

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIELLY SILVEIRA RICHARDT

HAPLÓTIPOS DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE),
UMA ESPECIAÇÃO INCIPIENTE.

CURITIBA

2018

FRANCIELLY SILVEIRA RICHARDT

HAPLÓTIPOS DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE),
UMA ESPECIAÇÃO INCIPIENTE.

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Zoologia, no Curso
de Pós-Graduação em Zoologia, Setor de Ciências
Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luís Amilton Foerster

Co-orientadora: Dr. Adriana Micheli

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Richardt, Franciely Silveira
Haplótipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), uma
especiação incipiente. / Francielly Silveira Richardt. – Curitiba, 2018.
80 p. : il. ; 30cm.

Orientador: Luís Amilton Foerster
Co-orientadora: Adriana Micheli
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

1. Lagarta. 2. Haplótipos. 3. Lepidoptero. I. Título. II. Foerster, Luís Amilton.
III. Micheli, Adriana. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Zoologia.

CDD (20. ed.) 595.78



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **FRANCIELLY SILVEIRA RICHARDT** intitulada: **HAPLÓTIPOS DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE), UMA ESPECIAÇÃO INCIPIENTE**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 20 de Setembro de 2018.

LUÍS AMILTON FOERSTER
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

RAFAEL ANTUNES BAGGIO
Avaliador Externo (FIES)

MÁRIO ANTONIO NAVARRO DA SILVA
Avaliador Interno (UFPR)

“Em homenagem a Elda Aparecida de Lima Cordeiro, que nos deixou durante a redação desse trabalho. Você foi uma guerreira, mulher íntegra, forte e digna de exemplo de mãe coruja. Você se foi para sempre, mas conosco fica sua memória e a lembrança de tudo que vivemos ao seu lado. Tudo isso será guardado e estimado como um tesouro por todas as nossas vidas.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar e me proteger em meu caminho, e também por ser minha fonte de energia nas horas árduas e difíceis;

Ao meu orientador professor Dr. Luís Amilton Foerster, por ter me aceito como orientada, mesmo eu tendo escolhido uma linha de pesquisa um pouco diferenciada da de seu costume, e principalmente, pela paciência e dedicação;

À minha co-orientadora Adriana Micheli por todo o apoio, incentivo, profissionalismo e ensinamentos que levarei por toda vida;

Aos membros da banca que me acompanham desde o início do projeto, Prof Dr Mario Navarro da Silva e Dr Vinicius Richardi por todas as dicas e sugestões dadas durante o caminho. E também Dr Rafael Baggio pelo auxílio no desenvolvimento e na análise dos dados;

Ao curso de Pós Graduação em Zoologia pela oportunidade da realização do mestrado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa durante o período do curso;

À Fundação ABC - Pesquisa e Desenvolvimento Agropecuário, principalmente, ao Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LabEF), pela oportunidade de realização deste trabalho em suas dependências;

À todos os colegas do LabEF que me ajudaram sempre que possível a cuidar das minhas lagartas, principalmente a Daniele Tasiar, por se dispor a me auxiliar em todas as etapas desse projeto, por ser praticamente minha “co-co-orientadora”, seu auxílio foi de fundamental importância para este trabalho;

Aos colegas da Entomologia e equipe TOP (Time operacional de pesquisa) que auxiliaram nas coletas;

À colega, Jessica Cocco que enviou da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) mariposas para meu estudo e também Dr Rob Meagher do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - Serviço de pesquisa agrícola (USDA-ARS) que me

enviou indivíduos para o controle positivo do biótipo arroz. Sem o auxílio de vocês meus resultados não seriam tão robustos;

Aos meus familiares e amigos pelo apoio e compreensão durante minha ausência, principalmente aos meus pais Johann e Arialba pelo auxílio financeiro, ao meu irmão Charlie e minha irmã de coração, sua esposa Nellie, por me acolherem em sua casa durante o tempo que necessitei, ao meu noivo Rafael José Cordeiro que sempre foi paciente e prestativo e é meu suporte nas horas difíceis;

E a todos os colegas da pós graduação que de alguma maneira me ajudaram durante o desenvolvimento do projeto, em especial Joyce Ana Teixeira e Andrea Desiderato, que foram meus “co-co-co-orientadores”, sem vocês eu ainda estaria fazendo as análise.

Muito obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

RESUMO

A lagarta-do-cartucho ou lagarta-militar *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) é a principal praga da cultura do milho no Brasil e, nos últimos anos, tem se expandido para várias outras culturas. Esta espécie tem sido geneticamente diferenciada em biótipos associados às suas principais plantas hospedeiras, milho e arroz. Diferenciar os biótipos é de suma importância uma vez que há resposta diferencial aos inseticidas utilizados. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi verificar a existência dos biótipos de *S. frugiperda* em diferentes culturas no Estado do Paraná e em São Paulo e uma análise de delimitação de espécie na tentativa de definir o atual *status* de *S. frugiperda*. Esta dissertação foi dividida em três capítulos: o primeiro capítulo compreende o levantamento bibliográfico sobre os biótipos; o segundo apresenta a identificação dos biótipos nas regiões estudadas; e o terceiro, uma discussão referente à delimitação de espécie para *S. frugiperda*. Foram coletadas lagartas em: milho (Arapoti, Ponta Grossa, Tibagi – PR e Itaberá – SP), aveia preta (Tibagi e Wenceslau Braz – PR), milheto (Tibagi – PR) e duas oviposições coletadas em armadilhas de feromônio no trigo (Tibagi – PR). O DNA genômico dos adultos foi extraído através do protocolo CTAB com modificações. A identificação dos biótipos foi realizada através de PCR-RFLP da região COI com as enzimas de restrição MspI e SacI. Para a delimitação de espécies foram utilizadas: análise de *locus* simples (COI) e *multilocus* (COI+28S), GMYC, ABGD, bPTP, PhyloMap-PTP e PhyML. Foram genotipados 66 indivíduos, dos quais 51 apresentaram o padrão do biótipo milho, cinco o padrão do biótipo arroz e 10 apresentaram os dois padrões, indicando a presença de híbridos. Para a delimitação de espécie, 113 indivíduos foram sequenciados. A análise de *locus* simples (COI), dividiu *S. frugiperda* em dois grupos, correspondentes aos biótipos milho e arroz, entretanto a análise *multilocus* (COI+28S) não os separou. Para verificar a eficiência dos genes 28S e COI, uma análise do gênero *Spodoptera* foi realizada; o gene 28S não separou as espécies dentro do gênero, porém o gene COI foi eficiente para esta separação. A análise de GMYC e ABGD não recuperaram os biótipos como espécies distintas, entretanto para as análises de bPTP, PhyloMap-PTP e PhyML foi possível visualizar a diferenciação genética desses biótipos. Confirma-se assim a presença dos dois biótipos de *S. frugiperda* no Paraná e em São Paulo. O gene 28S não é eficiente para delimitação de espécies de *Spodoptera* e são necessárias análises mais aprofundadas com diferentes metodologias de investigação para definição do atual *status* de *S. frugiperda*.

Palavras-chave: Enzima de restrição. Biótipos de *S. frugiperda*. Delimitação de espécie. Especiação ecológica. Especiação simpátrica.

ABSTRACT

The fall armyworm or armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797), is the major maize pest in Brazil and, in recent years, is expanding to various crops. This species, which is genetically differentiated into biotypes, is associated to one of its main host plants, maize and rice. Differentiating the biotypes is of extreme importance since there is a differential response of the species to the insecticides used. Therefore, the aim of this research was to assess the existence of the biotypes in different cultures in the States of Paraná and in São Paulo and an analysis of species delimitation in an attempt to define the current status of *S. frugiperda*. This dissertation was divided into three chapters: the first chapter comprising the bibliographical survey on the subject; the second presents an identification of the biotypes in the studied regions; and the third a discussion on species delimitation for these biotypes. Fall armyworm larvae were collected in maize (Arapoti, Ponta Grossa, Tibagi – PR e Itaberá – SP), black oats (Tibagi e Wenceslau Braz – PR), millet (Tibagi – PR) and two ovipositions collected in pheromone traps in wheat (Tibagi – PR). Genomic DNA was extracted through the CTAB protocol with modifications. The identification of the biotypes was performed through the PCR-RFLP of the COI with the restriction enzymes MspI and SacI. For the delimitation of species analysis of simple locus (COI) and multilocus (COI + 28S), GMYC, ABGD, bPTP, PhyloMap-PTP and PhyML were used. Sixty-six individuals were genotyped, of which 51 showed the pattern of the maize biotype, five the pattern of biotype rice and 10 of both biotypes, indicating the presence of hybrids. For a species delimitation, 113 individuals were sequenced. The simple locus analysis (COI), divided *S. frugiperda* into two groups, corresponding to the maize and rice biotypes, meanwhile the multilocus analysis (COI + 28S) did not separate them. To assess the efficiency of the 28S and COI genes, an analysis of the genus *Spodoptera* was performed, the 28S gene did not separate the species within the genus, but the COI gene was efficient for this separation. The GMYC and ABGD analysis did not recover the biotypes as distinct species, however, from an bPTP, PhyloMap-PTP and PhyML analysis it was possible to visualize the genetic differentiation of these biotypes. It is concluded that both biotypes of *S. frugiperda* occur in Paraná and in São Paulo. The 28S gene is not efficient for delimiting species of *Spodoptera*. Further analysis is required with different research methodologies to define the current status of *S. frugiperda*.

Key-words: Restriction enzyme. Strains of *S. frugiperda*. Specie delimitation. Citocromo oxidase I. Nuclear DNA.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1: Larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797). A - Visão longitudinal da faixa dorsal; B - Pináculos na base das cerdas, com ênfase nos quatro pontos no último segmento abdominal formando um quadrado; C - suturas formando o Y invertido na cabeça; D – Fêmea; E – Macho.....22

CAPITULO II

Figura 1: Locais de coleta das lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) no município do Paraná e São Paulo.38

Figura 2: Amostras de DNA genômico em gel de agarose 1%. M - Marcador molecular (100pb). 1- 10: Indivíduos da população controle biótipo milho.40

Figura 3: A – Produto da PCR-RFLP sem tratamento com enzimas de restrição. B - Tratamento com a enzima de restrição MspI. C - Tratamento com a enzima de restrição SacI. Individuo 3 representando o biótipo arroz, indivíduos 9 e 10 representando os híbridos e o restante são representantes do biótipo milho. M- Marcador molecular (100pb). Gel de agarose 2%.41

CAPITULO III

Figura 1: Rede de haplótipos obtida por TCS no software Popart 1.7, a partir das 41 sequências de COI. As mutações são os riscos que cortam as ligações entre as esferas. A frequência de cada haplótipo é indicada pelo diâmetro da esfera. Esfera A apresentando os haplótipos por locais de coleta e Espera B indicando os haplótipos por biótipos.54

Figura 2: Árvore consenso de Inferência Bayesiana de espécies de *Spodoptera frugiperda*. Os números dos nós correspondem aos valores da probabilidade posterior maiores que 0,9. Ramo rosa indicando o clado do biótipo arroz e os ramos azuis o clado do biótipo milho. 64 táxons e 477 caracteres. Modelo TrN + I. Gene mitocondrial utilizando os primers LCO e HCO.57

Figura 3: Árvore consenso de Inferência Bayesiana de matriz concatenada do gene COI e 28S com modelo evolutivo TN+I, 1134 caracteres, 47 táxons dois quais 15 são

grupos externos compostos de outras *Spodoptera*. Valores de PP apresentados na árvore..58

Figura 4: Matriz composta de sequências do gene COI de 49 indivíduos com 477 caracteres. Árvores das quatro partições resultantes da análise ABGD, cores apresentam os grupos gerados na análise. A- 1º partição; B- 2º partição; C- 3º partição e D- 4º partição.60

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II

Tabela 1: Resultado da PCR-RFLP do gene mitocondrial COI. Número de indivíduos genotipados de *Spodoptera frugiperda* por localidade e cultura coletada. ...41

CAPITULO III

Tabela 1: Localidades de coleta com localização geográfica, identificação laboratorial e cultura coletada.49

Tabela 2: - Identificação dos biótipos de *Spodoptera frugiperda* através do sequenciamento do gene mitocondrial COI.56

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	16
CAPÍTULO 1 – BIÓTIPOS DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE): HISTÓRICO E DEFINIÇÃO	18
1.1 <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797).....	21
1.2 Primeira citação da existência de biótipos de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797)	22
1.3 Compatibilidade reprodutiva entre os biótipos	23
1.4 Feromônios	26
1.5 Adaptação dos biótipos aos hospedeiros.....	27
1.6 Sazonalidade	29
1.7 Morfologia dos biótipos	29
CAPÍTULO II – BIÓTIPOS DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) EM DIFERENTES CULTURAS	31
2.1 INTRODUÇÃO	33
2.1.1 Biótipos de <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797) no Brasil	34
2.1.2 Metodologias para identificação dos biótipos.....	34
2.1.3 Controle de <i>S. frugiperda</i>	35
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.2.2 Extração de DNA.....	38
2.2.3 PCR-RFLP	38
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
2.3.1 Extração do DNA genômico.....	39
2.3.2 Identificação molecular dos biótipos de <i>S. frugiperda</i> através de PRC- RFLP	40
2.4. CONCLUSÃO.....	42
CAPÍTULO III – ESPECIAÇÃO INCIPIENTE DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)	44
3.1 INTRODUÇÃO	46
3.2 MATERIAS E MÉTODOS	49
3.2.1 Coleta das <i>Spodoptera</i>	49
3.2.2. Extração do DNA genômico	50
3.2.3. Análise filogenética.....	
3.2.3.1. Rede de haplótipos.....	
3.2.3.2. Análise de <i>locus</i> simples (COI) e <i>multilocus</i> (COI + 28S).....	50
3.2.3.3. Análise de ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery).....	52

3.2.3.4. Análise de PhyML.....	52
3.2.3.5. Análise de GMYC (General Mixed Yule-coalescent Model)	53
3.2.3.6. bPTP e PhyloMap-PTP	53
3.3 RESULTADOS.....	54
3.3.1. Rede de haplótipos.....	54
3.3.2 Análise <i>locus</i> simples e <i>multilocus</i>	55
3.3.3. ABGD	59
3.3.4 PhyML.....	60
3.3.5. GMYC.....	61
3.3.6. bPTP e PhyloMap-PTP	61
3.4 CONCLUSÃO	62
CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICES	74

INTRODUÇÃO

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das principais pragas agrícolas do Brasil, atingindo principalmente a cultura do milho. É um inseto polífono que se desenvolve em cerca de 100 espécies de plantas (POGUE, 2002).

Pashley (1986) encontrou diferenças genéticas entre populações de *S. frugiperda* coletadas no milho e populações coletadas no arroz e sugeriu a divisão de *S. frugiperda* em dois grupos de acordo com a cultura em que foi coletada. Barreiras pré-reprodutivas foram descritas por Pashley, Hammond e Hardy (1992) que encontraram diferenças nos ciclos de atividade noturna e escolha de parceiro.

Outros estudos também relataram diferenças em características reprodutivas tais como sonorização feminina e masculina (GROOT et al., 2009; SCHÖFL; HECKEL; GROOT, 2009) e diferenças na composição dos feromônios (GROOT et al., 2008; LIMA; MCNEIL, 2009; CAÑAS-HOYOS; LOBO-ECHEVERRI; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2017). Entretanto, acredita-se que devido à combinação de diferentes barreiras de isolamento, essas populações de *S. frugiperda* não se fundem em uma população panmítica (GROOT et al., 2010).

Diversos termos são utilizados na literatura para denominar esses grupos, tais como: *Host races*, *Sibling species*, *Host form* e a mais utilizada *Strain*, que pode ser traduzida como raças ou cepas. Neste estudo iremos utilizar o termo Biótipos, que em biologia significa grupo de indivíduos que apresentam o mesmo genótipo. Os biótipos podem ser diferenciados pelo uso de vários marcadores moleculares, entre os mais utilizados, está o RFLP a partir do gene mitocondrial da citocromo oxidase I (COI) com as enzimas de restrição MspI ou SacI (LEVY et al. 2002; MEAGHER; GALLO-MEAGHER, 2003; NAGOSHI et al., 2006).

O controle de *S. frugiperda* é realizado através da utilização de inseticidas e de plantas modificadas geneticamente (Bt). Diferenças na susceptibilidade dos biótipos já foram descritas tanto para os inseticidas (BUSATO et al., 2006; HAY-ROE; MEAGHER; NAGOSHI, 2011; RÍOS-DÍEZ; SIEGFRIED; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2011) quanto para as plantas Bt (RÍOS-DÍEZ; SIEGFRIED; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2012).

Acredita-se que esse inseto está passando por uma especiação simpátrica (MACHADO et al., 2008; DUMAS et al., 2015); esse tipo de especiação se dá quando duas populações de uma mesma espécie vivem em uma mesma área, mas não há cruzamento entre elas.

