

PEDRO INOCÊNCIO SILVEIRA

AVALIAÇÃO DO ESTADO DE ACASALAMENTO EM MACHOS DE *Tuta absoluta* (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) EM FUNÇÃO DO TAMANHO DO ESPERMATÓFORO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima

Coorientador: Manuel Alejandro Ix Balam

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2020

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S587a
2020
Silveira, Pedro Inocência, 1993-
Avaliação do estado de acasalamento em machos de *Tuta absoluta* (Lepidoptera : Gelechiidae) em função do tamanho do espermatóforo / Pedro Inocência Silveira. – Viçosa, MG, 2020.
28 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 25-28.

1. Lepidoptera - Reprodução. 2. Acasalamento de animais.
3. Lepidoptera - Comportamento sexual. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de Pós-Graduação em Entomologia. II. Título.

CDD 22. ed. 595.78

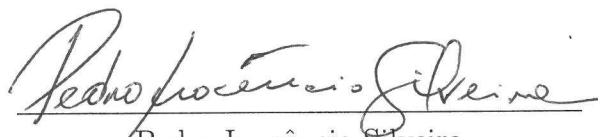
PEDRO INOCÊNCIO SILVEIRA

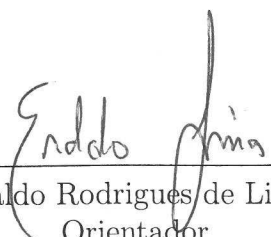
AVALIAÇÃO DO ESTADO DE ACASALAMENTO EM MACHOS DE *Tuta absoluta* (LEPIDOPTERA: GELECHIIDAE) EM FUNÇÃO DO TAMANHO DO ESPERMATÓFORO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 18 de dezembro de 2020.

Assentimento:


Pedro Inocência Silveira
Autor


Eraldo Rodrigues de Lima
Orientador

Agradecimentos

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela oportunidade de realização do mestrado acadêmico.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao programa Ciência sem Fronteiras por abrir novos horizontes e ter auxiliado no ingresso do mestrado.

Ao professor Eraldo pela orientação, amizade e todo esforço para a realização desse trabalho e também em minha formação profissional e pessoal. Pelos puxões de orelha mas também pelas risadas compartilhadas em momentos especiais.

À minha mãe Rosimar, pela dedicação incondicional à minha educação, sempre me incentivando na busca pelo conhecimento.

Ao meu pai Antônio, por todos os conselhos e ensinamentos, além do apoio em quaisquer situações.

Ao meu filho João Pedro, minha maior fonte de amor e força.

À toda minha família e amigos pelos momentos de descontração e pela coragem que me deram.

À todos os professores do departamento pela alegria e determinação em transmitir conhecimento durante as disciplinas lecionadas.

Ao professor José Lino Neto pela atenção e fornecimento de materiais que auxiliaram na realização desse trabalho.

Ao professor Og Francisco Fonseca de Souza pela disponibilização de seu laboratório e equipamentos essenciais para a conclusão desse trabalho.

Ao Manuel pela coorientação, atenção e disposição que sempre possui em ensinar. Por toda ajuda em campo, em laboratório, com a parte escrita e com as análises dos dados. Também pela compreensão e amizade.

À Natália pela espontaneidade, pelas risadas, pela amizade e pelos conselhos valiosos.

Aos demais amigos do Laboratório de Semioquímicos e Comportamento de Insetos: Suelen, Sofia, Laura, Marcondes, Carlos, Kárenn e Giovana pelo acolhimento, pelos ensinamentos, pela amizade e momentos alegres que levarei sempre comigo.

Ao Luís e Wellington, estagiários do Laboratório de Semioquímicos e Comportamento de Insetos, pela amizade e determinação em contribuir para que esse e outros trabalhos acontecessem.

À Josie pela disposição contínua em ajudar-nos.

Ao Jhon Marulanda pela amizade e por toda ajuda e disponibilidade.

À todos os funcionários da Entomologia, pelos diversos trabalhos desempenhados e compreensão em momentos burocráticos, fatores importantíssimos no dia a dia.

Aos programas LATEX e R.

Resumo

SILVEIRA, Pedro Inocência, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2020. **Avaliação do estado de acasalamento em machos de *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) em função do tamanho do espermatóforo.** Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima. Coorientador: Manuel Alejandro Ix Balam.

