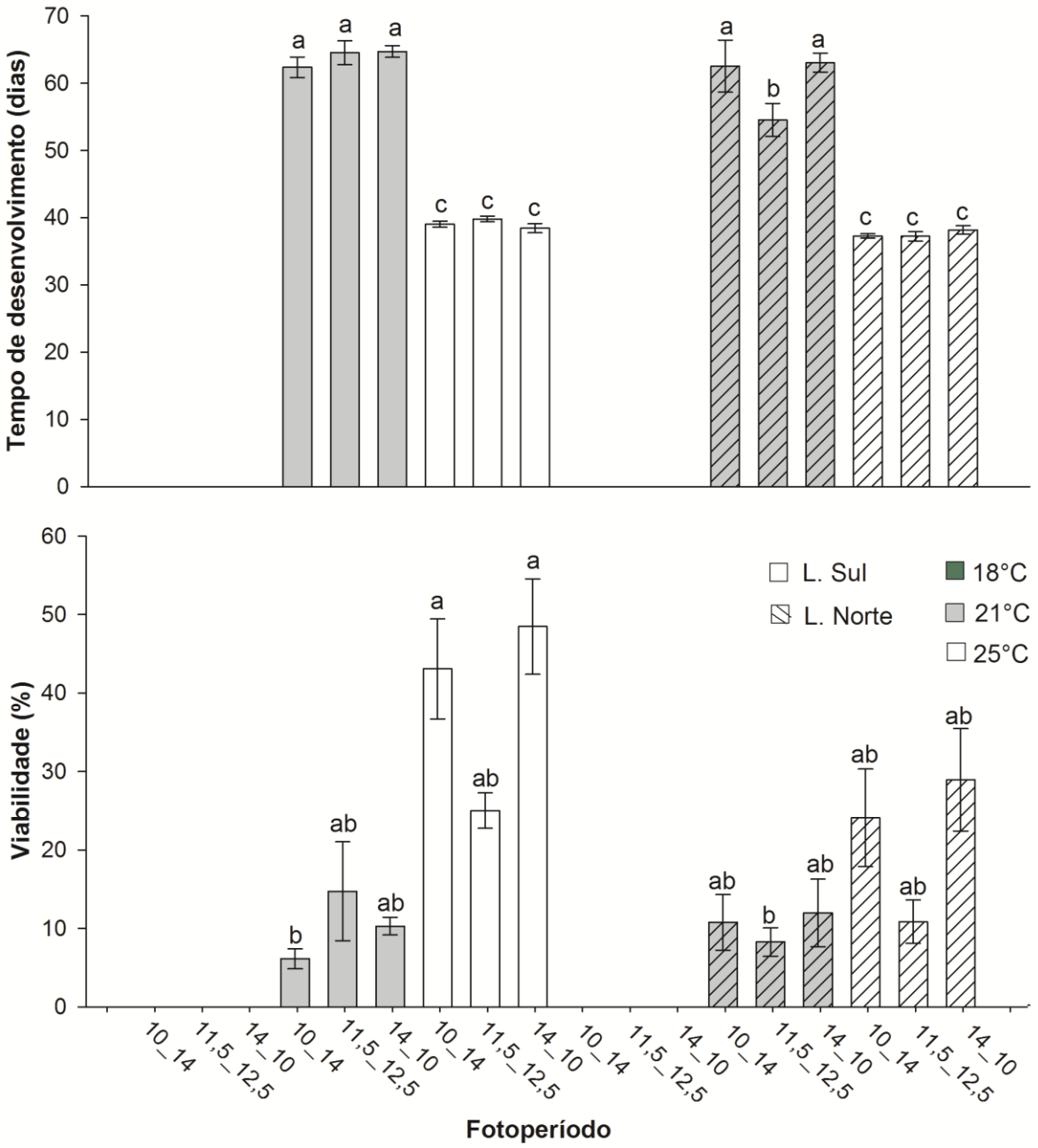

Figura 8. Tempo médio de desenvolvimento (± SE) e viabilidade média (± SE) das fases imaturas ovo-adutlo de duas linhagens (S x N) de *E. heros* submetidas a diferentes temperaturas (18, 21 e 25 ºC) e regimes de luz (10: 14, 11,5: 12,5 e 14: 10 (L: E)). Colunas com letras distintas diferem entre si de acordo com teste de Tukey (P< 0,05).