Vários estudos sobre diferenças entre os biótipos foram publicados, entretanto, artigos sobre delimitação de espécie para *S. frugiperda* são escassos. Visando esta ideia e também a resposta diferencial dos biótipos às formas de controle na agricultura, este estudo tem por objetivo a identificação dos biótipos de *S. frugiperda* através de PCR-RFLP em algumas regiões no Estado do Paraná e São Paulo e avaliar o grau de diferenciação genética na tentativa de definir o atual *status* desse inseto por meio de diferentes metodologias de delimitação de espécie.

CAPÍTULO 1

**BIÓTIPOS DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH, 1797) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE): HISTÓRICO E DEFINIÇÃO**

RESUMO

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) conhecida como lagarta-do-cartucho é atualmente dividida em dois biótipos devido a diferenças genéticas encontradas entre elas. Várias pesquisas foram realizadas na tentativa de entender as diferenças que abrangem esta espécie. A incompatibilidade reprodutiva foi descrita a partir de barreiras pré-reprodutivas, como diferenças sazonais, composição dos feromônios, diferença nos ciclos de atividade noturna e escolha de parceiro devido a horário diferenciado de sonorização, cópula e oposição. Híbridos foram obtidos tanto em laboratório quanto encontrados na natureza, sugerindo fluxo gênico entre os biótipos, apesar das diferenças temporais de acasalamento. Barreiras pós-zigóticas também foram descritas através da observação da taxa de letalidade híbrida e esterilidade de F1. O biótipo arroz parece estar fisiologicamente adaptado ao hospedeiro, pois discordâncias entre o biótipo e o habitat de coleta foram encontradas. Apesar de estudos tentarem demonstrar diferenças morfológicas entre os biótipos, ambos são descritos como indistinguíveis até o momento, apresentando somente algumas diferenças reprodutivas, o que dificulta a atualização do status da espécie.

Palavras-chave: Incompatibilidade reprodutiva. Híbridos. Barreira pré-reprodutiva. Barreira pós-reprodutiva. Fluxo gênico.

ABSTRACT

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) known as the Fall armyworm is currently divided into two biotypes because of the genetic differences found between them. A lot of research has been carried out in an attempt to understand the differences involving this species. Reproductive incompatibility was described from pre-reproductive barriers, such as seasonal differences in the composition of pheromones, difference in cycles of nocturnal activity and choice of partner due to the differentiated schedule of sonorization, copulation and opposition. Hybrids were obtained in the laboratory and found in nature, suggesting gene flow between the biotypes, despite the temporal differences of mating. Post-zigotic barriers have also been described by observing the hybrid lethality rate and F1 sterility. The rice biotype is physiologically adapted to the host, since disagreement between the biotype and the collection habitat was found. Although studies have attempted to demonstrate morphological differences between the biotypes, both are described as indistinguishable so far, presenting only some reproductive differences, which makes it difficult to update the status of the species.

Keywords: Reproductive incompatibility. Hybrids. Pre-reproductive barrier. Post-reproductive barrier. Gene flow.

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797)

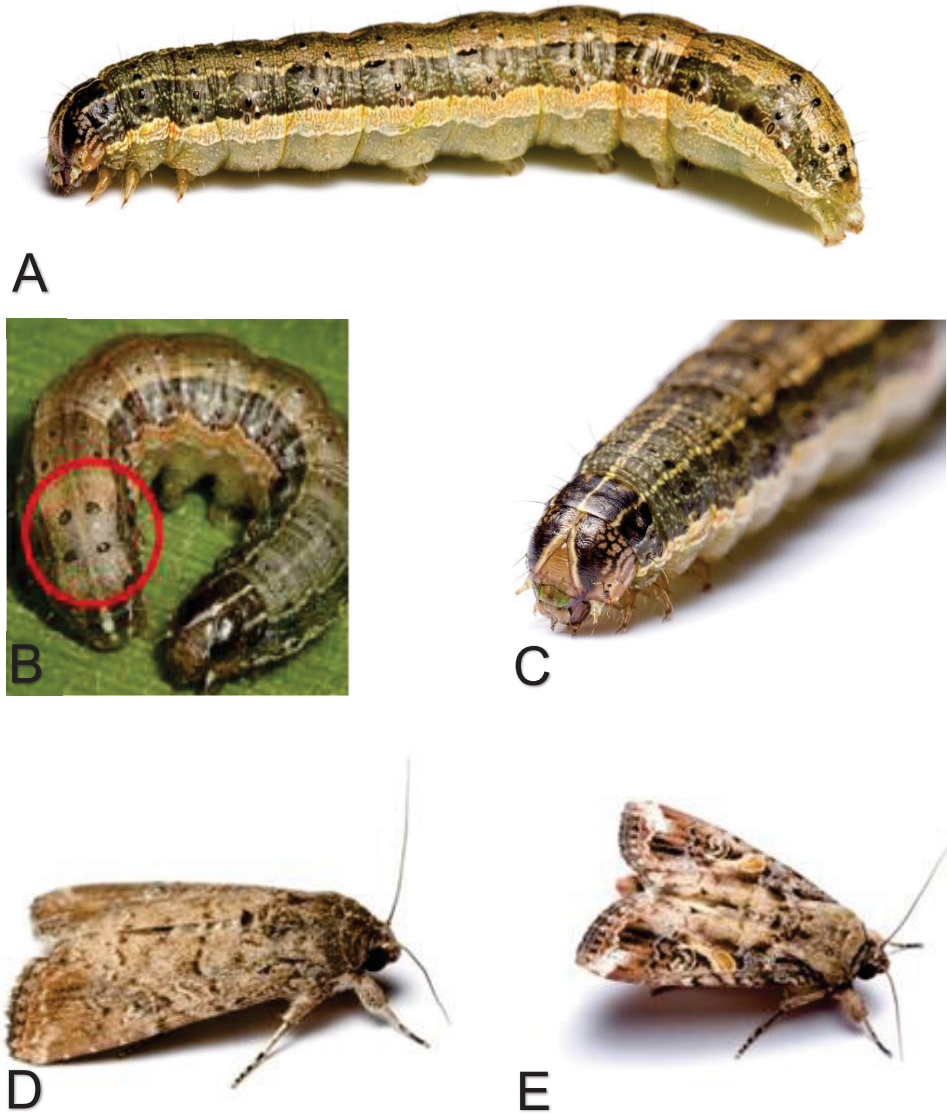
Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) em sua fase larval é conhecida como lagarta-do-cartucho ou lagarta-militar, é considerada uma praga importante de plantas da família Poaceae (gramíneas) como o milho, arroz, trigo, entre outras (LUGINBILL *apud* POGUE, 2002).

Atualmente é a principal praga da cultura do milho no Brasil (CRUZ; MONTEIRO, 2004). Apesar do cartucho ser o local onde normalmente se verifica a sua presença, esta praga ocasiona danos em praticamente todas as fases de desenvolvimento da planta (CRUZ, 2008). No arroz irrigado é conhecida como lagarta-da-folha, alimentando-se de plantas novas, antes da inundação definitiva dos arrozais (BUSATO, 2005).

As larvas passam por seis instares, apresentam coloração que varia de pardo escura, verde até quase preta, apresentando longitudinalmente, uma faixa dorsal (Figura 1A) com pontos pretos (pináculos) na base das cerdas (GALLO et al., 1988). Uma característica importante para a identificação das lagartas no campo, são quatro desses pontos, formando um quadrado bem evidente no último segmento abdominal desse inseto (Figura 1B). A cabeça possui coloração escura com suturas que se cruzam formando um "Y" invertido (Figura 1C), que também é característico da espécie (SARMENTO, 2002).

A fase larval de *S. frugiperda* pode apresentar um comportamento carnívoro, com presença de canibalismo (SARMENTO, 2002). Ao término do período larval, as lagartas penetram no solo para empupar. A pupa possui coloração avermelhada, e após a emergência, surge a mariposa com as asas anteriores de coloração parda-escura e as posteriores, branca acinzentada (GALLO et al., 1988). As asas anteriores do macho ((Figura 1D) possuem manchas mais claras na ponta da asa anterior, diferenciando-os das fêmeas (Figura 1E) (CRUZ, 1995).

Figura 1 - Larvas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797). A - Visão longitudinal da faixa dorsal; B - Pináculos na base das cerdas, com ênfase nos quatro pontos no último segmento abdominal formando um quadrado; C - suturas formando o Y invertido na cabeça; D – Fêmea; E – Macho.



Fonte: Fotos A, C, D e E - MATT BERTONE (2014). Foto B - J.P. MICHAUD (2013).

1.2 Primeira citação da existência de biótipos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797)

Pashley, Johnson e Sparks (1985) analisando a variação genética de populações de *S. frugiperda* da América Central e do Norte, encontraram diferenças genéticas em populações coletadas na cultura do milho e do arroz. A principal suspeita dos autores é que as diferenças poderiam ser resultado da alimentação diferencial. Pashley (1986) descartou esta possibilidade, pois descendentes das duas cepas hospedeiras foram criadas em milho e arroz. A planta hospedeira sobre a qual as larvas foram alimentadas não teve influência no genótipo dos sobreviventes; sendo assim, o autor sugeriu a divisão de *S. frugiperda* em dois biótipos (milho e arroz).

1.3 Compatibilidade reprodutiva entre os biótipos

Pashley e Martin (1987) testaram a compatibilidade reprodutiva entre os biótipos de *S. frugiperda*. Como resultado, não houve nenhum acasalamento bem-sucedido entre as fêmeas do biótipo milho e os machos do biótipo arroz, indicando uma barreira pré-reprodutiva unidirecional, uma vez que o inverso acontecia. Os autores sugeriram então que os biótipos de *S. frugiperda*, seriam espécies irmãs associadas aos hospedeiros.

No entanto, Whitford et al. (1988) obtiveram sucesso no cruzamento em ambas as direções, porém as larvas e pupas do biótipo milho foram significativamente mais pesadas do que as do biótipo arroz quando comparadas alimentando-se dos mesmos hospedeiros. Pashley (1988a) sugeriu que o resultado do cruzamento obtido por Whitford et al. (1988) poderia ser devido a características comportamentais alteradas, resultantes do processo seletivo da colonização, pois Pashley e Martin (1987) utilizaram lagarta-do-cartucho de primeira e segunda ou quarta e quinta geração enquanto Whitford et al. (1988) utilizaram colônias de pelo menos três anos de idade.

Quisenberry (1991) testou o acasalamento com colônias de idades diferentes, e também, com primeira e segunda geração de lagartas coletadas em campo e obteve resultados similares aos de Whitford et al. (1988), ou seja, sucesso no acasalamento em ambas as direções. Dessa forma, Quisenberry (1991) demonstrou que a idade das colônias não afetou a compatibilidade reprodutiva sugerida por Pashley (1988a), e propôs então, que o mecanismo de isolamento pré-reprodutivo entre os biótipos não era fortemente fixado.

Pashley, Hammond e Hardy (1992) testaram potenciais mecanismos de isolamento reprodutivo dos biótipos tais como diferenças sazonais, feromônio, diferença nos ciclos de atividade noturna e escolha de parceiro. A atração por feromônio não foi muito eficaz para a separação, mas foi significativa, pois 60% dos machos do biótipo arroz preferiram fêmeas do biótipo arroz e 65% dos machos do biótipo milho preferiram fêmeas do biótipo milho.

Na tentativa de avaliar o *status* taxonômico dos biótipos de *S. frugiperda*, Prowell, McMichael e Silvain (2004) encontraram uma taxa de 16% de indivíduos híbridos em sua amostragem; a presença de híbridos sugere um fluxo gênico entre os biótipos, apesar das diferenças temporais de acasalamento.

Schöfl, Heckel e Groot (2009) estudaram as diferenças temporais de quatro características reprodutivas (sonorização feminina e masculina, cópula e oviposição) a partir da observação de casais do mesmo biótipo, de casais de biótipos diferentes e de híbridos, podendo determinar assim os efeitos do parceiro de acasalamento, bem como dos pais (herança genética), nessas características reprodutivas. Os resultados do estudo mostraram que a sonorização feminina diferiu significativamente entre os dois biótipos, com as fêmeas do biótipo milho chamando por parceiros antes. O chamado dos machos coincidiu com o das fêmeas, ou seja, estavam intimamente relacionados dentro dos biótipos. Quanto às cópulas, o biótipo milho iniciou antes e apresentou grande variabilidade dentro da população. Ainda que significativamente diferenciada, houve uma grande sobreposição no tempo de sonorização feminina e cópula entre os dois biótipos.

Quanto às heranças das características reprodutivas, o tempo de início da sonorização feminina e masculina foi herdado predominantemente da mãe, já o tempo de início da cópula pareceu ser controlado por uma combinação de fatores autossômicos dominantes do biótipo milho com efeitos maternos, e o tempo de início da oviposição foi herdado de uma forma dominante pela linhagem pura do biótipo milho.

Segundo Schöfl, Heckel e Groot (2009), o isolamento reprodutivo na natureza é potencialmente muito maior do que avaliações individuais da separação aloclônica e a atração diferencial por feromônios sexuais, pois ambos podem agir simultaneamente e, conseqüentemente, contribuir de forma multiplicada.

Desta maneira, os resultados obtidos por Schöfl, Heckel e Groot (2009) (sobreposição no tempo de sonorização feminina e cópula) não invalidam a ideia da diferenciação temporal do acasalamento ser uma importante barreira de isolamento pré-zigótico, porém é necessário uma avaliação de outras prováveis barreiras e suas interações.

Meagher, Nagoshi e Stuhl (2011) testaram a preferência do local de oviposição dos biótipos e observaram que as fêmeas do biótipo milho ovipositaram igualmente nas duas plantas hospedeiras testadas e no tecido que cobria o recinto dos testes. Já as fêmeas do biótipo arroz ovipositaram mais nas plantas de relva quando comparada com as oviposições presentes nas plantas de milho. Para os autores esses resultados indicam que comportamentos de preferência de oviposição específicos nos biótipos podem contribuir, mas não explicar completamente, as distribuições dos biótipos nos habitats da Flórida, onde foi realizado o estudo.

Para os pesquisadores desta espécie, o posicionamento de *S. frugiperda* ainda era altamente controverso, devido às discrepâncias entre os resultados publicados sobre o sucesso de acasalamento entre biótipos e também devido à presença de híbridos na natureza. Na tentativa de esclarecer o *status* de *S. frugiperda*, Dumas et al. (2015) analisaram características que possivelmente refletiam os níveis de isolamento pós-zigótico, tais como a letalidade híbrida e esterilidade de primeira geração (F1), padrões de segregação meiótica de híbridos em segunda geração recíproca (F2), em comparação com a meiose das duas linhagens parentais. Seus resultados apresentaram uma redução significativa do sucesso de acasalamento em F1 em uma das direções do cruzamento e um alto nível de marcadores microssatélite mostraram a distorção da razão de transmissão na progênie F2. Suportando assim, a existência de isolamento reprodutivo pós-zigótico entre os biótipos, fornecendo evidências adicionais a favor do *status* de espécie irmã para os biótipos.

Estudos com os híbridos de *S. frugiperda* observaram que as fêmeas híbridas com uma mãe do biótipo arroz (R de *rice*) e um pai do biótipo milho (C de *corn*) (resultando em fêmeas híbridas RC) acasalaram raramente, contudo, no cruzamento contrário (CR), não houve esse problema (PASHLEY; MARTIN, 1987; WHITFORD et al., 1988).

Kost et al. (2016) levantaram a hipótese de que a base genética da possível esterilidade dos híbridos RC poderia estar localizada no cromossomo Z (em Lepidoptera, fêmeas são ZW e machos ZZ). Contudo, os autores observaram que as fêmeas híbridas RC não foram totalmente estéreis, seus ovos não foram fertilizados porque as fêmeas dificilmente tentaram acasalar, o que provavelmente é resultado de uma incompatibilidade genética encontrada pelos autores, envolvendo um *locus* de esterilidade ligado a cromossomos Z, explicando assim a abstinência sexual observada.

Segundo Hänniger et al. (2017), a divergência alocrônica, devido à atividade reprodutiva noturna, parece ser a principal barreira que separa os biótipos de *S. frugiperda*. Seus resultados suportam essa ideia e indicam que a preferência de parceiro realizada pela fêmea, pode ser o principal contribuinte para o isolamento reprodutivo entre os biótipos da lagarta-do-cartucho. E esse comportamento de isolamento, pode estar sob o controle do relógio circadiano da espécie (HÄNNIGER et al., 2015).

1.4 Feromônios

Para as mariposas, insetos geralmente noturnos, os feromônios tem grande importância durante o acasalamento, pois a comunicação feromonal que é altamente específica e cobre uma longa distância, garante que machos e fêmeas possam se encontrar para acasalar. Visando esta ideia, Groot et al. (2008) estudaram a composição dos feromônios de *S. frugiperda* e encontram diferenças na composição dos feromônios sexuais femininos entre os biótipos, o que reforçou a ideia da ocorrência de um isolamento reprodutivo. Lima e McNeil (2009) obtiveram resultado similar e também concluíram que a síntese dos feromônios é controlada, pelo menos em parte, por herança materna, ou seja, através do cromossomo W.