A Figura 9 demonstra os resultados da comparação do número de gônadas desenvolvidas entre linhagens em diferentes temperaturas e fotoperíodo. Na temperatura de 25 °C a linhagem Norte obteve uma proporção maior de indivíduos com gônadas desenvolvidas quando comparado a linhagem Sul (razão de verossimilhança, X^2 = 15,42, d.f. = 1, p < 0,0001) com valores de 1.0 e 0,40,

respectivamente, quando expostos ao fotoperíodo de 10hL / 14hE (Figura 9). Já para os fotoperíodos 11,5hL / 12,5hE e 14hL / 10hE não houveram diferenças entre as linhagens (razão de verossimilhança, $X^2 < 3,86$, d.f. = 1, $p > 0,06$). Para a temperatura de 21°C a linhagem Norte também apresentou uma proporção maior de indivíduos com gônadas desenvolvidas quando comparado a linhagem Sul para os fotoperíodos de 10hL / 14hE (razão de verossimilhança, $X^2 = 6,55$, d.f. = 1, $p < 0,01$) e para fotoperíodo 11,5hL / 12,5hE (razão de verossimilhança, $X^2 = 5,26$, d.f. = 1, $p < 0,02$) (Figura 9). Já para 21°C e fotoperíodo 14hL / 10 hL não houveram diferenças entre as linhagens (razão de verossimilhança, $X^2 < 0,28$, d.f. = 1, $p = 0,59$) para a proporção maior de indivíduos com gônadas desenvolvidas.

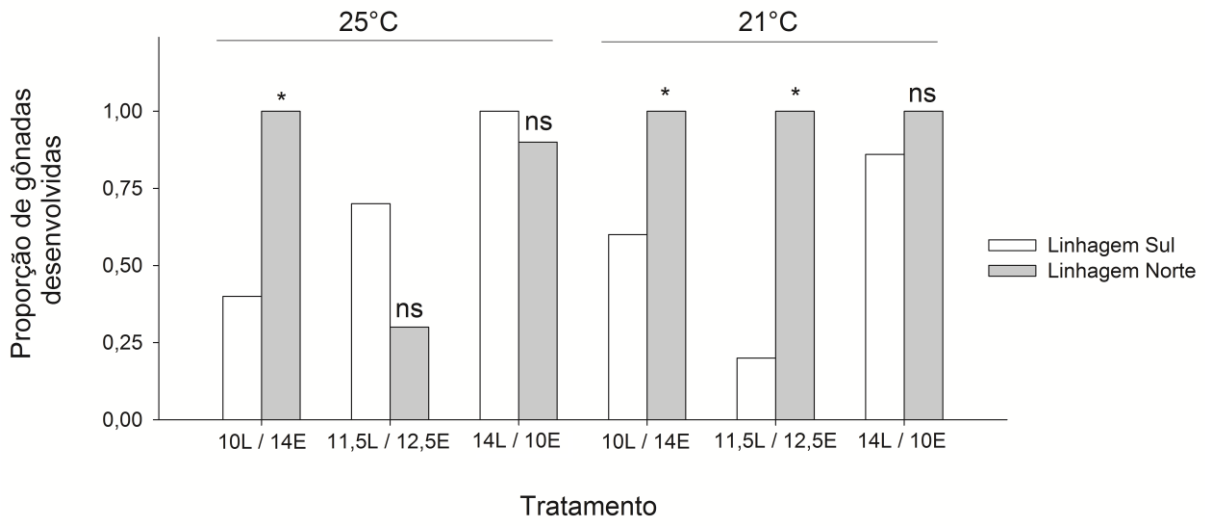

Figura 9. Proporção de gônadas desenvolvidas de adultos de duas linhagens (S x N) de *E. heros* submetidas a diferentes regimes de temperatura (21 e 25 ºC) e fotoperíodo (10: 14, 11,5: 12,5 e 14: 10 (L: E). Colunas com asterisco possuem diferenças significativas (razão de verossimilhança, $X^2 < 3,86$, d.f. = 1, $p > 0,06$).