Em condições de campo, Unbehend et al. (2013), constataram em uma plantação de milho, que tanto machos do biótipo milho quanto do arroz eram mais atraídos pelo feromônio feminino sintético do biótipo milho do que do biótipo arroz, enquanto essas misturas eram igualmente atraentes em um campo de gramíneas. Os

autores citam então que as diferenças na comunicação sexual entre os biótipos não são suficientes para gerar acasalamento seletivo.

1.5 Adaptação dos biótipos aos hospedeiros

No primeiro estudo realizado sobre o impacto do hospedeiro em relação ao desenvolvimento das lagartas, Pashley (1988b) cita que o biótipo arroz parece estar fisiologicamente adaptado ao hospedeiro, pois quando ambos os biótipos foram alimentados com milho, indivíduos do biótipo milho se desenvolveram melhor que os indivíduos do biótipo arroz. O autor afirma que os biótipos provavelmente não são cruzados em grande escala ou as diferenças entre eles iriam desaparecer rapidamente, afirmando que esses biótipos, provavelmente, são espécies irmãs e não raças hospedeiras.

McMichael e Prowell (1999) testaram o AFLP (*Amplified fragment-length polymorphic*) para distinção dos biótipos e observaram uma discordância entre o biótipo e o habitat de coleta, onde mais indivíduos com o *fingerprint* de AFLP para o biótipo arroz foram encontrados mais no milho do que o inverso. Os autores então sugerem que o biótipo arroz usa mais facilmente o milho como hospedeiro do que o biótipo do milho usa o arroz e gramíneas forrageiras.

Vários outros estudos (WHITFORD et al., 1988; BUSATO et al., 2002, 2005; GIOLO et al., 2002; MEAGHER et al., 2004; GROOT et al., 2010; ROY et al., 2016; SILVA-BRANDÃO et al., 2017), tentaram quantificar o impacto da dieta sobre os biótipos a fim de detectar barreiras reprodutivas pós-zigóticas. Os resultados desses estudos são às vezes contrastantes em relação ao biótipo arroz, mas parecem concordar sobre um melhor desempenho do biótipo milho quando alimentado com milho, não apresentando um desenvolvimento tão bom quando alimentado com outras plantas.

Estes resultados podem ser explicados através da fisiologia e histórico da espécie. Teoricamente, o hospedeiro original de *S. frugiperda* seria o milho; desta maneira, as plantas de milho provavelmente fornecem uma melhor fonte nutricional para este inseto. Entretanto, indivíduos do biótipo arroz também são encontrados no

milho e, portanto, uma associação absoluta entre o biótipo e as plantas não foi encontrada (CAÑAS-HOYOS; MÁRQUEZ; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2014).

De acordo com Nagoshi et al. (2007), os biótipos de *S. frugiperda* encontrados no Brasil exibem preferências de plantas hospedeiras semelhantes às populações encontradas nos EUA. Neste estudo, realizado no estado do Rio Grande do Sul, os biótipos milho e arroz apresentaram uma preferência específica, com o biótipo milho, predominando no milho e ausente no arroz.

O biótipo milho também predominou no milho no estado do Mato Grosso (aparecendo no algodão cultivado na primavera), e o biótipo arroz foi encontrado em milheto e em duas plantas de pastagem comuns, uma do gênero *Amaranthus* e outra da família Poaceae (NAGOSHI et al., 2007).

Um padrão diferenciado foi observado no sorgo, onde as populações dos EUA são do biótipo milho, conforme estudo realizado no Estado do Mississippi (LU; ADANG, 1996). No entanto, as larvas coletadas em sorgo no Brasil e na Florida apresentaram variação substancial nas proporções dos biótipos encontrados, com valores variando de 13 a 92%. Os autores sugerem que a preferência dos biótipos pelas plantas hospedeiras é significativamente influenciada por fatores ambientais (NAGOSHI et al., 2007).

Na tentativa de determinar se a adaptação à dieta das plantas hospedeiras foi a base para a diferenciação de *S. frugiperda* em dois biótipos, Orsucci et al. (2018) estudaram a plasticidade genômica dos biótipos quando confrontadas com diferentes dietas vegetais, através da expressão gênica. Foi observado como ambas as linhagens se adaptam à alimentação de plantas durante o estágio larval. Os autores verificaram que os biótipos não utilizam o mesmo conjunto de genes quando se alimentam das mesmas plantas. Também identificaram variações transcricionais no genoma mitocondrial. Sendo assim, os autores destacam a importância dessas diferenças mitocondriais, pois estas podem estar envolvidas no isolamento reprodutivo, principalmente na incompatibilidade híbrida.

1.6 Sazonalidade

Em um estudo realizado por Pashley, Hammond e Hardy (1992) baseado no número de machos atraídos por armadilhas de feromônio, poucas mariposas estavam presentes no inverno e na primavera (janeiro-maio), a atração de machos aumentou gradualmente no verão, de junho a julho, atingindo o pico em agosto e permaneceu alta no outono (setembro a dezembro).

Os biótipos parecem coexistir durante a maior parte do ano, diferindo ligeiramente no período de abundância. Durante os dois anos de amostragem realizados por Pashley, Hammond e Hardy (1992), o biótipo arroz foi mais abundante em agosto (verão) e o biótipo milho em novembro (outono) no primeiro ano e em agosto (verão) do ano seguinte. Segundo os autores isto ocorre devido a diferenças sazonais na disponibilidade de plantas hospedeiras.

Meagher e Nagoshi (2004) e Nagoshi et al. (2007) sugerem um forte componente sazonal para o uso do hospedeiro. Em amostras provenientes do sul e centro da Flórida nos Estados Unidos e do Mato Grosso no Brasil, respectivamente, o biótipo milho foi coletado principalmente na primavera enquanto o biótipo arroz no outono.

1.7 Morfologia dos biótipos

Durante muito tempo os biótipos de *S. frugiperda* foram descritos como morfológicamente idênticos (PASHLEY, 1986; PASHLEY; HAMMOND; HARDY, 1992; LEVY; GARCIA-MARUNIAK; MARUNIAK, 2002). Porém, Cañas-Hoyos, Márquez e Saldamando-Benjumea (2014) realizaram uma análise de morfometria da asa dos dois biótipos, e encontraram diferenças através de uma regressão multivariada, chamada de efeito alométrico, uma análise de covariância (MANCOVA - *Multivariate analysis of covariance*) e também uma análise discriminatória baseada nas distâncias de Mahalanobis. A partir destas análises os autores chegaram à conclusão de que os machos do biótipo milho são maiores que os machos do biótipo arroz, entretanto este estudo foi realizado a partir de insetos criados em laboratório.

Estes resultados podem ser devido à resposta biológica de cada biótipo frente à fonte nutricional disponibilizada na fase larval, porém isso não indica que o mesmo ocorra na natureza. Sendo assim, são necessárias mais análises sobre a morfometria da asa dos biótipos de *S. frugiperda*, principalmente de indivíduos coletados diretamente do campo.

CAPÍTULO II

**BIÓTIPOS DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (LEPIDOPTERA:
NOCTUIDAE) EM DIFERENTES CULTURAS**

RESUMO

Os biótipos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) foram detectados primeiramente nos Estados Unidos; já no Brasil, no Estado do Rio Grande do Sul estudos confirmaram a presença de ambos os biótipos. O objetivo deste estudo é a identificação desses biótipos nas regiões do Norte Pioneiro e Campos Gerais, no Paraná e sudeste de São Paulo. Lagartas de *S. frugiperda* foram coletadas nos municípios de Ponta Grossa, Tibagi, Arapoti e Wenceslau Braz no Estado do Paraná, e no município de Itaberá, em São Paulo. A genotipagem dos insetos foi realizada através de PCR-RFLP do gene COI segundo o protocolo de Nagoshi e Meagher (2003). Foram genotipados 66 indivíduos de *S. frugiperda*. A maioria, 51 indivíduos, apresentaram o padrão eletroforético do biótipo milho, cinco o padrão eletroforético do biótipo arroz e 10 apresentaram os dois padrões eletroforéticos (Arroz em Mspl e Milho em SacI) sendo categorizados como híbridos. Conclui-se assim, que ambos os biótipos de *S. frugiperda* habitam as regiões estudadas.

Palavras-chave: Mspl. SacI. Híbridos. COI. RFLP.

ABSTRACT

The biotypes of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) were first detected in the United States, while in Brazil, in the State of Rio Grande do Sul, studies confirmed the presence of both biotypes. The objective of this study is the identification of these biotypes in the Northern Pioneiro and Campos Gerais, Paraná and Southeast regions of São Paulo. Caterpillars of *S. frugiperda* were collected in the counties of Ponta Grossa, Tibagi, Arapoti and Wenceslau Braz in the State of Paraná, and in the counties of Itaberá, in São Paulo. Insect genotyping was performed through PCR-RFLP of the COI gene according to the protocol of Nagoshi and Meagher (2003). Sixty-six individuals from *S. frugiperda* were genotyped. The majority, 51 individuals presented the electrophoretic pattern of the corn biotype, five the electrophoretic pattern of the rice biotype and 10 presented the two electrophoretic patterns (Rice in MspI and Maize in SacI) being categorized as hybrids. It is concluded that both *S. frugiperda* biotypes inhabit the studied regions.

Keywords: MspI. SacI. Hybrids. COI. RFLP.

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Biótipos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) no Brasil

Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) é amplamente distribuída no hemisfério ocidental, ocorrendo do centro-sul do Canadá ao sul da Argentina (POGUE, 2002). Este inseto não tem diapausa de inverno, migrando para regiões mais quentes neste período (SPARKS, 1979). Recentemente essa mariposa tornou-se a mais nova espécie invasora na África Ocidental e Central, onde foram registradas pela primeira vez no início de 2016 (GOERGEN et al., 2016; JEGER et al., 2017).

Os biótipos de *S. frugiperda* foram detectados primeiramente nos Estados Unidos (EUA) (PASHLEY, 1986), desde então, foram detectados também no México (ROSAS-GARCÍA et al., 2016), na Colômbia (CANO-CALLE; ARANGO-ISAZA; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2015), Argentina (MURÚA et al., 2015), Paraguai (JUÁREZ et al., 2012) e inclusive na África (COCK et al., 2017).

No Brasil, e em especial no Rio Grande do Sul estudos confirmaram a presença de ambos os biótipos de *S. frugiperda*, tendo sido detectadas diferenças fenotípicas e genotípicas entre esses biótipos (BUSATO et al., 2002, 2004, 2005; MACHADO et al., 2008). Populações de ambos os biótipos de *S. frugiperda* ocorrem também no Mato Grosso (Campo Verde e Primavera do Leste) e no Paraná (Palotina) (NAGOSHI et al., 2007).

2.1.2 Metodologias para identificação dos biótipos

A utilização de marcadores moleculares tem permitido a identificação de populações, raças e/ou espécies crípticas associadas às plantas hospedeiras (DRÈS; MALLET, 2002) e tem se mostrado eficiente na diferenciação dos biótipos milho e arroz de *S. frugiperda*.

Geneticamente os biótipos já foram diferenciados por: Aloenzimas (PASHLEY, 1986); AFLP (MCMICHAEL; PROWELL, 1999; MEAGHER; NAGOSHI, 2004; JUÁREZ et al., 2014); sequenciamento (LEWTER et al., 2006; NAGOSHI et al., 2007;

NAGOSHI et al., 2012); RFLP (LU et al., 1996; NAGOSHI et al., 2006; JUÁREZ et al., 2014) e sequências FR (LU et al., 1994; MACHADO et al., 2008; SALDAMANDO; VÉLEZ-ARANGO, 2010).

As estirpes de arroz e milho podem ser distinguidas através de Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP) do DNA mitocondrial (mtDNA). Lu e Adang (1996) revelaram que a digestão com a enzima de restrição MspI gera padrões de mtDNA específicos para cada biótipo. Essa observação levou ao desenvolvimento de um método baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR), no qual Levy et al. (2002) usando alguns nanogramas de DNA, conseguiram amplificar uma porção do gene da subunidade mitocondrial citocromo oxidase I (COI) que contém um sítio polimórfico da MspI.

Mais tarde outra enzima de restrição também foi designada para diferenciação dos biótipos, a SacI (NAGOSHI et al., 2006). Este procedimento faz com que estudos de campo sejam práticos, pois são necessários apenas alguns nanogramas de DNA (NAGOSHI; MEAGHER, 2003a).

2.1.3 Controle de *S. frugiperda*

O controle de *S. frugiperda* na cultura do milho tem sido realizado basicamente através de inseticidas químicos (SANTIAGO et al., 2008). Porém, a regulagem inadequada de equipamentos e a escolha incorreta de inseticidas têm gerado o aumento do número de aplicações e problemas no controle da lagarta-do-cartucho do milho (BUSATO et al., 2006), além da elevação do custo de produção, aumento da contaminação ambiental e também o aumento nos problemas à saúde do agricultor (PICANÇO; GONRING; OLIVEIRA, 2010).

Um dos motivos para as dificuldades no controle dessa lagarta foi o aumento da disponibilidade de seu hospedeiro, com a introdução do milho "safrinha" e o plantio de milho na época de inverno. A intensificação do plantio de milho se deu por vários fatores, dentre eles a infraestrutura de irrigação e, conseqüentemente, acarretou no aumento da frequência e intensidade do uso de inseticidas (DIEZ-RODRIGUES; OMOTO, 2001). No entanto, concomitantemente, aumentou-se a resistência aos inseticidas através da seleção de indivíduos tolerantes.

Os biótipos de *S. frugiperda* apresentam diferenças em sua suscetibilidade a agentes químicos. O biótipo milho foi menos suscetível aos inseticidas lambda-cihalotrina, lufenuron, methoxifenoazide (BUSATO et al., 2006) e cianeto (HAY-ROE; MEAGHER; NAGOSHI, 2011). Outra diferença encontrada foi que o biótipo arroz desenvolve tolerância mais rapidamente à lambda-cihalotrina (RÍOS-DÍEZ; SIEGFRIED; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2011).

Plantas modificadas geneticamente, conhecidas como *Bt*, expressam uma proteína da bactéria *Bacillus thuringiensis*, denominada proteína *Cry* que funciona como inseticida. Essas plantas têm sido utilizadas na agricultura desde 1996 e hoje são uma das ferramentas mais importantes no controle de pragas agrícolas, reduzindo o uso de inseticidas químicos (TABASHNIK; BRÉVAULT; CARRIÈRE, 2013). Baseado nesta tecnologia, plantas geneticamente modificadas são utilizadas atualmente, para o controle da lagarta-do-cartucho a partir do milho *Cry1Ab* e *Cry1F* (USEPA, 2001) e do algodão *Cry1Ac* (USEPA, 2005).

Estudos indicam a diferença na susceptibilidade às plantas *Bt* nos biótipos de *S. frugiperda*. Após quatro gerações criadas em laboratório, o biótipo arroz foi mais suscetível que o biótipo milho às endotoxinas *Cry1Ac* e *Cry1Ab* (RÍOS-DÍEZ; SIEGFRIED; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2012). Além disso, em ambos os biótipos, a suscetibilidade ao *Cry1Ab* foi mais forte do que para o *Cry1Ac* (RÍOS-DÍEZ; SIEGFRIED; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2012).

Outros estudos apontam também a diferença na susceptibilidade a *Cry1F*, onde o biótipo milho e populações híbridas são mais tolerantes às toxinas *Bt* (INGBER; MASON; FLEXNER, 2017). Entretanto, essas proteínas não são mais utilizadas na região de estudo (informação verbal). Atualmente, a mais utilizada é a *VIP3*, porém, nenhum estudo da resistência a essa proteína foi realizado com os biótipos de *S. frugiperda* até o presente momento.

Tendo em vista a diferenciação dos biótipos às metodologias de controle desta espécie, o objetivo deste estudo é a identificação da existência desses biótipos em diferentes culturas nas regiões do Norte Pioneiro e Campos Gerais, no Estado do Paraná e sudeste de São Paulo.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Entomologia e Fitopatologia (LabEF) na Fundação ABC - Pesquisa e Desenvolvimento Agropecuário, no município de Castro, Paraná.