Foram observados ovos em todos os tratamentos, porém reduzida ou nenhuma viabilidade nos tratamentos com fotoperiodo menor que 12 horas de luz (Tabela 5). Para o tratamento 10: 14 (L: E) na linhagem Sul foram contabilizados 47 ovos na temperatura 25 ºC e 19 ovos na temperatura 21 ºC, sendo 6 ovos viáveis na temperatura de 25 ºC. Na linhagem Norte, no fotopríodo 10: 14 (L: E), foram observados 43 ovos sem viabilidade a 21 ºC e 32 ovos para a temperatura de 25 º C, destes 13 viáveis. Para o fotoperíodo intermediário (11,5: 12,5 (L: E)) foram contabilizados 155 e 180 ovos para a linhagem Sul na temperatura 21 e 25 ºC,

respectivamente, com ausência de viabilidade. A linhagem Norte ovipositou 32 ovos na temperatura 21 ºC e 21 ovos na temperatura 25 ºC no regime de luz intermediário (11,5: 12,5 (L: E)), porém sem ovos viáveis. Para o fotoperíodo 14: 10 (L: E) e temperatura 21 ºC a linhagem Sul ovipositou 38 ovos dos quais 11 foram viáveis e a linhagem Norte ovipositou 93 ovos todos sem viabilidade. No fotoperíodo 14: 10 (L: E) a temperatura de 25 º C foram observados grande número de ovos e viabilidade, porém os dados não foram quantificados. Para tratamentos expostos a 18 ºC não houve oviposição.

Tabela 5. Número de ovos e viabilidade dos ovos de duas linhagens (S x N) de *E. heros* submetidas a diferentes temperaturas (21 e 25 ºC) e regimes de luz (10: 14, 11,5: 12,5 e 14: 10 (L: E)). * Dados não quantificados.

Número de ovos e viabilidade da linhagem Sul						
	10: 14 (L: E)		11,5: 12,5 (L: E)		14: 10 (L:E)	
	21 ºC	25 ºC	21 ºC	25 º C	21 ºC	25 ºC
Nº ovos	19	47	155	180	38	NA*
Nº Ninfas	0	6	0	0	11	NA
Número de ovos e viabilidade da linhagem Norte						
	10: 14 (L: E)		11,5: 12,5 (L: E)		14: 10 (L:E)	
	21 ºC	25 ºC	21 ºC	25 º C	21 ºC	25 ºC
Nº ovos	43	32	32	21	93	NA
Nº Ninfas	0	13	0	0	0	NA

3.4 DISCUSSÃO

Não houve eclosão de ninfas para os ovos submetidos a temperatura de 14 ºC para ambas as linhagens, embora os ovos tenham alterado coloração não foi registrado completo desenvolvimento embrionário. O resultado concorda com os encontrados para *Dichelops melacantus e Oncopeltus fasciatus* que também não apresentaram eclosão de ninfas quando ovos foram submetidos a 15 ºC (CHOCOROSQUI; PANIZZI, 2003; LIN; HODSON; RICHARDS, 1954). A ausência de eclosão na temperatura de 14 ºC pode ser atribuída devido à proximidade do limite térmico inferior (TB) de ovos de *E. heros* que é de 13,6 ºC, inferido por CIVIDANES; PARRA, (1994). Evidencia-se que ambas as linhagens não são

capazes de completar desenvolvimento embrionário a temperaturas próximas ao limite térmico inferior.