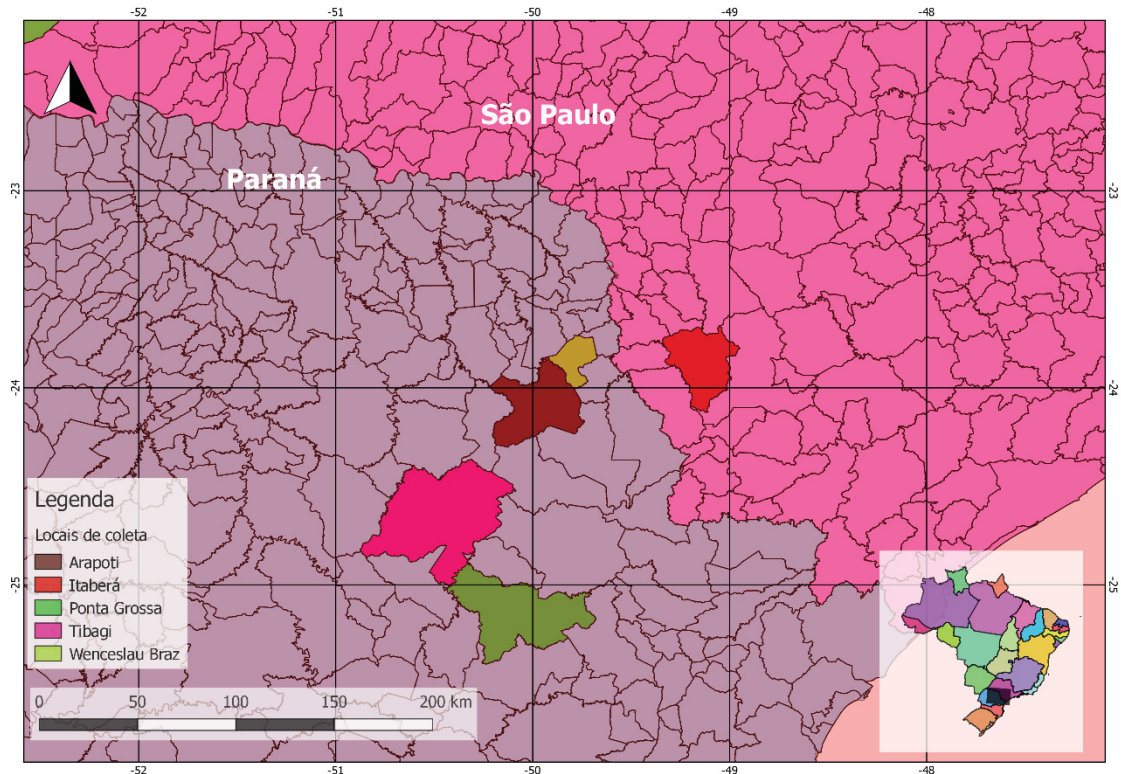
2.2.1 Coleta das lagartas e obtenção das mariposas

Foram adquiridas populações controle para o biótipo milho da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) e biótipo arroz do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - Serviço de pesquisa agrícola (USDA-ARS). Lagartas de *S. frugiperda* foram coletadas no Estado do Paraná, nos municípios de Ponta Grossa, Tibagi, Arapoti e Wenceslau Braz, e no município de Itaberá, em São Paulo (Figura 1).

As coletas foram realizadas através da abertura do cartucho do milho, no meio da palhada da plantação (aveia e milheto), ou ainda através de oviposições encontradas no local de coleta (trigo). Estas oviposições foram incorporadas ao estudo, devido ao fato de que em insetos, incluindo Lepidoptera, os ovos podem ser de pais diferentes, pois as fêmeas podem estocar o esperma que recebem de um ou mais machos em suas espermatecas, liberando os espermatozoides posteriormente, podendo assim, resultarem em ovos fertilizados por pais diferentes em uma mesma oviposição (GULLAN; CRANSTON, 2014).

Após a coleta, as lagartas foram mantidas em laboratório, em uma sala climatizada com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14 horas. As mesmas foram alimentadas seguindo a dieta artificial proposta por Hoffmann-Campo, De Oliveira e Moscardi (1985), até chegarem à fase adulta, em seguida foram mantidas no freezer (-20°C) para posterior extração de DNA.

Figura 1: Locais de coleta das lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) no município do Paraná e São Paulo.



2.2.2 Extração de DNA

Antes da extração de DNA foi realizada a sexagem das mariposas. A extração do DNA genômico foi realizada a partir dos apêndices locomotores e cabeça dos adultos, o restante foi mantido congelado para análises futuras, caso necessário. O protocolo de extração de DNA utilizado foi o de CTAB com adaptações (Apêndice 2). A maceração do tecido foi realizada com o auxílio de nitrogênio líquido e o tecido foi mantido no freezer até o momento da extração.

2.2.3 PCR-RFLP

A genotipagem dos insetos foi realizada através de PCR-RFLP do gene COI no DNA mitocondrial (CANO-CALLE et al., 2015). A amplificação foi realizada em uma reação de 25 μ L contendo 2,5 μ L de Buffer 10X, 0,75 μ L de $MgCl_2$ 50 mM, 0,5 μ L de dNTP's 10 mM, 1,0 μ L do *primer forward* JM76 (5' GAGCTGAATTAGG(G/A)ACTCCAGG 3') 1,0 μ L do *primer reverso* JM77 (5'

ATCACCTCC(A/T)CCTGCAGGATC 3'), 0,5 µL (5 U/µL) de Taq DNA polimerase, 13,75 µL de água ultrapura esterilizada e 5,0 µL de DNA (10 ng/µL).

Para a reação de PCR, o primeiro ciclo começou com uma temperatura de 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos a 94°C por 1 min, 62°C por 1 min e 72°C por 1 min e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 min. Após a reação de PCR, foi realizada uma digestão com a enzima de restrição MspI e SacI. Foram adicionados em tubos de 0,2 µL, 300 ng do produto da PCR, 2 µL de Tampão 10x (Invitrogen) e 30 µL de água ultrapura esterilizada. Adicionou-se 10 unidades da enzima MspI (equivalente a 0,5 µL) e 10 unidades da enzima SacI (equivalente a 0,5 µL), em tubos independentes contendo a solução citada acima, os tubos foram então incubados a 37°C durante 2 h. As amostras foram visualizadas em gel de agarose a 2% antes do tratamento com enzima de restrição e também após o tratamento para visualizar o corte no fragmento.

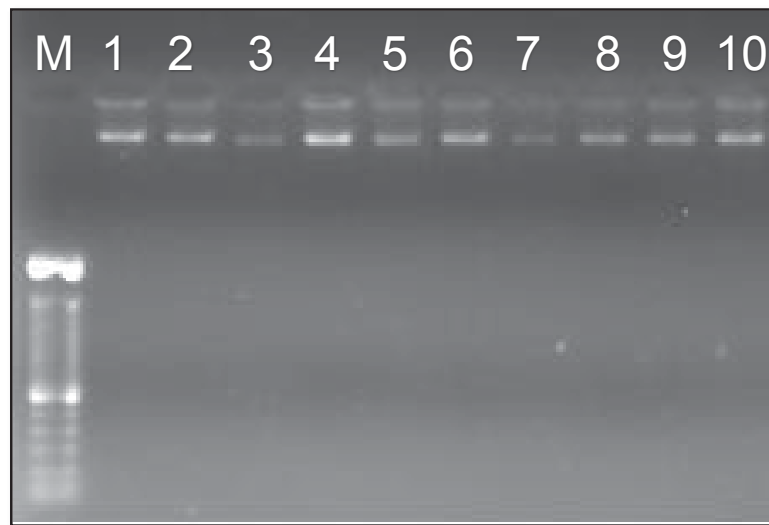
Para a reação com a enzima de restrição MspI, o padrão de bandas do biótipo arroz produz uma banda de aproximadamente 569 pb, enquanto no biótipo milho o fragmento é cortado pela enzima, produzindo dois fragmentos de 497 e 72 pb aproximadamente (NAGOSHI; MEAGHER 2003a). Na reação com a enzima de restrição SacI, o padrão de bandas do biótipo arroz é fragmentado gerando um fragmento de aproximadamente 500 pb e outro fragmento de 69 pb, enquanto que o biótipo milho apresenta apenas um fragmento de 569 pb aproximadamente (NAGOSHI et al., 2006).

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Extração do DNA genômico

Os resultados da quantificação do DNA genômico extraído em espectrofotômetro demonstraram que as amostras apresentaram qualidade e quantidade suficientes para os trabalhos de RFLP. Estes resultados podem ser confirmados pela visualização da integridade do DNA no gel de agarose (Figura 2).

Figura 2 - Amostras de DNA genômico em gel de agarose 1%. M - Marcador molecular (100pb). 1- 10: Indivíduos da população controle biótipo milho.



2.3.2 Identificação molecular dos biótipos de *S. frugiperda* através de PRC-RFLP

Foram genotipados 66 indivíduos de *S. frugiperda* (Tabela 1) coletados nas regiões de estudo e 27 indivíduos das populações de controle positivo e negativo dos biótipos. Os padrões eletroforéticos encontrados para cada biótipo foram semelhantes aos indicados por Nagoshi e Meagher (2003a, b) e Nagoshi et al. (2006). A maioria, 51 indivíduos, apresentaram o padrão eletroforético do biótipo milho, cinco o padrão eletroforético do biótipo arroz e 10 apresentaram os dois padrões eletroforéticos (Arroz em MspI e Milho em SacI) (Figura 3).

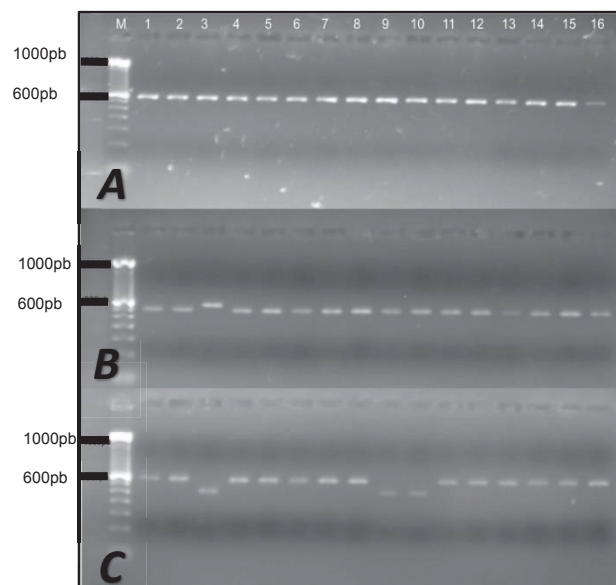
A presença de híbridos é citada em estudos (NAGOSHI; MEAGHER 2003a, b; VÉLEZ-ARANGO et al., 2008; SALINAS-HERNANDEZ, H.; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2011) comparando resultados de RFLP da enzima MspI com PCR da sequência FR, tais como, os resultados encontrados por Saldamando e Vélez-Arango (2010), onde dois tipos de híbridos foram descritos, indivíduos que apresentaram digestão com a enzima MspI e ampliações com primers FR (denominados híbridos + / +) e indivíduos que não apresentaram digestão com a enzima MspI ou produtos de amplificação com os primers FR (denominados híbridos - / -).

Cano-Calle et al. (2015) afirmam que híbridos também foram reconhecidos com a enzima de restrição SacI, entretanto, eles usaram essa enzima, somente quando o fragmento de FR foi difícil de amplificar na amostra.

Tabela 1 - Resultado da PCR-RFLP do gene mitocondrial COI. Número de indivíduos genotipados de *Spodoptera frugiperda* por localidade e cultura coletada.

Identificação	Nº de indivíduos analisados	Biótipo segundo RFLP
Milho-Itaberá-SP	8	7 milho e 1 arroz
Milho – Tibagi -PR	8	7 milho e 1 arroz
Aveia preta – Wenceslau Braz - PR	8	8 milho
Trigo – Tibagi -PR	8	7 milho e 1 arroz
Trigo – Tibagi -PR	9	9 híbridos
Milheto – Tibagi -PR	5	4 milho e 1 híbrido
Aveia preta – Tibagi -PR	8	8 milho
Milho – Ponta Grossa- PR	6	4 milho e 2 arroz
Milho – Arapoti - PR	6	5 milho e 1 híbrido

Figura 3 - A – Produto da PCR-RFLP sem tratamento com enzimas de restrição. B - Tratamento com a enzima de restrição MspI. C - Tratamento com a enzima de restrição SacI. Indivíduo 3 representando o biótipo arroz, indivíduos 9 e 10 representando os híbridos e o restante são representantes do biótipo milho. M- Marcador molecular (100pb). Gel de agarose 2%.



Os híbridos podem ser o produto de cruzamentos entre os biótipos, sugerindo a ocorrência de fluxo gênico entre os biótipos na região estudada. Nagoshi e Meagher (2003a) sugerem que os híbridos são o produto de cruzamentos unidirecionais entre fêmeas do biótipo arroz e machos do biótipo milho, pois em seus estudos em laboratório não houve cruzamento com a fêmea milho e o macho arroz.

Em contrapartida, Prowell et al. (2004) encontraram evidências de cruzamentos bidirecionais na natureza, com 54% de híbridos, descendentes de fêmeas do biótipo arroz acasalada com macho do biótipo milho e 46% de cruzamento recíproco.

Indivíduos do biótipo arroz são comumente encontrados em habitats do biótipo milho (PROWELL et al., 2004). Ou seja, o biótipo arroz usa mais frequentemente o habitat milho do que o contrário, e concomitantemente, os híbridos são encontrados em sua maioria no milho. Prowell et al. (2004) citam 62% dos híbridos de seu estudo, coletados no milho. Saldamando e Vélez-Arango (2010) também obtiveram a maior porcentagem (41%) de híbridos coletados em milho. No presente estudo, a maioria dos híbridos foi identificada na oviposição encontrada na cultura de trigo. Por ser apenas uma oviposição, não podemos afirmar que a maioria dos híbridos foram encontradas no trigo, ou seja, a cultura de trigo não foi amostrada como os campos de milho.

Nossas análises não abrangeram os habitats do biótipo arroz citados em literatura, entretanto, foi possível visualizar a presença de indivíduos do biótipo arroz coletados no habitat do biótipo milho. Prowell et al. (2004) citam que apenas 2% dos indivíduos coletados em habitat do biótipo arroz eram do biótipo milho, entretanto, 18% dos insetos coletados no milho eram do biótipo arroz. Contudo, nas duas populações coletadas na aveia preta, predominou o biótipo milho.

2.4. CONCLUSÃO

Podemos concluir que existem ambos os biótipos de *S. frugiperda* nas regiões estudadas. A única coleta em que não houve a presença do biótipo arroz nem de híbridos foram as coletas na aveia preta (Tibagi e Wenceslau Braz), entretanto, somente com essas coletas, não se pode afirmar que não exista a presença do biótipo arroz na aveia; uma amostragem mais ampla deve ser feita nesta cultura.

A presença de híbridos reflete a existência de fluxo gênico entre os biótipos. Apesar da presença do biótipo arroz, a maioria dos indivíduos coletados são do biótipo milho, sendo este predominante na região.

CAPITULO III

ESPECIAÇÃO INCIPIENTE DE *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797)
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)

RESUMO

Spodoptera frugiperda (J.E.Smith, 1797) está passando por um processo de especiação, no qual populações que habitam hospedeiros diferentes enfrentam barreiras reprodutivas impedindo o fluxo gênico entre potenciais espécies. O objetivo deste estudo é realizar a delimitação de espécie em *S. frugiperda* mediante a comparação de sete metodologias de delimitação de espécie: árvores filogenéticas de *locus simples* (COI), *multilocus* (COI + 28S), bPTP, PhyloMap-PTP, ABGD, PhyML e GMYC. As lagartas foram coletadas, nos Estados do Paraná e São Paulo, Brasil. Populações controle foram adquiridas da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) e do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - Serviço de pesquisa agrícola (USDA-ARS). O DNA genômico foi extraído a partir do protocolo de CTAB de 88 *Spodoptera*. Os resultados das análises genéticas confirmam a existência de um nível pronunciado de diferenciação genética de *S. frugiperda* entre os biótipos, sendo suportada por quatro das sete análises testadas (análise de *locus simples*, bPTP, PhyML e PhyloMap-PTP). Entretanto, a incongruência entre os resultados indica a necessidade de estudos mais aprofundados e abrangentes para a determinação dos biótipos como espécies distintas.

Palavras-chave: Biótipos. COI. 28S. PhyML. bPTP.

ABSTRACT

Spodoptera frugiperda (J.E.Smith, 1797) is undergoing a speciation process, in which populations inhabiting different hosts face reproductive barriers impeding gene flow among potential species. The objective of this study is to perform the species delimitation in *S. frugiperda*. This study was carried out by comparing seven methodologies of species delimitation: simple locus (COI), multilocus (COI + 28S), bPTP, PhyloMap-PTP, ABGD, PhyML and GMYC. The caterpillars were collected in the States of Paraná and São Paulo, Brazil. Control populations were obtained from Mato Grosso state and the United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service (USDA-ARS). Genomic DNA was extracted by means of CTAB protocol. The results of the genetic analyzes confirm the existence of a pronounced level of genetic differentiation among the biotypes of *S. frugiperda*, being supported by four of the seven analyzes tested (simple locus, bPTP, PhyML and PhyloMap-PTP), however, the incongruity among the results indicates the need for more in-depth and comprehensive studies to determine the biotypes as distinct species.

Keywords: Biotypes. COI. 28S. PhyML. bPTP.

3.1 INTRODUÇÃO

Espécie é a unidade básica da biologia e sua definição está entre os assuntos mais discutidos e controversos da sistemática. Diversos conceitos são descritos na literatura; aqui iremos abordar o conceito evolutivo no qual espécie é uma linhagem única de populações ancestrais-descendentes que mantêm a sua identidade em relação a outras linhagens e que tem suas próprias tendências evolutivas e destino histórico (WILEY, 1981).

Novas espécies surgem a partir de um processo denominado especiação, neste processo uma mesma espécie se diferencia em duas espécies distintas (MAYR, 1970). A especiação ocorre em geral a partir do desenvolvimento de barreiras que evitarão a troca de genes, ou seja, barreiras reprodutivas, que podemos chamar de mecanismos de isolamento; estes mecanismos surgem quando um grupo torna-se isolado do grupo de origem durante um intervalo de tempo no qual a seleção natural atuará, durante milhares de gerações, conduzindo a diferenças que impedirão o intercruzamento e conseqüentemente o fluxo gênico entre os grupos (PANTOJA, 2016).

As barreiras reprodutivas podem ser pré ou pós-zigóticas, quando a falha em duas espécies em trocarem genes ocorre devido aos zigotos formados na reprodução serem inviáveis, chamamos de isolamento pós-zigótico. Quando a falha ocorre durante a troca de genes devido a uma barreira na fertilização dos gametas, chamamos de isolamento pré-zigótico (GRIFFITHS et al., 2008). Kost et al. (2016) citam que, o isolamento pós-zigótico pode se manifestar como esterilidade comportamental quando o comportamento de corte é interrompido.

A especiação pode ser dividida em: especiação alopátrica, que surge a partir da evolução das barreiras reprodutivas em populações que são impedidas por uma barreira geográfica de trocar genes; especiação peripátrica, quando uma população periférica isolada se diverge, dando origem a uma nova espécie; especiação parapátrica, onde populações adjacentes, espacialmente distintas, entre as quais existe algum fluxo gênico, divergem e se tornam reprodutivamente isoladas; especiação simpátrica que é a evolução das barreiras reprodutivas dentro de uma população única, inicialmente aleatoriamente acasalada (FUTUYMA, 2013).

Insetos polípagos apresentam vantagens na natureza, pois se alimentam de diferentes plantas que fornecem diferentes recursos nutricionais. Quando esses insetos evoluem em diferentes plantas hospedeiras, são chamadas de raças hospedeiras e o processo de especiação ocorre de forma simpátrica (BERLOCHER; FEDER, 2002).

O isolamento reprodutivo encontrado entre os biótipos de *S. frugiperda*, já foi descrito, composto pela divisão temporal das atividades noturnas de acasalamento (PASHLEY et al., 1992; SCHÖFL; HECKEL; GROOT, 2009), diminuição da fertilidade de híbridos, causada por fêmeas comportamentalmente estéreis (KOST et al., 2016) e diferenças de feromônios sexuais (GROOT et al., 2008; LIMA; MCNEIL, 2009).

Esse processo de especiação é considerado um estágio intermediário entre polimorfismo, e espécies completas são frequentemente chamadas de "biótipos" ou "raças ecológicas" (DRÈS; MALLETT, 2002). Em populações de insetos, esse mecanismo é mais rápido do que em qualquer outro grupo de animais, devido ao seu curto ciclo de vida. No caso da especiação de *S. frugiperda*, Canas-Hoyos, Márquez e Saldamando-Benjumea (2014) acreditam que as diferenças encontradas na forma e tamanho das asas nos biótipos já é um resultado visível da especialização de acordo com a planta hospedeira deste inseto.

Para realizar a delimitação de espécies, é necessária uma comparação dos resultados de diferentes métodos analíticos. A utilização de somente um método de análise é incapaz de delimitar com precisão linhagens evolutivas, sendo necessária a observação de semelhanças entre os resultados de análises realizadas sob diferentes parâmetros (CARSTENS et al., 2013). Desta maneira, o objetivo deste estudo é comparar os resultados de alguns métodos analíticos de delimitação de espécie nos biótipos de *S. frugiperda*, na tentativa de definir o atual *status* desse inseto.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta das *Spodoptera*

As coletadas foram realizadas, no Estado do Paraná, nos municípios de Ponta Grossa, Tibagi, Arapoti e Wenceslau Braz, e no município de Itaberá, em São Paulo (Tabela 1).

Foram obtidos indivíduos controle para o biótipo milho de *S. frugiperda* procedentes do Mato Grosso (UFMT) e biótipo arroz com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos - Serviço de pesquisa agrícola (USDA-ARS).

Tabela 1 - Localidades de coleta com localização geográfica, identificação laboratorial e cultura coletada.

Identificação Numérica	Local	Localização Geográfica
5498	Ponta Grossa –PR	Lat: -25°00'48"S Long: -50°09'05"W
4670 e 4739		Lat: -24°31'28"S Long: -50°21'59"W
4074	Tibagi – PR	Lat: 24° 28'30.58"S Long: 50° 22'06.90"W
4976		Lat:24°31'15.0"S Long:50°22'41.5"W
4975		Lat: 24° 28'30.58"S Long: 50° 22'06.90"W
4447 6376	Arapoti – PR	Lat: -24°11'32"S Long: -49°52'32"W
4491	Wenceslau Braz - PR	Lat: 23°50'55.91"S Long: 49°48'17.33"W
2293 3847 4215 4216	Itaberá – SP	Lat: 24°04'22"S Long: 49°09'21"W

Após a coleta, as lagartas foram mantidas em laboratório com temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14 horas controladas. A alimentação das lagartas foi feita seguindo a dieta artificial proposta por Hoffmann-

Campo, de Oliveira e Moscardi (1985). Quando chegaram à fase adulta foram mantidas no freezer (-20°C) para posterior extração de DNA.

3.2.2. Extração do DNA genômico

Foram extraídos os DNAs genômicos de 88 indivíduos, dos quais 49 eram *Spodoptera frugiperda*, 21 *S. cosmioides*, 13 *S. eridania*, quatro *S. dolichos* e uma *S. albula*. Para a extração do DNA genômico foram utilizados os apêndices locomotores e cabeça dos adultos, realizada a partir do protocolo de extração CTAB com algumas adaptações (Apêndice 2).

3.2.3. Análise filogenética

Foram utilizadas sete abordagens: árvores filogenéticas de *locus* simples (COI), *multilocus* (COI + 28S), bPTP, PhyloMap-PTP, ABGD, PhyML e GMYC. E também uma rede de haplótipos foi gerada para visualização dos haplótipos presentes no grupo de estudo.

3.2.3.1. Rede de haplótipos

As relações entre os haplótipos de COI foram investigadas através da parcimônia descrita por Templeton et al., (1992) que permite estimar uma rede com mais de 95% de probabilidade. Esta rede foi obtida segundo o método TCS executado através do programa PopART 4.8.4 (CLEMENT et al., 2000).

A rede de haplótipos é uma abordagem cladística que auxilia na identificação de subconjuntos de haplótipos desenhados pelo mapeamento do sequenciamento de DNA. Este cladograma define um desenho estatístico que representa passos evolutivos que inter-relacionam os haplótipos observados (TEMPLETON et al., 1992).

3.2.3.2. Análise de *locus* simples (COI) e *multilocus* (COI + 28S)

A amplificação do COI foi realizada através da seguinte reação de PCR: volume final de 25 µL, contendo 10 µL de DNA (10 ng), 2,5 µL de cada primer a uma

concentração de 10 μM , primer LCO 1490 (forward: 5' GGTCACAA ATCATAAAGATATTGG 3') e HCO 2198 (reverse: 5' GGTCACAAATC ATAAAGATATTGG 3') 0,5 μL *Taq* DNA polimerase 5 U/ μL , 2 μL de Buffer 10X, 0,75 de MgCl_2 50 mM, 2,5 μL de dNTPs 10 mM e 4,25 μL de água ultra pura autoclavada.

O protocolo de amplificação do PCR foi de 1 ciclo inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 15 ciclos por 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 40°C e 1 minuto a 72°C, seguidos de outro ciclo composto de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C e para finalizar um ciclo final de 7 minutos a 72°C.

Para a reação com 28S o volume total das reações de amplificação foi de 25 μL , contendo 3 μL de DNA (10 ng/ μL), 1 μL de cada *primer* a uma concentração de 10 μM , 28S-01 (forward: 5' GACTACCCCTGAATTTAAGC AT 3') e 28SR-01 (reverse: 5' GACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAG 3'), 0,2 μL *Taq* DNA polimerase 1 U/ μL , 2,5 μL de Buffer 10X, 1,2 μL de MgCl_2 50 mM, 1 μL de dNTPs 10 mM, 2 μL de DMSO 5% e 13,1 μL de água ultrapura autoclavada. O protocolo de amplificação do PCR foi de 1 ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos por 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 50°C e 2 minutos a 70°C, e um ciclo final de 7 minutos a 70°C.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, com posterior visualização realizada em um transiluminador. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando-se o kit Illustra TM ExoProStarTM 1-Step (GE Healthcare Life Sciences) e então as amostras foram enviadas para sequenciamento no Laboratório de Genoma Humano da Universidade de São Paulo. Os fragmentos gênicos foram sequenciados nas direções senso e antisenso.

O alinhamento das sequências de nucleotídeos foi gerado utilizando-se a ferramenta MUSCLE (EDGAR, 2004), implementado pelo programa MEGA 7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). Os alinhamentos foram corrigidos manualmente utilizando o programa BioEdit v7.2.5 (HALL, 1999).

A análise filogenética de *locus* simples do gene COI foi realizada pelo método de análise de Inferência Bayesiana (IB). Foram inferidas árvores filogenéticas mostrando o relacionamento entre os indivíduos coletados e sequências obtidas por dois bancos de dados, GenBank e BOLD. O Portal online BOLD possui sequências de ambos os biótipos de *S. frugiperda*, que foram utilizadas durante as análises como controles positivos, juntamente com os indivíduos enviados pela USDA e UNEMAT.

Para gerar a árvore da IB da análise de *locus* simples, o modelo evolutivo foi escolhido através do programa JModelTest 2.1.10 (DARRIBA, 2014) e posteriormente as árvores foram geradas através do portal CIPRES Science Gateway (<https://www.phylo.org/>) com o software BEAST 1.8.0 (DRUMMOND; RAMBAU; SUCHARD, 2013), foram rodadas três séries independentes com 50 milhões de gerações cada. Adicionalmente, o resultado foi analisado no TRACER v1.6 (RAMBAUT, 2014), a coluna ESS (*Estimated Sample Sizes*) indica se os valores dos parâmetros são precisos, devem ser maior que 200.

Posteriormente, as corridas foram combinadas utilizando o LogCombiner v.1.8.0 e resumidas através do Treeannotator v1.8.0 (DRUMMOND; RAMBAU; SUCHARD, 2013), sucessivamente a árvore consenso foi visualizada no FigTree v1.4.3 e editadas no Inkscape.

A árvore de *multilocus* com os genes COI e 28S foi produzida com o auxílio do MrBayes (HUELSENBECK, 2001), um arquivo nexus foi gerado incluído o sequenciamento do gene COI e 28S, para uma análise conjunta. A árvore de máxima verossimilhança foi gerada através de 1 milhão de gerações (*Burnin* de 0,05) e foi analisada no TRACER v1.6. Os modelos evolutivos de substituição nucleotídica para cada *locus* foram estimados através do JModelTest, com correção de AIC.

3.2.3.3. Análise de ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery)

A análise de ABGD foi realizada na plataforma ABGD (<http://www.abi.snv.jussieu.fr/public/abgd/abgdweb.html/>), as sequências de COI foram carregadas no portal e rodada utilizando os parâmetros disponibilizados pelo site.

3.2.3.4. Análise de PhyML

PhyML é um software de filogenia baseado no princípio da máxima verossimilhança; esta análise pode ser feita através do portal online (<http://www.atgc-montpellier.fr>), com um arquivo de formato Newick. As análises foram executas

através da interface de vizinho mais próximo (NNIs) para melhorar a topologia da árvore inicial. O modelo evolutivo foi escolhido por SMS “*Smart Model Selection*” (LEFORT; LONGUEVILLE; GASCUEL, 2017) com critério de avaliação o AIC e 10.000 repetições de *bootstrap*. A árvore foi gerada a partir do algoritmo BIONJ (GASCUEL, 1997).

3.2.3.5. Análise de GMYC (General Mixed Yule-coalescent Model)

A árvore de GMYC foi gerada no BEAST v.1.8.0 com o modelo de substituição calculado no JModelTest 2.1.10, aplicando a correção de AIC. De acordo com o tutorial para a análise disponibilizada no portal do desenvolvedor (<https://francoismichonneau.net/gmyc-tutorial/>), três séries independentes foram realizadas com 50 milhões de gerações cada, uma árvore usando relógio molecular constante e modelo coalescente, e outras duas árvores com o modelo yule, sendo uma com relógio molecular relaxado com distribuição lognormal e outro constante. Os resultados foram analisados no TRACER v1.6.

A série com modelo yule e relógio molecular relaxado com distribuição lognormal não obteve valor superior a 200 de ESS no software TRACER v1.6. Uma nova série foi realizada com 80 milhões de repetições, para então, conseguir atingir um valor aceitável de ESS. Em seguida, as árvores foram resumidas individualmente usando o programa Treeannotator v1.8.0 e então analisamos as três árvores no RStudio a partir do pacote *Splits*.

3.2.3.6. bPTP e PhyloMap-PTP

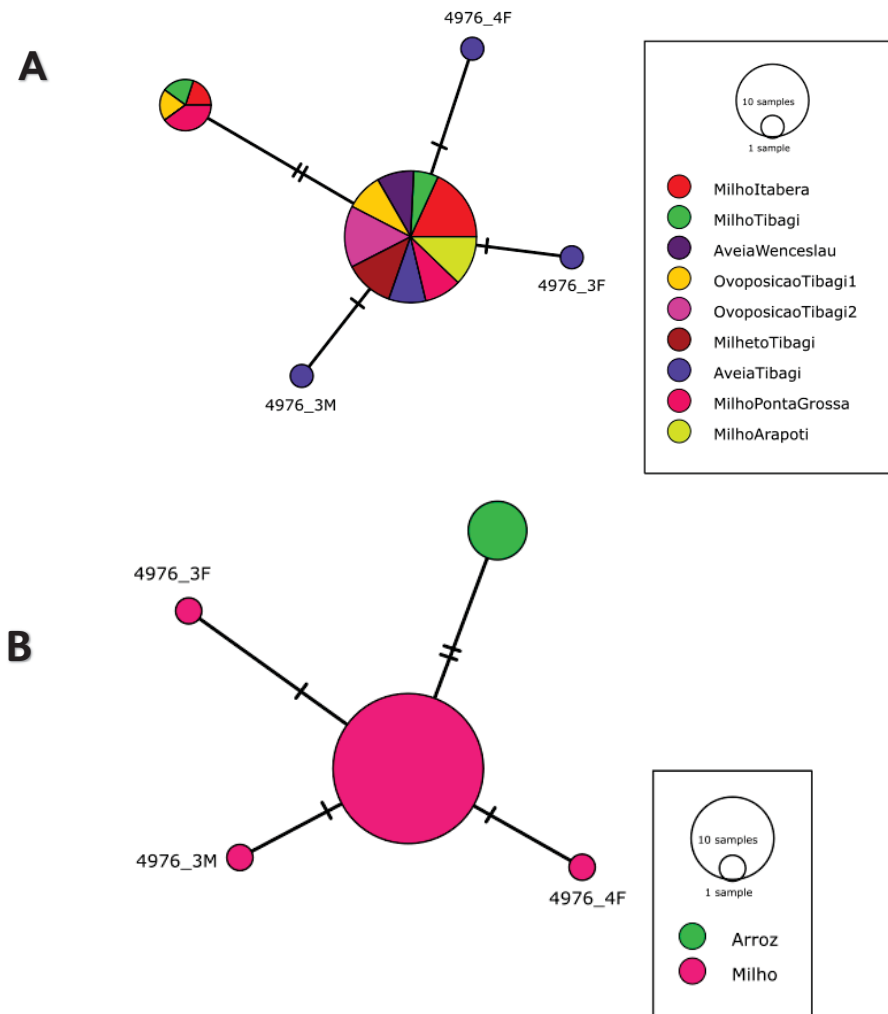
A bPTP é uma implementação bayesiana do modelo do processo da árvore de Poisson (PTP- Poisson Tree Processes) para a delimitação de espécies. Também foi realizada através de um portal online (<http://species.h-its.org/>), a árvore de entrada, em formato newick, foi a mesma resultante das análises através do BEAST para a análise de *locus* simples, esse mesmo teste gera a árvore de PhyloMap-PTP.