Para a fase de vida de ovos foi verificado que a temperatura de 18ºC juntamente com fotoperíodo curto (10L: 14E) aumentaram o tempo necessário para completar o desenvolvimento e reduziram a sobrevivência. Efeito contrário foi verificado para temperatura de 25 ºC e fotoperiodo longo (14L: 10E), com menor tempo de desenvolvimento e maior sobrevivência. A interação do efeito de temperatura e fotoperíodo no desenvolvimento dos ovos também foi encontrado para *Pizodorus guildinii* por ZERBINO; ALTIER; PANIZZI, (2013) e a interação temperatura e desenvolvimento foi similar ao encontrado em *Nezara Viridula* por VIVAN; PANIZZI, (2005). Em trabalho anterior com *E. heros* MOURÃO; PANIZZI, (2000) verificaram que o fotoperíodo curto aumentou o tempo de desenvolvimento da espécie sob a temperatura constante de 25 ºC, efeito não observado no presente estudo. Que por sua vez concorda com resultados para *Nezara viridula* e *Oebalus poecilus* (ALBUQUERQUE, 1993; ALI; EWIESS, 1977). Em temperaturas mais altas o desenvolvimento foi mais curto concordando com resultados obtidos para *E. heros* por CIVIDANES; PARRA, (1994).

A interação da temperatura baixa e fotoperíodo curto influenciou significativamente no tempo de desenvolvimento das fases imaturas (ninfas) e viabilidade exceto para quarto e quinto instar. Em condições de fotoperíodo curto (10: 14) juntamente com a menor temperatura (18 ºC) as ninfas demandaram mais tempo para completar o desenvolvimento e incrementou a mortalidade. Efeito inverso foi observado em temperatura mais eleveda (25 ºC) e fotoperíodo longo (14:10), menor tempo necessário para competar a fase com menor mortalidade. Neste sentido, os resultados encontrados neste estudo são similares aos encontrados nos pentatomideos *N. viridula* e *P. guildinii* que apresentaram a mesma relação da temperatura e fotoperíodo nas fases imaturas (VIVAN; PANIZZI, 2005; ZERBINO; ALTIER; PANIZZI, 2013). Porém, ninfas de *N. viriula* expostas a dias curtos e temperatura 25 ºC desenvolveram mais rápido quando comparados aos expostos a dias longos (MUSOLIN; NUMATA, (2003). O tempo de desenvolvimento para completar as fazes imaturas de *Dichelops melachantus* foi maior para temperaturas de 20 ºC e menor para temperatura de 25 ºC (CHOCOROSQUI; PANIZZI, 2003). Os resultados demonstram que o fotoperíodos e a temperatura

afetam significativamente no tempo de desenvolvimento e a viabilidade das fases jovens nas duas linhagens de *E. heros*.

O tempo de desenvolvimento e a viabilidade para as fases imaturas (ovo-adulto) foi influenciado pela interação temperatura e linhagem e temperatura e fotoperíodo. As duas linhagens expressaram maior tempo de desenvolvimento quando expostas a temperatura de 21 ºC, porém a viabilidade da linhagem Sul foi maior com mais horas de luz. Resultados similares foram encontrados para *P. guildinni* exposto sob diferentes temperaturas (20 ºC a 25 ºC) e fotoperídos (10: 14 e 14: 10 (L: E)) onde menos horas de luz e temperaturas baixas aumentaram o tempo de desenvolvimento e reduziram a viabilidade de fases imaturas (ZERBINO; ALTIER; PANIZZI, 2013). Diferenças na viabilidade das linhagens foi observado podendo ser atribuído ao efeito de latitude de origem das linhagens discutido mais adiante.

A resposta ao fotoperíodo foi distinta nas duas linhagens de *E. heros*, a condição de dias curtos foi indutora da expressão do fenótipo da dormência na linhagem Sul, porém não foi observado morfologicamente para a linhagem Norte. A proporção de desenvolvimento das gônadas da linhagem Norte foi superior em todas as condições climáticas, exceto para fotoperído 11,5: 12,5 e temperatura 25 ºC. Fica evidente que o desenvolvimento folicular e de oócitos foi menos influenciado por fotoperíodo e temperatura baixas para a linhagem Norte. Tendo em vista que o local de permanência das linhagens difere abruptamente em condições climáticas e de fotoperíodo esse é um resultado consistente. Resposta distintas a fotoperiodo é um fenômeno reportado em Pentatomidae em *Orius sauteri* e *Lygaeus equestris* em populações do Japão e Europa, respectivamente (ITO; NAKATA, 2000; SOLBRECK; SILLÉN-TULLBERG; SILLEN-TULLBERG, 1981). Por outro lado, em estudo *N. viridula* com populações de origem tropical e subtropical, todas população responderam com alta taxa de expressão de dormência sob efeito do fotoperiodo (MUSOLIN; TOUGOU; FUJISAKI, 2011).