3.3 RESULTADOS

3.3.1. Rede de haplótipos

O resultado obtido pelo método TCS apresentou uma pequena rede de haplótipos (Figura 1), onde os dois biótipos ficam separados pela presença de duas mutações. Além dessas mutações, outra mutação apresentada separou os indivíduos 4976_3M, 3 e 4F dos demais indivíduos do biótipo milho.

Figura 1 - Rede de haplótipos obtida por TCS no software Popart 1.7, a partir das 41 sequências de COI. As mutações são os riscos que cortam as ligações entre as esferas. A frequência de cada haplótipo é indicada pelo diâmetro da esfera. Esfera A apresentando os haplótipos por locais de coleta e Espera B indicando os haplótipos por biótipos.



Legenda: Esfera verde (3847_5F, 3847_5F, 4074_1F, 4670_8M, 5498_2M e 5498_5M); Esfera grande rosa (3847_1F, 3847_1F, 3847_4F, 3847_6F, 3847_2M, 3847_4M, 3847_5M, 4074_2M, 4074_5M, 4491_1F, 4491_3F, 4491_1M, 4670_15F, 4670_16F, 4670_17F, 4739_3F, 4739_5F, 4739_16F, 4739_2M, 4739_4M, 4975_1F, 4975_1M, 4975_2M, 4975_3M, 4976_2F, 4976_1M, 4976_4M, 5498_1F, 5498_2F, 5498_4M, 6376_2F, 6376_4F, 6376_3M e 6376_4M).

Uma segunda rede de haplótipos foi gerada para visualização dos biótipos por local e cultura coletada, nele podemos observar que o biótipo arroz se encontra nas culturas de milho em Itaberá-SP, Tibagi e Ponta Grossa-PR e, em uma das oviposições na cultura do trigo em Tibagi-PR.

O software Popart 1.7 também apresentou o número da diversidade nucleotídica (π), para o grupo de amostras analisadas (0,0015), que podemos considerar baixo quando comparada a resultados anteriores para *S. frugiperda* (SALINA-HERNANDEZ, SALDAMANDO-BENJUMEA; 2011) que encontraram diversidade nucleotídica (π) de 0,14976 para populações coletas em Tolima na Colombia.

Uma segunda rede de haplótipos foi gerada para visualização dos biótipos por local e cultura coletada; nele podemos observar que o biótipo arroz se encontra nas culturas de milho em Itaberá-SP, Tibagi e Ponta Grossa-PR e, em uma das oviposições na cultura do trigo em Tibagi-PR.

O software Popart 1.7 também apresentou o número da diversidade nucleotídica (π), para o grupo de amostras analisadas (0,0015), que podemos considerar baixo quando comparada a resultados anteriores para *S. frugiperda* (SALINA-HERNANDEZ, SALDAMANDO-BENJUMEA; 2011) que encontraram diversidade nucleotídica (π) de 0,14976 para populações coletas em Tolima na Colombia.

3.3.2 Análise *locus* simples e *multilocus*

Com base em 64 sequências analisadas, 14 indivíduos de *S. frugiperda* das bases de dados consultadas, um grupo externo e 49 novos indivíduos sequenciados (Tabela 2), o cladograma apresentou dois cladogramas distintos (Figura 2), denominados neste trabalho de clado do biótipo arroz e clado do biótipo milho; esses cladogramas são separados com alto suporte de ramo (PP:1).

Tabela 2 - Identificação dos biótipos de *Spodoptera frugiperda* através do sequenciamento do gene mitocondrial COI.

Identificação	Nº de indivíduos analisados	Biótipo segundo Sequenciamento
3847	6	5 milho e 1 arroz
4074	3	2 milho e 1 arroz
4491	3	3 milho
4670	4	3 milho e 1 arroz
4739	5	5 milho
4975	4	4 milho
4976	6	6 milho
5498	5	3 milho e 2 arroz
6376	4	4 milho

As sequências *Spodoptera frugiperda* sp1 e *Spodoptera frugiperda* sp2 são sequências da plataforma BOLD, caracterizadas como biótipo arroz e milho respectivamente, por essa base de dados. Observa-se que os indivíduos enviados pelo USDA-ARS, como controle positivo do biótipo arroz, agrupam-se com a sequência do BOLD para o biótipo arroz como previsto.

Esta formação de dois clados distintos corrobora os estudos de Kergoat et al. (2012), que em sua árvore composta por 141 táxons, dos quais 11 eram *S. frugiperda*, também encontraram a separação dos biótipos, confirmando a existência de um nível acentuado de diferenciação genética entre os biótipos.

Kergoat et al. (2012) afirmam que essa diferenciação genética juntamente com as barreiras reprodutivas já descritas (PASHLEY, MARTIN; 1987; NAGOSHI, MEAGHER; 2003; GROOT et al., 2010) são indícios que fortemente sustentam a hipótese de espécies distintas.

Dois grupos de *S. frugiperda* foram recuperados na análise de *locus* simples com o gene COI (Figura 2); entretanto na análise *multilocus* não há esta separação (Figura 3) e o suporte dos ramos ficou extremamente baixo. Para verificar a eficiência do gene 28S, foi realizada então, uma análise filogenética do gênero *Spodoptera* com

sequenciamentos obtidos dos portais já citados e sequenciamentos obtidos de lagartas coletadas na região de estudo com este gene.

Figura 2 - Árvore consenso de Inferência Bayesiana de espécies de *Spodoptera frugiperda*. Os números dos nós correspondem aos valores da probabilidade posterior maiores que 0,9. Ramo rosa indicando o clado do biótipo arroz e os ramos azuis o clado do biótipo milho. 64 táxons e 477 caracteres. Modelo TrN + I. Gene mitocondrial utilizando os primers LCO e HCO.

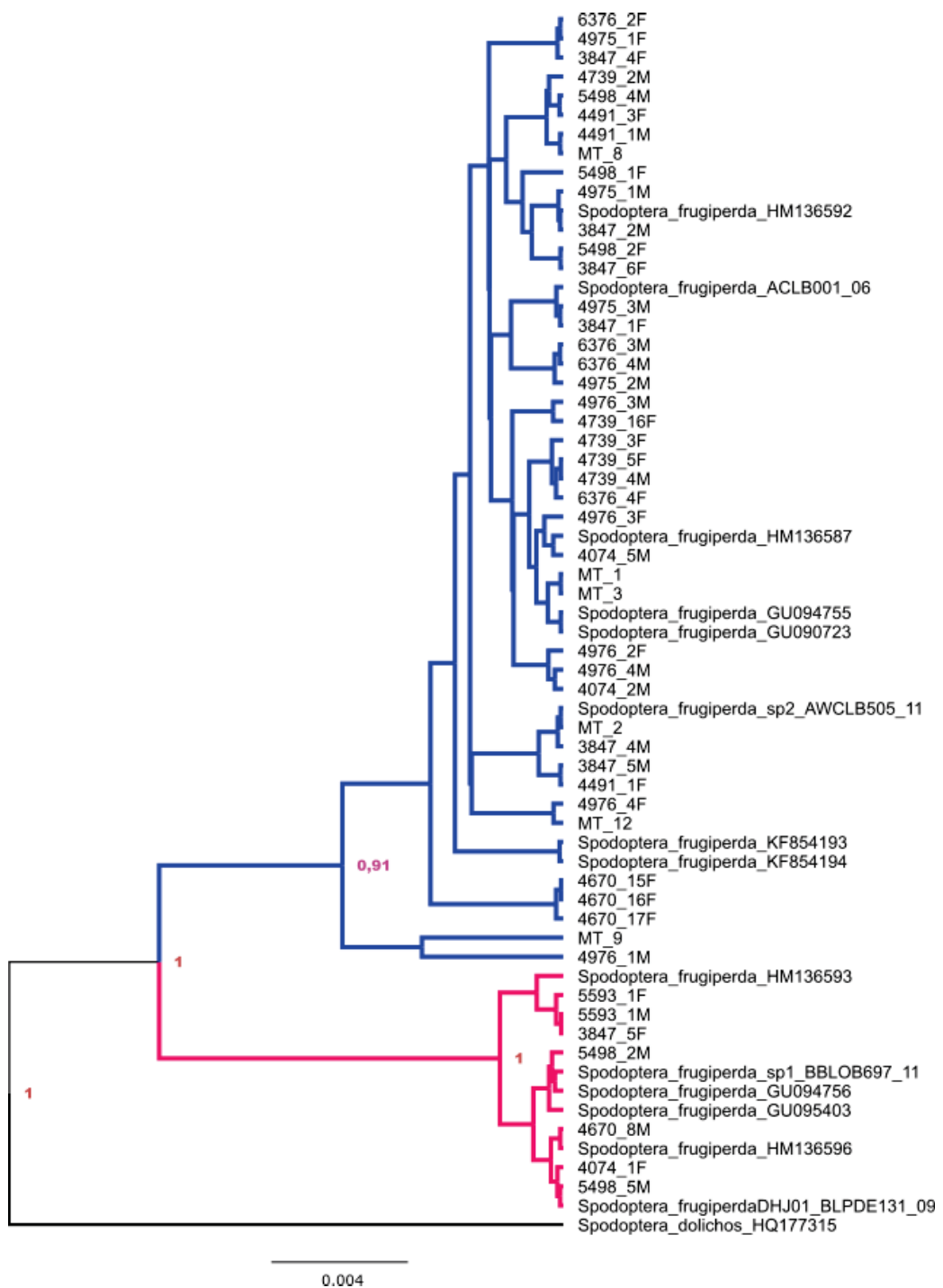
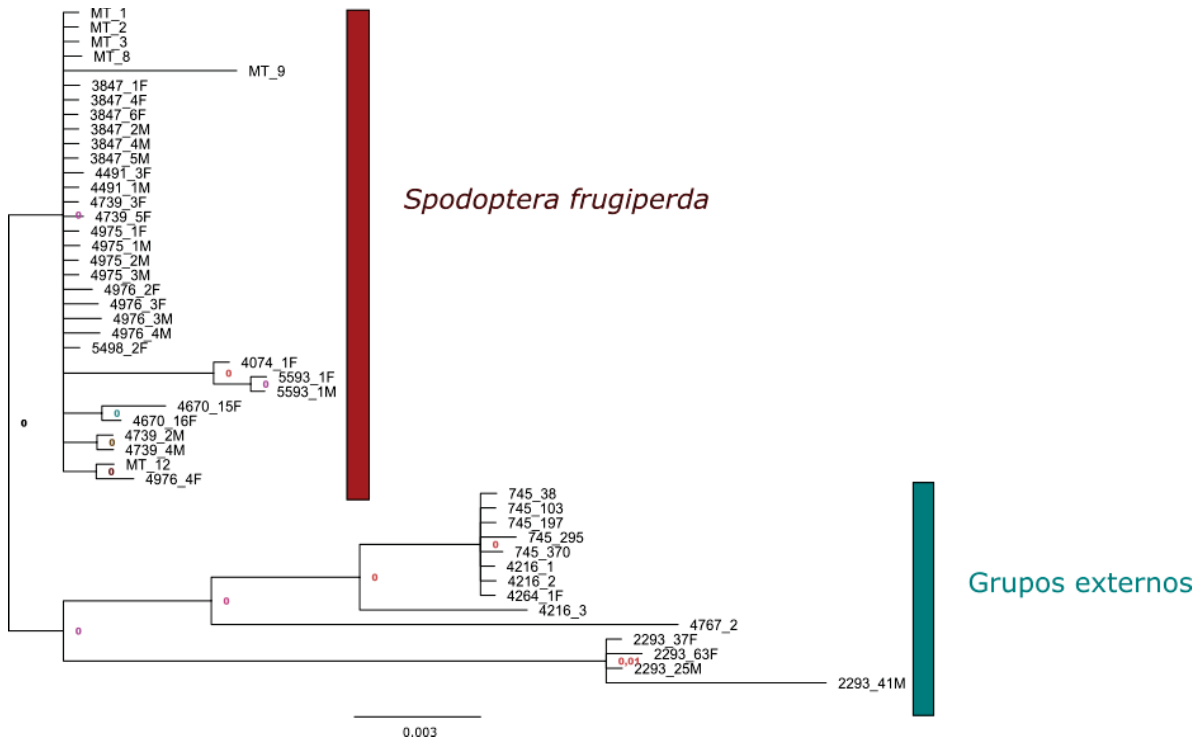


Figura 3 - Árvore consenso de Inferência Bayesiana de matriz concatenada do gene COI e 28S com modelo evolutivo TN+I, 1134 caracteres, 47 táxons dois quais 15 são grupos externos compostos de outras *Spodoptera*. Valores de PP apresentados na árvore.



Quando realizada a análise do gênero com o gene COI (Apêndice 4), a maioria das espécies foram separadas com excelente suporte (≥ 9), enquanto a árvore recuperada pela análise filogenética do 28S (Apêndice 3) não foi capaz de recuperar as divisões dentro do gênero. Concluímos assim, que o gene 28S não é capaz de auxiliar na delimitação de espécies para o gênero *Spodoptera*.

O gene mitocondrial COI foi uma excelente fonte de informação para o conjunto de espécies relacionadas pertencentes ao gênero *Phyciodes* (Lepidoptera – Nymphalidae) (WAHLBERG et al., 2003). Diferentemente dos resultados encontrados aqui, Pérez-Losada et al. (2005), que em sua delimitação de espécies de *Eisenia fétida* (Savigny, 1826) e *Eisenia andrei* Bouché, 1972 (Oligochaeta - Lumbricidae) concluíram que o gene 28S foi eficiente. Monaghan et al. (2005) estudando besouros d'água também obtiveram resultados satisfatórios para gene o 28S na delimitação de espécies.

Um gene nuclear que possivelmente mais eficiente para delimitar espécies de *Spodoptera* poderia ser o ITS2. Stouthamer et al. (1999) utilizaram com êxito este gene para diferenciar espécies de *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae).

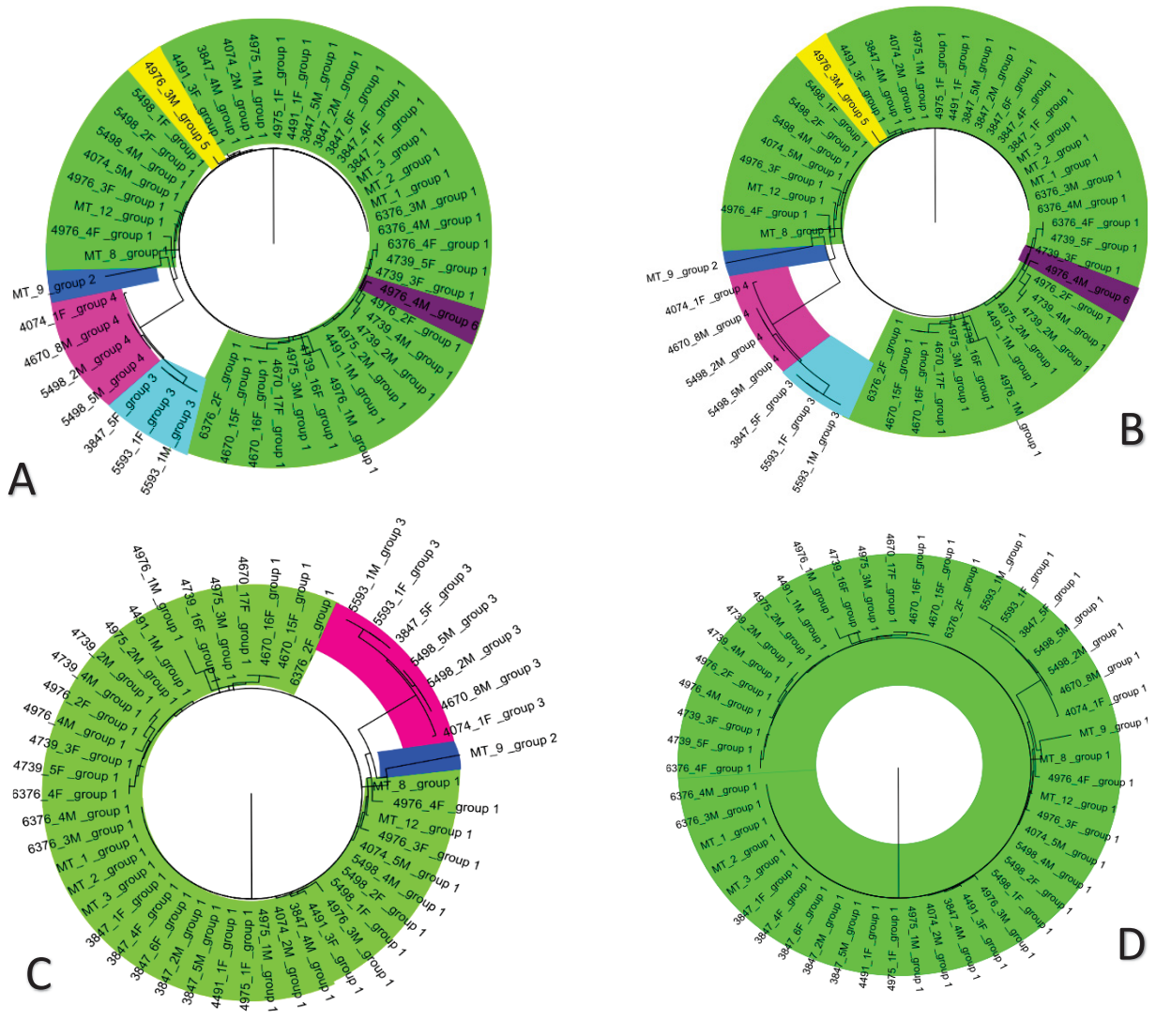
3.3.3. ABGD

Pelo método de ABGD foram obtidas quatro possíveis partições (Figura 4) com valores de P (*Prior Maximal Distances*) compreendidos entre 0,0010 e 0,0046. A primeira e segunda partições separam o biótipo arroz em dois grupos (grupos 3 e 4) e o biótipo milho em quatro grupos (grupos 1, 2, 5 e 6) sendo os grupos 2, 5 e 6 com apenas um indivíduo. As duas primeiras partições foram iguais, porém com valores de P diferentes, a primeira partição apresentou o valor de $P=0,0010$ e a segunda $P=0,0016$. A terceira partição com valor de $P=0,0027$ dividiu a matriz em 3 grupos, sendo o grupo 2, composto por somente um indivíduo. A quarta e última partição não separou a matriz e apresentou valor de $P=0,0046$.