A temperatura influenciou o desenvolvimento de gônadas para a linhagem Sul, porém teve efeito muito menos acentuado para a linhagem Norte. Em estudo com *P. guildinni* a temperatura influenciou na performance reprodutiva com redução de massas de ovos. (ZERBINO; ALTIER; PANIZZI, 2013). RAE CHO et al., (2008) observaram que temperaturas menores incrementaram taxa de indivídios em dormência em *Scotinophara lurida*. O efeito da temperatura não foi observado nos

pentatomideos *N. viridula* e *Riptortus clavatuse* em que mesmo sob temperaturas diferentes o fotoperíodo foi o fator determinante para expressão da dormência (KOBAYASHI; NUMATA, 1995; MUSOLIN; NUMATA, 2003).

Em *E. heros* a dormência é facultativa na fase adulta confirmando com os resultados aqui apresentados. A resposta morfológica ao fotoperíodo e expressão da dormência foi mais acentuada na linhagem Sul, contudo uma massa de ovos viável foi observada. Por outro lado, a linhagem Norte expressou resposta morfológica menos intensa ao fotoperíodo na maioria dos indivíduos, embora uma massa de ovos produzidas apresentou viabilidade. Indivíduos que destoam muito da média da população é uma característica da resposta à dormência sendo reportado em várias espécies, sendo vista como fonte de variabilidade para ambientes imprevisíveis (DANKS, 1983, 1987b). Respostas distintas aos fatores ambientais são comuns em populações de latitudes diferentes, onde a resposta aos sinais ambientais são inerentes ao local de origem da população e pode estar relacionada nas diferenças genéticas acumuladas (DANKS, 1987b; DENLINGER, 1986). Este fenômeno foi relatado para *Nasonia vitripenniss*, *D. melanogaster D. montana*, *Trichogramma drendrolimi*, *Laodelphax striatellus* (HOU et al., 2016; PAOLUCCI; VAN DE ZANDE; BEUKEBOOM, 2013; SCHMIDT et al., 2005; TYUKMAEVA et al., 2011; ZHANG et al., 2017). Pode-se prever que a linhagem Norte tenha uma resposta mais rápida de reversão da dormência quando as condições ambientais se revertem.

A descoberta da ocorrência de duas linhagens de *E. heros* no Brasil com origens geográficas distintas levantou questões importantes quanto ao seu manejo. Conhecer a fenologia das duas linhagens e as respostas a fatores abióticos oferecem informações úteis, o número de gerações por ano são importantes para implementação de um programa de manejo mais eficiente (HAYE et al., 2014). Do mesmo modo conhecer as respostas das duas linhagens aos fatores abióticos permite prever à qual ambiente as duas podem se estabelecer.

Outro questionamento importante a ser levado em consideração é quanto a adaptação à hospedeiros, tendo em vista o aumento de ocorrência da espécie em outras culturas. A expressão da dormência pode significar retomada de desenvolvimento mais acelerado e a espécie buscar hospedeiros alternativos. Assim, os resultados oferecem subsídios valiosos para entender melhor a dinâmica populacional de *E. heros* e os efeitos que os fatores abióticos tem sobre as duas linhagens. Contudo, maiores estudos são necessários especialmente no que se

refere a adapatação à hospedeiros para compreender o real impacto das linhagens de *E. heros* em agroecossistemas do Brasil.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, G. S. Planting time as a tactic to manage the small rice stink bug, *Oebalus poecilus* (Hemiptera, Pentatomidae), in Rio Grande do Sul, Brazil. **Crop Protection**, v. 12, n. 8, p. 627–630, dez. 1993.

ALI, M.; EWIESS, M. A. Photoperiodic and temperature effects on rate of development and diapause in the green stink bug, *Nezara viridula* L. (Heteroptera: Pentatomidae). **Zeitschrift für Angewandte Entomologie**, v. 84, n. 1–4, p. 256–264, 26 ago. 1977.

CHOCOROSQUI, V. R.; PANIZZI, A. R. Photoperiod influence on the biology and phenological characteristics of *Dichelops melacanthus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, n. 4, p. 655–664, nov. 2003.