O gap de DNA barcord ou ABGD é utilizado para delimitar espécies através de lacunas que são formadas quando a divergência entre organismos pertencentes à mesma espécie for menor que entre organismos de diferentes espécies, organizando as sequências em grupos de espécies hipotéticas (PUILLANDRE et al., 2012). A matriz de dados do presente trabalho pode ser dividida em até seis grupos, entretanto, alguns grupos apresentaram somente um indivíduo. Para os resultados desse método serem mais confiáveis, seriam necessárias mais sequencias, para verificar a continuação ou não desses grupos pequenos.

Contudo, os indivíduos classificados na análise de *locus* simples como biótipo arroz (3847_5F, 4074_1F, 4670_8M, 5498_2M, 5498_4M, 5593 1M e 5592 1F) ficaram agrupados entre eles, por vezes em dois e até mesmo (partição 3) em um mesmo grupo. O biótipo milho foi mais variável, sendo dividido em mais grupos, principalmente os indivíduos 4976, que inclusive, em outras metodologias apresenta discordância.

Figura 4 - Matriz composta de seqüências do COI de 49 indivíduos com 477 caracteres. Árvores das quatro partições resultantes da análise ABGD, cores apresentam os grupos gerados na análise. A- 1ª partição; B- 2ª partição; C- 3ª partição e D- 4ª partição.



3.3.4 PhyML

A árvore de máxima verossimilhança gerada por PhyML também suporta a divisão dos biótipos de *S. frugiperda*, com modelo evolutivo igual ao indicado pelo JModelTest, TN93+I. O valor de suporte para a separação foi de 58 e 87%, sendo o clado do biótipo arroz melhor suportado (Apêndice 5).

3.3.5. GMYC

A análise de GMYC a partir da matriz de dados do presente estudo apresentou o valor de máxima verossimilhança de 545.377, levemente maior que o modelo nulo (545.102) (razão de verossimilhança = 0.5493998, LR teste = 0.7598001), recuperando apenas duas entidades, *S. frugiperda* e o grupo externo (*S. dolichos*), com intervalo de confiança de 1 – 20.

Os valores para GMYC e o modelo nulo foram muito próximos. Um estudo com insetos do solo apresentou valores de modelo nulo: 192.7396 e GMYC: 208.9412 com razão de verossimilhança de 32.4032 gerando seis entidades, das quais cinco são grupos de espécies que compreendem espécies desconhecidas das larvas em questão (NYAMWASA et al., 2017). Um estudo com macroinvertebrados bentônicos (WHITE et al., 2014) apresentou valor de 1195.81 para o modelo nulo e 1220.916 para valor de GMYC. Os valores de GMYC e o modelo nulo são relativamente distantes, diferentes dos obtidos na presente análise.

O resultado apresentado pela rede de haplótipos, indica que os biótipos milho e arroz são separados devido a apenas 2 mutações, o que pode explicar o resultado da análise de GMYC, com valores dos modelos de Yule e modelo nulo bem próximos.

3.3.6. bPTP e PhyloMap-PTP

PhyloMap-PTP é uma ferramenta de visualização que combina mapeamento de árvores de Análise de Coordenadas Principais (PCoA) e PTP. Esse filograma é utilizado também na validação de espécies, como por exemplo no estudo de Souza et al. (2018) com peixes do complexo *Geophagus brasiliensis* Quoy & Gaimard, 1824 (Teleostei, Cichlidae) de bacias costeiras brasileiras. Nossos dados, para esta análise, também foram divididos em 2 grupos, que correspondem aos biótipos milho e arroz.

A análise de bPTP resultou na separação dos biótipos (Apêndice 6), ao contrário do GMYC. Devido a esta metodologia de bPTP utilizar diretamente substituições nucleotídicas, ela não requer uma árvore de entrada ultramétrica, cuja inferência pode ser propensa a erros (KAPLI et al., 2017). Desta maneira, o PTP frequentemente produz delimitações mais precisas do que GMYC (TANG et al., 2014).

Dumas et al. (2015) tentaram esclarecer o status de espécies do gênero *Spodoptera* que em estudos prévios sugeriram a possível ocorrência de espécies crípticas e ambiguidades taxonômicas. Em seu trabalho, os autores recuperaram dois clados distintos e bem suportados para *S. frugiperda*; suas análises de PTP e GMYC indicam que o nível de diferenciação genética apresentado é compatível com o potencial estado de espécie-irmã. Os autores enfatizam que o resultado apresentado favorece a hipótese de que as duas formas hospedeiras estão bem além dos primeiros passos de especiação.

3.4 CONCLUSÃO

Os resultados das análises genéticas confirmam a existência de um nível pronunciado de diferenciação genética de *S. frugiperda* entre o biótipo milho e o biótipo arroz, sendo suportada por quatro das sete análises testadas (análise de *locus* simples, bPTP, PhyML e PhyloMap-PTP), entretanto, a incongruência entre os resultados indica a necessidade de estudos mais aprofundados e abrangentes para a determinação dos biótipos como espécies distintas.

CONCLUSÃO

Nossos estudos indicam a presença de ambos os biótipos nas regiões do Norte Pioneiro e Campos Gerais, no Estado do Paraná e sudeste de São Paulo. Outras culturas devem ser melhor amostradas, além da cultura do milho, para uma indicação dos biótipos presentes nas outras culturas da região.

Apesar da presença do biótipo arroz, a maioria dos indivíduos coletados são do biótipo milho, sendo este predominante na região. E também é importante salientar a presença de híbridos que pode refletir a existência de fluxo gênico entre os biótipos.

Os resultados da genotipagem de PCR-RFLP com as enzimas de restrição MspI e SacI foram compatíveis com os resultados apresentados através do sequenciamento do gene COI (Apêndice 1), sendo as duas metodologias eficientes para identificação dos biótipos de *S. frugiperda*.

Alguns resultados apresentados no presente trabalho suportam a hipótese de espécies irmãs (*Locus* simples, PhyML, bPTP, e PhyloMap-PTP) entretanto, mais trabalhos são necessários uma vez que duas das metodologias utilizadas (*Multilocus* e GMYC) não separaram os biótipos mas apresentaram baixo suporte, ou seja, o resultado dessas análises não é confiável.

Uma análise *multilocus* com outros genes seria de extrema importância para a solução deste caso, assim como a utilização de outras metodologias de delimitação de espécies e uma análise morfométricas de insetos coletados diretamente do campo.

REFERÊNCIAS

BERLOCHER, S. H.; FEDER, J. L. Sympatric speciation in phytophagous insects: moving beyond controversy?. **Annual Review of Entomology**, v. 47, n. 1, p. 773-815, 2002.

BUSATO, G. R. et al. Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do

Sul, das culturas do milho e do arroz irrigado. **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 4, p. 525-529, 2002.

BUSATO, G. R. et al. Análise da estrutura e diversidade molecular de populações de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) associadas às culturas de milho e arroz no Rio Grande do Sul. **Neotropical Entomology**, 2004.

BUSATO, G. R. et al. Biologia comparada de populações de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em folhas de milho e arroz. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 743-750, 2005.

BUSATO, G. R. et al. Susceptibilidade de lagartas dos biótipos milho e arroz de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)(Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas com diferentes modos de ação. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, 2006.

CAÑAS-HOYOS, N.; MÁRQUEZ, E. J.; SALDAMANDO-BENJUMEA, C. I. Differentiation of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn and rice strains from central colombia: a wing morphometric approach. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 107, n. 3, p. 575-581, 2014.

CANO-CALLE, D.; ARANGO-ISAZA, R. E.; SALDAMANDO-BENJUMEA, C. I. Molecular identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn and rice strains in Colombia by using a PCR-RFLP of the mitochondrial gene cytochrome oxidase I (COI) and a PCR of the gene FR (for rice). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 108, n. 2, p. 172-180, 2015.

CARSTENS, B. C. et al. How to fail at species delimitation. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 17, p. 4369-4383, 2013.

CLEMENT, M.; POSADA, D. C. K. A.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 10, p. 1657-1659, 2000.

COCK, M. J. W. et al. Molecular methods to detect *Spodoptera frugiperda* in Ghana, and implications for monitoring the spread of invasive species in developing countries. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4103, 2017.

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas: **Embrapa Milho e Sorgo**. 45 p. (Circular Técnica, 21), 1995.

CRUZ, I. Da cana ao milho. **Cultivar**, Pelotas, v.10, n.110, p.12-15, 2008.

- CRUZ, I.; MONTEIRO, M. A. R. Controle Biológico da lagarta do cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma*. Sete Lagoas - MG, **Embrapa Milho e Sorgo** - Comunicado técnico 114, 2004.
- DARRIBA, D.; POSADA, D. jModelTest 2.0 Manual v. 0.1. 1. Available at, 2014.
- DIEZ-RODRIGUEZ, G. I.; OMOTO, C.. Herança da resistência de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a lambda-cialotrina. **Neotropical Entomology**, v. 30, n. 2, p. 311-316, 2001.
- DRÈS, M.; MALLET, J. Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 357, n. 1420, p. 471-492, 2002.
- DRUMMOND, A. J.; RAMBAU, A.; SUCHARD, M. **Software BEAST** 1.8. 0. 2013.
- DUMAS, P. et al. *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) host-plant variants: two host strains or two distinct species?. **Genetica**, v. 143, n. 3, p. 305-316, 2015.
- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research** 32(5), 1792-97. 2004.
- FUTUYMA, D. J. **Evolution**. Third edition. Sunderland, Massachusetts U.S.A: Sinauer Associates, Inc. Publishers, 2013.
- GALLO, D; NAKANO, O; SILVEIRA NETO, S; CARVALHO, R. P. L. Manual de entomologia agrícola. São Paulo, **Agronômica Ceres**: 649p, 1988.
- GASCUEL, O. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 7, p. 685-695, 1997.
- GIOLO, F. et al. Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797)(Lepidoptera : Noctuidae) oriundas de diferentes localidades e hospedeiros. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 8, n. 3, 2002.
- GOERGEN, G. et al. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. **PloS one**, v. 11, n. 10, p. e0165632, 2016.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à genética**. 9^oed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

GROOT, A. T. et al. Host strain specific sex pheromone variation in *Spodoptera frugiperda*. **Frontiers in Zoology**, v. 5, n. 1, p. 20, 2008

GROOT, A. T. et al. Geographic and temporal variation in moth chemical communication. **Evolution: International Journal of Organic Evolution**, v. 63, n. 8, p. 1987-2003, 2009.

GROOT, A. T. et al. The roles and interactions of reproductive isolation mechanisms in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. **Ecological Entomology**, v. 35, n. s1, p. 105-118, 2010.

GULLAN, Penny J.; CRANSTON, Peter S. **The insects: an outline of entomology**. John Wiley & Sons, 2014.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. 41:95-98. 1999.

HÄNNIGER, Sabine et al. **Chasing sympatric speciation: The relative importance and genetic basis of prezygotic isolation barriers in diverging populations of *Spodoptera frugiperda***. Ph. D. thesis, University of Amsterdam, The Netherlands, 2015.

HÄNNIGER, S. et al. Genetic basis of allochronic differentiation in the fall armyworm. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, n. 1, p. 68, 2017.

HAY-ROE, M. M.; MEAGHER, R. L.; NAGOSHI, R. N. Effects of cyanogenic plants on fitness in two host strains of the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). **Journal of Chemical Ecology**, v. 37, n. 12, p. 1314-1322, 2011.

HOFFMANN-CAMPO, C. B.; DE OLIVEIRA, E. B.; MOSCARDI, F. Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). **Embrapa Soja-Documentos** (INFOTECA-E), 1985.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754-755, 2001.

INGBER, D. A.; MASON, C. E.; FLEXNER, L. Cry1 Bt Susceptibilities of Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Host Strains. **Journal of Economic Entomology**. 2017.

JEGER, Michael et al. Pest categorisation of *Spodoptera frugiperda*. **EFSA Journal**, v. 15, n. 7, 2017.

JUÁREZ, M. L. et al. Host association of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) corn and rice strains in Argentina, Brazil, and Paraguay. **Journal of Economic Entomology**. v105, p.573–582. 2012.

JUÁREZ, M. L. et al. Population structure of *Spodoptera frugiperda* maize and rice host forms in South America: are they host strains?. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 152, n. 3, p. 182-199, 2014.

KAPLI, P. et al. Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. **Bioinformatics**, v. 33, n. 11, p. 1630-1638, 2017.

KERGOAT, G. J. et al. Disentangling dispersal, vicariance and adaptive radiation patterns: a case study using armyworms in the pest genus *Spodoptera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 65, n. 3, p. 855-870, 2012.

KOST, S. et al. AZ-linked sterility locus causes sexual abstinence in hybrid females and facilitates speciation in *Spodoptera frugiperda*. **Evolution**, v. 70, n. 6, p. 1418-1427, 2016.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution** 33:1870-1874. 2016.

LEFORT, V.; LONGUEVILLE, J.; GASCUEL, O. SMS: smart model selection in PhyML. **Molecular Biology and Evolution**, v. 34, n. 9, p. 2422-2424, 2017.

LEVY, H. C.; GARCIA-MARUNIAK, A.; MARUNIAK, J. E. Strain identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) insects and cell line: PCR-RFLP of cytochrome oxidase C subunit I gene. **Florida Entomologist**, v. 85, n. 1, p. 186-190, 2002.

LEWTER, J. A. et al. Genetic variation within and between strains of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, v. 89, n. 1, p. 63-68, 2006.

LIMA, E. R.; MCNEIL, J. N. Female sex pheromones in the host races and hybrids of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Chemoecology**, v. 19, n. 1, p. 29-36, 2009.

LU, Y.J. et al. Molecular characterization of a strain-specific repeated DNA sequence in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Molecular Biology**, v. 3, n. 2, p. 123-130, 1994.

LU, Y.; ADANG, M. J. Distinguishing fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) strains using a diagnostic mitochondrial DNA marker. **Florida Entomologist**, v. 79, n. 1, p. 48, 1996.

MACHADO, V. et al. Molecular characterization of host strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Southern Brazil. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 101, n. 3, p. 619-626, 2008.

MAYR, E. **Populations, species, and evolution: an abridgment of animal species and evolution**. Harvard University Press, 1970.

MCMICHAEL, M.; PROWELL, D. P. Differences in amplified fragment-length polymorphisms in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 92, n. 2, p. 175-181, 1999.

MEAGHER JR, R. L.; GALLO-MEAGHER, M. Identifying host strains of fall armyworm (Lepidoptera:Noctuidae) in Florida using mitochondrial markers. **Florida Entomologist**, v. 86, n. 4, p. 450-455, 2003.

MEAGHER, R. L.; NAGOSHI, R. N. Population dynamics and occurrence of *Spodoptera frugiperda* host strains in southern Florida. **Ecological Entomology**, v. 29, n. 5, p. 614-620, 2004.

MEAGHER, R. L.; NAGOSHI, R. N.; STUHL, C. J. Oviposition choice of two fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. **Journal of Insect Behavior**, v. 24, n. 5, p. 337-347, 2011.

MONAGHAN, M. T. et al. DNA-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 360, n. 1462, p. 1925-1933, 2005.

MURÚA M.G. et al. Demonstration Using Field Collections that Argentina Fall Armyworm Populations Exhibit Strain-specific Host Plant Preferences. *Journal of Economic Entomology*. 2015.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. L. FR tandem-repeat sequence in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 96, n. 3, p. 329-335, 2003a.