CIVIDANES, F.; PARRA, J. R. Biologia em diferentes temperaturas e exigências térmicas de percevejos pragas da soja. II. *Euschistus heros* (Fabr.) (Heteroptera: Pentatomidae). **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 29, p. 1841–1846, 1 dez. 1994.

DANKS, H. V. Extreme Individuals in Natural Populations. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v. 29, n. 1, p. 41–48, 1 mar. 1983.

DANKS, H. V. Variation in response. In: **Insect Dormancy: an ecological perspective. Biological Survey of Canada (Terrestrial Arthropods)**. Ottawa: 1987, p. 439.

DENLINGER, D. L. Dormancy in Tropical Insects. **Annual Review of Entomology**, v. 31, n. 1, p. 239–264, 1986.

DENLINGER, D. L.; YOCUM, G. D.; RINEHART, J. P. 10 – Hormonal Control of Diapause. In: **Insect Endocrinology**. [s.l: s.n.]. p. 430–463.

GILBERT, L. I. **Insect Endocrinology**. San Diego: Academic Press, 2012.

HAYE, T. et al. Phenology, life table analysis and temperature requirements of the invasive brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys*, in Europe. **Journal of Pest Science**, v. 87, n. 3, p. 407–418, 2014.

HOU, Y.-Y. et al. Geographic variation of diapause and sensitive stages of photoperiodic response in *Laodelphax striatellus* Fallén (Hemiptera: Delphacidae). **Journal of Insect Science**, v. 16, n. 1, p. 13, 1 jan. 2016.

HUNTER, M. D.; MCNEIL, J. N. Host-plant quality influences diapause and voltinism in a polyphagous insect herbivore. **Ecology**, v. 78, n. 4, p. 977–986, 1 jun. 1997.

ITO, K.; NAKATA, T. Geographical variation of photoperiodic response in the females of a predatory bug, *Orius sauteri* (Poppius) (Heteroptera: Anthocoridae) from northern Japan. **Applied Entomology and Zoology**, v. 35, n. 1, p. 101–105, 2000.

KOBAYASHI, S.; NUMATA, H. Effects of temperature and photoperiod on the induction of diapause and the determination of body coloration in the bean bug, *Riptortus clavatus*. **Zoological Science**, v. 12, n. 3, p. 343–348, 1 jun. 1995.

LIN, S.; HODSON, A. C.; RICHARDS, A. G. An analysis of threshold temperatures for the development of *Oncopeltus* and *Tribolium* eggs. **Physiological Zoology**, v. 27, n. 4, p. 287–311, 1 out. 1954.

MOURÃO, A. P. M.; PANIZZI, A. R. Estágios ninfais fotossensíveis à indução da diapausa em *Euschistus heros* (Fabr.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 29, n. 2, p. 219–225, jun. 2000a.

MOURÃO, A. P. M.; PANIZZI, A. R. Photophase influence on the reproductive diapause, seasonal morphs, and feeding activity of *Euschistus heros* (FABR., 1798) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE). **Braz. J. Biol**, v. 62, n. 2, p. 231–238, 2002.

MUSOLIN, D. L.; NUMATA, H. Photoperiodic and temperature control of diapause induction and colour change in the southern green stink bug *Nezara viridula*. **Physiological Entomology**, v. 28, n. 2, p. 65–74, 1 jun. 2003.

MUSOLIN, D. L.; TOUGOU, D.; FUJISAKI, K. Photoperiodic response in the subtropical and warm-temperate zone populations of the southern green stink bug *Nezara viridula*: why does it not fit the common latitudinal trend? **Physiological Entomology**, v. 36, n. 4, p. 379–384, 1 dez. 2011.

PAOLUCCI, S.; VAN DE ZANDE, L.; BEUKEBOOM, L. W. Adaptive latitudinal cline of photoperiodic diapause induction in the parasitoid *Nasonia vitripennis* in Europe. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 26, n. 4, p. 705–718, 2013.

RAE CHO, J. et al. Effect of photoperiod and temperature on reproductive diapause of *Scotinophara lurida* (Burmeister) (Heteroptera: Pentatomidae). **Journal of Asia-pacific Entomology**, v. 11, p. 53–57, 1 jun. 2008.

RODRIGUES, W. C. Fatores que Influenciam no Desenvolvimento dos Insetos. **Info Insetos**, v. 1, n. 4, p. 1–4, 2004.

SAULICH, A. K.; MUSOLIN, D. L. Diapause in the seasonal cycle of stink bugs (Heteroptera, Pentatomidae) from the Temperate Zone. **Entomological Review**, v. 92, n. 1, p. 1–26, mar. 2012.

SCHMIDT, P. S. et al. Geographic variation in diapause incidence, life-history traits, and climatic adaptation in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**, v. 59, n. 8, p. 1721, 2 set. 2005.

SOARES, P. L. et al. The reunion of two lineages of the Neotropical brown stink bug on soybean lands in the heart of Brazil. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 2496, 6 dez. 2018.

SOLBRECK, C.; SILLÉN-TULLBERG, B.; SILLEN-TULLBERG, B. Control of diapause in a “monovoltine” insect, *Lygaeus Equestris* (Heteroptera). **Oikos**, v. 36, n. 1, p. 68, jan. 1981.

TAUBER, M. J.; TAUBER, C. A.; MASAKI, S. **Seasonal Adaptations in Insects**. Oxford: Oxford University Press, 1986.

TYUKMAEVA, V. I. et al. Adaptation to a seasonally varying environment: A strong latitudinal cline in reproductive diapause combined with high gene flow in *Drosophila montana*. **Ecology and Evolution**, v. 1, n. 2, p. 160–168, out. 2011.

VIVAN, L. M.; PANIZZI, A. R. Nymphal and adult performance of genetically determined types of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae), under different temperature and photoperiodic conditions. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 6, p. 911–915, dez. 2005.

ZERBINO, M. S.; ALTIER, N. A.; PANIZZI, A. R. Effect of photoperiod and temperature on nymphal development and adult reproduction of *Piezodorus guildinii* (Heteroptera: Pentatomidae). **Florida Entomologist**, v. 96, n. 2, p. 572–582, 2013.

ZHANG, J.-J. et al. Geographic variation of diapause induction rates in *Trichogramma drendrolimi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) in China. **Journal of Economic Entomology**, v. 110, n. 2, p. 386–391, 1 abr. 2017.

66 .

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho conclui que as duas linhagens de *E. heros* que ocorrem no Brasil aparentemente não apresentam barreiras reprodutivas pós-zigoticas e expressam fenótipos distintos quando expostas a extresse ambiental. A ausência de barreiras reprodutivas pode significar aumento de vigor híbrido de populações em regiões geográficas onde elas se sobrepõem. A diferença de resposta aos fatores abióticos como fotoperíodo e temperatura e a aparente ausência de barreiras reprodutivas indicam que ambas as linhagens estão trocando alelos que podem aumentar o potencial adaptativo. A hibridação pode significar colonização de novas regiões bem como transição de hospedeiros.

As implicações destes resultados vão ao encontro do atual status da praga em regiões agrícolas do Brasil. Considerada praga secundária a poucas décadas, atualmente se tornou praga chave na sojicultora nacional. Na região do Cerrado, região de mistura das duas linhagens, coincide com recorrentes explosões populacionais da praga. Além disso, há relatos cada vez mais frequentes da transição da praga para outros cultivos especialmente o algodão.

O conhecimento da fenologia, das respostas aos fatores ambientais bem como o potencial reprodutivo das linhagens fornece informações valiosas para desenvolver um programa de manejo integrado. As respostas aqui encontradas oferecem dados relevantes que podem ser utilizadas por pesquisadores, extensionistas e produtores na implementação e desenvolvimento de estratégias de manejo dessa praga.

Maiores estudos demandam ser realizados para verificar o real impacto das duas linhagens no cenário agrícola nacional. A recorrência nas falhas de controle pode estar relacionada com a dinâmica populacional da espécie. Também se fazem necessários acessar se existe algum tipo de transição de hospedeiros e se esta se expressa de maneira similar ou diferente nas duas lihnagens bem como na prole híbrida.