NAGOSHI, R. N.; MEAGHER, R. Fall armyworm FR sequences map to sex chromosomes and their distribution in the wild indicate limitations in interstrain mating. *Insect Molecular Biology*, v. 12, n. 5, p. 453-458, 2003b.

NAGOSHI, R. N. et al. New restriction fragment length polymorphisms in the cytochrome oxidase I gene facilitate host strain identification of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the southeastern United States. *Journal of Economic Entomology*, v. 99, n. 3, p. 671-677, 2006.

NAGOSHI R.N. et al. Using stable isotope analysis to examine fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in a cotton habitat. *Journal of Economic Entomology*. 2007.

NAGOSHI R.N. et al. Genetic characterization of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in Argentina. *Journal of Economic Entomology*. 2012.

NYAMWASA, I. et al. Occurrence of soil insect pests: insight from classical identification supplemented with DNA barcoding. *International Journal of Pest Management*, v. 63, n. 1, p. 18-29, 2017.

ORSUCCI, M. et al. Transcriptional plasticity evolution in two strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) feeding on alternative host-plants. *BioRxiv*, p. 263186, 2018.

PANTOJA, S. **Filogenética – Primeiros passos**. Editora Technical Books. Rio de Janeiro, 2016.

PASHLEY, D. P.; JOHNSON, S. J.; SPARKS, A. N. Genetic population structure of migratory moths: the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 78, n. 6, p. 756-762, 1985.

PASHLEY, D. P. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex?. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 79, n. 6, p. 898-904, 1986.

PASHLEY, D. P.; MARTIN, J. A. Reproductive incompatibility between host strains of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 80, n. 6, p. 731-733, 1987.

PASHLEY, D. P. Current status of fall armyworm host strains. **Florida Entomologist**, p. 227-234, 1988a.

PASHLEY, D. P. Quantitative genetics, development, and physiological adaptation in host strains of fall armyworm. **Evolution**, v. 42, n. 1, p. 93-102, 1988b.

PASHLEY, D. P.; HAMMOND, Abner M.; HARDY, Tad N. Reproductive isolating mechanisms in fall armyworm host strains (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 85, n. 4, p. 400-405, 1992.

PÉREZ-LOSADA, M. et al. Phylogenetic species delimitation of the earthworms *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouché, 1972 (Oligochaeta, Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Pedobiologia**, v. 49, n. 4, p. 317-324, 2005.

PICANÇO, M.; GONRING, AHR; OLIVEIRA, IR de. **Manejo integrado de pragas**. Viçosa: UFV, 2010.

POGUE, G. M. A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society** 43: 1-202, 2002.

PROWELL, D. P.; MCMICHAEL, M.; SILVAIN, J-F. Multilocus genetic analysis of host use, introgression, and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 97, n. 5, p. 1034-1044, 2004.

PUIILLANDRE, N. et al. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 8, p. 1864-1877, 2012.

- QUISENBERRY, S. S. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strain reproductive compatibility. **Florida Entomologist**, p. 194-199, 1991.
- RAMBAUT, A. et al. **Tracer** v1. 6. Computer program and documentation distributed by the author. 2014.
- RÍOS-DÍEZ, J. D.; SALDAMANDO-BENJUMEA, C. I. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) strains from central Colombia to two insecticides, methomyl and lambda-cyhalothrin: a study of the genetic basis of resistance. **Journal of Economic Entomology**, v. 104, n. 5, p. 1698-1705, 2011.
- RÍOS-DÍEZ, J. D.; SIEGFRIED, B.; SALDAMANDO-BENJUMEA, C. I. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) strains from central Colombia to Cry1Ab and Cry1Ac entotoxins of *Bacillus thuringiensis*. **Southwestern Entomologist**, v. 37, n. 3, p. 281-293, 2012.
- ROSAS-GARCÍA, N. M. et al. Identificación de Biotipos de *Spodoptera frugiperda* Provenientes de Plantas Hospederas de Maíz en Diferentes Regiones de México. **Southwestern Entomologist**, v. 41, n. 3, p. 761-770, 2016.
- ROY, A. et al. Diet dependent metabolic responses in three generalist insect herbivores *Spodoptera* spp. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 71, p. 91-105, 2016.
- SALDAMANDO, C. I.; VÉLEZ-ARANGO, A. M. Host plant association and genetic differentiation of corn and rice strains of *Sodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in Colombia. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 921-929, 2010.
- SALDAMANDO-BENJUMEA, Clara I. et al. Assortative mating and lack of temporality between corn and rice strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) from Central Colombia. **Journal of insect behavior**, v. 27, n. 5, p. 555-566, 2014.
- SALINAS-HERNANDEZ, H.; SALDAMANDO-BENJUMEA, C. I. Haplotype identification within *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera: Noctuidae) corn and rice strains from Colombia. **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 4, p. 421-430, 2011.

SANTIAGO, G. P. et al. Efeitos de extratos de plantas na biologia de *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) mantida em dieta artificial. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 792-796, 2008.

SARMENTO, R. et al. Revisão da biologia, ocorrência e controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) em milho no Brasil. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 2, 2002.

SCHÖFL, G.; HECKEL, D. G.; GROOT, A. T. Time-shifted reproductive behaviours among fall armyworm (Noctuidae: *Spodoptera frugiperda*) host strains: evidence for differing modes of inheritance. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 22, n. 7, p. 1447-1459, 2009.

SILVA-BRANDÃO, K. L. et al. Transcript expression plasticity as a response to alternative larval host plants in the speciation process of corn and rice strains of *Spodoptera frugiperda*. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 792, 2017.

SOUZA, C. R. et al. Species validation and cryptic diversity in the *Geophagus brasiliensis* Quoy & Gaimard, 1824 complex (Teleostei, Cichlidae) from Brazilian coastal basins as revealed by DNA analyses. **Hydrobiologia**, v. 809, n. 1, p. 309-321, 2018.

SPARKS, A. N. A review of the biology of the fall armyworm. **Florida Entomologist**, p. 82-87, 1979

STOUTHAMER, R. et al. The utility of internally transcribed spacer 2 DNA sequences of the nuclear ribosomal gene for distinguishing sibling species of *Trichogramma*. **BioControl**, v. 43, n. 4, p. 421-440, 1999.

TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 510, 2013.

TANG, C. Q. et al. Effects of phylogenetic reconstruction method on the robustness of species delimitation using single-locus data. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 5, n. 10, p. 1086-1094, 2014.

TEMPLETON, A.R.; CRANDALL, K.A.; SING, C.F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. **Genetics**, v. 132, p. 619-633. 1992.

UNBEHEND, M. et al. Pheromonal divergence between two strains of *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 3, p. 364-376, 2013.

(USEPA) **United States Environmental Protection Agency**. Biopesticides registration action document: *Bacillus thuringiensis* var. Aizawai Cry1F and the genetic material (from the insert of plasmid PGMA281) necessary for its production in cotton and *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki. 2005

(USEPA) **United States Environmental Protection Agency**. Biopesticides registration action document: Cry1Ab and Cry1F *Bacillus thuringiensis* (Bt) corn plant-incorporated protectants. 2001

VÉLEZ-ARANGO, A. N. A. et al. Identificación de biotipos de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) mediante marcadores mitocondriales y nucleares. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 34, n. 2, p. 145-150, 2008.

WAHLBERG, N.; OLIVEIRA, R.; SCOTT, J. A. Phylogenetic relationships of Phyciodes butterfly species (Lepidoptera: Nymphalidae): complex mtDNA variation and species delimitations. **Systematic Entomology**, v. 28, n. 2, p. 257-274, 2003.

WHITE, B. P. et al. Comparison of four species-delimitation methods applied to a DNA barcode data set of insect larvae for use in routine bioassessment. **Freshwater Science**, v. 33, n. 1, p. 338-348, 2014.

WHITFORD, F. et al. Oviposition preference, mating compatibility, and development of two fall armyworm strains. **Florida Entomologist**, p. 234-243, 1988.

WILEY, E. O. Phylogenetics: the theory and practice of phylogenetic systematic. **New York**: John Wiley. 1981.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Tabela geral dos resultados das análises de PCR-RFLP e Sequenciamento do gene COI. Letras na coluna de identificação aponta o sexo do indivíduos: F – Fêmea e M – Macho. As letras na coluna dos biótipos significam: M – Biótipo Milho e A – Biótipo arroz.

(Continua)

Local	Identificação	Biótipo de acordo com:		
		Sequenciamento COI	MspI	SacI
Ponta Grossa - PR	1F	M	M	M
	2F	M	M	M
	4F	-	A	A
	5F	-	M	M
	1M	-	A	A
	2M	A	-	-
	4M	M	M	M
	5M	A	A	A
Tibagi – PR	15F	M	M	M
	16F	M	M	M
	17F	M	M	M
	18F	-	M	M
	4670 7M	-	M	M
	8M	A	A	A
	9M	-	M	M
	10M	-	M	M
	3F	M	-	-
	5F	M	-	-
	12F	-	A	M
	13F	M	A	M
	16F	-	A	M
	20F	M	A	M
	4739 2M	-	-	-
	3M	-	A	M
	4M	-	A	M
	6M	-	A	M
	8M	-	A	M
	9M	-	A	M
	1F	A	A	A
	2F	-	M	M
	3F	-	M	M
	5F	-	M	M
	4074 1M	-	M	M

Tibagi – PR	4074	2M	M	M	M
		4M	-	M	M
		5M	M	M	M
	4976	1F	-	M	M
		2F	M	M	M
		3F	M	M	M
		4F	-	M	M
		1M	M	M	M
		2M	-	M	M
		3M	M	M	M
		4M	M	M	M
	4975	1F	M	M	M
		1M	M	M	M
		2M	M	A	M
		3M	M	M	M
4M		-	M	M	
Arapoti - PR	6376	2F	M	-	-
		3F	-	M	M
		4F	M	M	M
		5F	-	A	M
		1M	-	M	M
		3M	M	-	-
		4M	M	M	M
		5M	-	M	M
Wenceslau Braz - PR	4491	1F	M	M	M
		2F	-	M	M
		3F	M	M	M
		4F	-	M	M
		1M	M	M	M
		2M	-	M	M
		4M	-	M	M
		5M	-	M	M
Itaberá - SP	3847	1F	M	M	M
		4F	M	M	M
		5F	A	A	A
		6F	M	M	M
		2M	M	M	M
		4M	M	M	M
		5M	M	M	M
		6M	-	M	M

(Conclusão)

APÊNDICE 2 – PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Para a extração de DNA, o material foi macerado com auxílio de nitrogênio líquido, posteriormente foram adicionados 480 µL do tampão de extração (30 µL de água ultrapura esterelizada, 120 µL Tris 1M, 240 µL NaCl 5M, 6 µL β-mercapto etanol e 84 µL EDTA 0,5M) em cada tubo de 1,5mL com as amostras maceradas, acrescidos de 120 µL de CTAB 10%. As amostras foram homogeneizadas com o auxílio do vórtex e colocadas em banho-maria por 5 minutos à 65°C, após, foi deixado esfriar por mais 5 minutos, em temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 6 µL de Proteinase K (10 mg/ml) às amostras, colocando a solução no fundo do tubo, agitando-se novamente através de suaves inversões. As amostras foram incubadas em banho-maria por 60 minutos à 65°C. Durante este período as amostras foram homogeneizadas suavemente de 15 em 15 minutos e após os 60 minutos de banho-maria as amostras foram deixadas para esfriar por mais 5 minutos em temperatura ambiente.

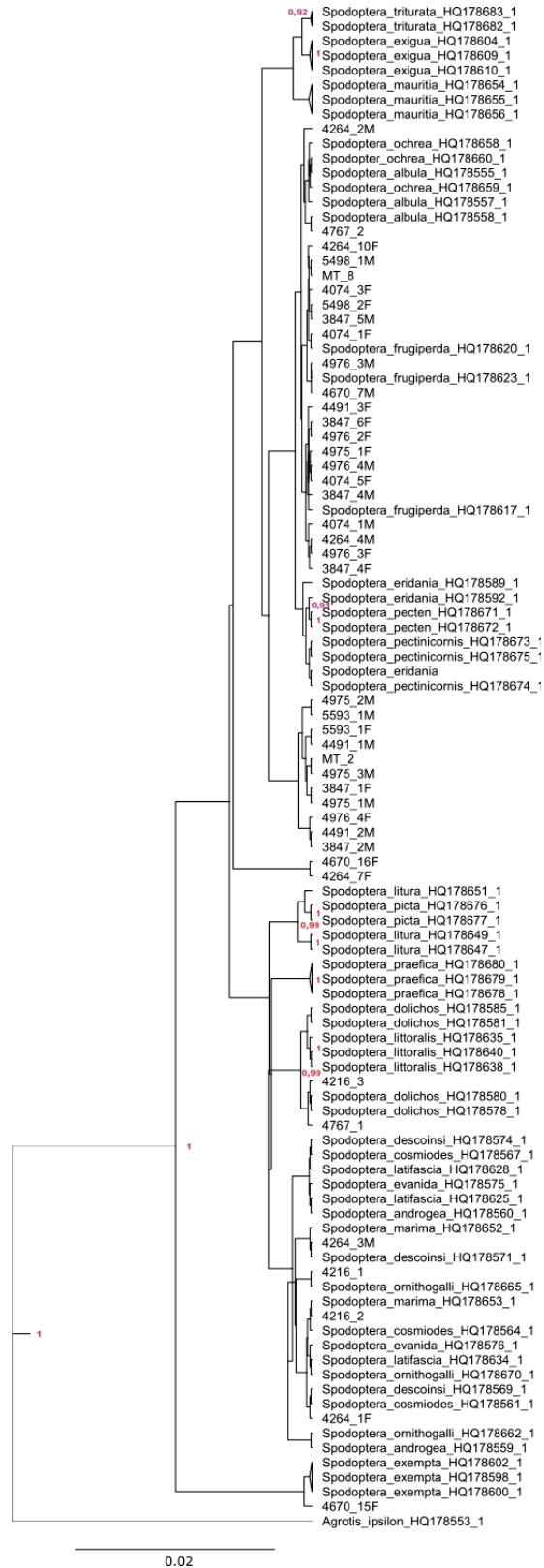
Os tubos foram centrifugados por 20 minutos à 14.000 rpm. O sobrenadante foi retirado, aproximadamente 500 µL, e adicionado a novos tubos contendo 500 µL do CIA 24:1 (Clorofórmio: álcool isoamílico). Em seguida os tubos foram invertidos por 5 minutos e centrifugados por 20 minutos à 14.000 rpm. O sobrenadante, aproximadamente 400 µL, foi transferido para tubos limpos, aos quais foi adicionado igual volume de isopropanol gelado, acrescidos de 45% do volume retirado de acetato de amônia (10 M). As amostras foram lentamente homogeneizadas e deixadas à -20°C por 2 horas ou a ± 4°C durante toda a noite.

Após nova centrifugação de 20 minutos à 14.000 rpm o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 300 µL de etanol 70% gelado e centrifugado novamente por 10 minutos à 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o pellet foi colocado na estufa a 37°C por no mínimo 10 minutos. Para finalizar foi adicionado 100 µL de RNase (40µg/ml), as amostras foram homogeneizadas para diluição do pellet e deixado na estufa à 37°C de 30 minutos à 2 horas para degradar o RNA.

Após cada extração, a integridade do DNA genômico foi determinada através da eletroforese em gel de agarose a 1% e corado com 5 µL de SYBER Safe DNA gel. Às amostras foram adicionados 2 µL de tampão de carregamento (0,25% de azul de

bromofenol e 0,4% de sucrose), na proporção 1:1. Usou-se 2 µL do marcador DNA *ladder* 100 pb, acrescidos de 2 µL de tampão de carregamento (1:1) como referência para o tamanho de bandas. As amostras de DNA genômico foram submetidas à corrida eletroforética por aproximadamente 4 h a 50 V e fotodocumentadas através de transiluminador (*LPix Image EX – Loccus Biotecnologia*).

APÊNDICE 3 - Arvore consenso de Inferência Bayesiana de espécies de *Spodoptera*. Os números dos nós correspondem aos valores da probabilidade posterior maiores que 0,9. Árvore gerada a partir de 104 táxons e 660 caracteres. Modelo TrN + G. Gene 28S utilizando os primers 28S-01 e 28SR-01.



APÊNDICE 5 - Árvore de PhyML com sequências do gene COI de 64 táxons. Ramo rosa indicando o clado do biótipo arroz e os ramos azuis o clado do biótipo milho. Os valores nos ramos são os valores de suporte de *Bootstrap*.



APÊNDICE 6 - Árvore de bPTP com sequências do gene COI de 64 táxons, os ramos vermelho contínuos indicam possíveis espécies significativas. Clado de linhas contínuas vermelhas de cima referente ao biótipo milho e o clado de linhas contínuas vermelhas abaixo referente ao biótipo arroz.