Em Lepidoptera, durante a cópula, machos transferem esperma e nutrientes para as fêmeas através da formação de um saco proteico chamado espermatóforo, que é considerado uma forma de investimento nutricional parental. Não é possível distinguir, visualmente, machos virgens de acasalados da traça-do-tomateiro *Tuta absoluta*. Porém, a partir de informações quantitativas em relação à diminuição do tamanho do espermatóforo produzido em sucessivas cópulas, e por meio de experimentos controlados de laboratório, poder-se-ia estimar o estado reprodutivo de machos provenientes do campo. Para isso, foi elaborada uma reta geral/controlada de regressão linear do tamanho do espermatóforo em relação ao número de cópulas, verificando que é possível distinguir os machos virgens dos acasalados. No entanto, este experimento foi realizado sem controle de peso dos indivíduos e com período refratário (intervalo entre cópulas) dos machos de 24 horas. Atentamos que, machos de campo podem ser muito diferentes em peso e período refratário e analisamos o efeito dos mesmos em relação ao tamanho do espermatóforo produzido, para verificar a validade da reta encontrada anteriormente. Sendo assim, novas retas foram elaboradas e contrastadas para determinar situações em que possivelmente espermatóforos provenientes de laboratório poderiam ser equivalentes com os produzidos por machos de campo e conseqüentemente melhor representar tal população. No presente trabalho testamos a hipótese de que cópulas consecutivas, intervalo entre cópulas e peso pupal dos machos alteram o tamanho do espermatóforo produzido pelos mesmos. Nossos resultados mostraram que machos pesados produzem espermatóforos maiores do que machos leves. Há uma redução no tamanho do espermatóforo de segunda cópula em relação a um de primeira cópula, quando são produzidos em dias consecutivos, independente do peso pupal dos machos. Porém um intervalo de 96 horas entre a primeira e segunda cópula promove um aumento no tamanho do espermatóforo, que atinge ou ultrapassa aqueles

produzidos por machos virgens. Os resultados mostram dados originais sobre o potencial reprodutivo de machos de *T. absoluta* que nos ajudam entender sua biologia reprodutiva e estabelecer novas estratégias de controle.

Palavras-chave: Reprodução de Lepidoptera. Machos Virgens. Machos Acasalados. Período Refratário.

Abstract

SILVEIRA, Pedro Inocência, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2020. **Mating status evaluation in *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae) males as a function of spermatophore size.** Adviser: Eraldo Rodrigues de Lima. Co-adviser: Manuel Alejandro Ix Balam.

In Lepidoptera, during copulation, males transfer sperm and nutrients to females through the formation of a protein sac called spermatophore, which is considered a form of parental nutritional investment. It is not possible to visually distinguish virgin from mated males of the tomato leaf miner *Tuta absoluta*. However, based on quantitative information in relation to the decrease in the size of the spermatophore produced in successive copulations, and through controlled laboratory experiments, it would be possible to estimate the reproductive status of males from the field. For this, a general/control line of linear regression of the size of the spermatophore in relation to the number of copulas was elaborated, verifying that it is possible to distinguish virgin males from mated ones. However, this experiment was carried out without weight control and with a 24 hours refractory period (interval between copulations) of males. We noted that field males can be different in weight and refractory period and we analyzed their effect in relation to the size of the spermatophore produced, to verify the validity of the previously founded line. Thus, new lines were elaborated and contrasted to determine the situations in which possibly spermatophores from laboratory are equivalent to those obtained by field males and consequently better represent such population. In the present work, we tested the hypothesis that consecutive copulations, interval between copulations and male pupal weight alter the size of the spermatophore produced by them. Our results showed that heavy males produce larger spermatophores than light males. There is a reduction in the size of the spermatophore of the second copulation in relation to one of the first copulation, when they are produced on consecutive days, regardless of the male pupal weight. However, an interval of 96 hours between the first and second copulation promotes an increase in the size of the spermatophore, which reaches or exceeds those produced by

virgin males. The results show original data on the reproductive potential of *T. absoluta* that helps us to understand its reproductive biology and establish new control strategies.

Keywords: Lepidoptera Reproduction. Virgin Males. Mated Males. Refractory Period.

Sumário

	Página
1 Introdução	10
2 Material e Métodos	13
3 Análise Estatística	17
4 Resultados	18
5 Discussão	21
6 Conclusões	24
7 Referências	25

1 Introdução

Em Lepidoptera, durante a cópula, os machos transferem esperma e nutrientes para a bolsa copuladora das fêmeas através da formação de um saco proteico chamado espermatóforo (Drummond, 1984). O espermatóforo constitui uma forma de investimento nutricional parental (Thornhill, 1976) e pode ser utilizado pelas fêmeas para produção de ovos e manutenção somática (Boggs & Gilbert, 1979; Boggs, 1981).

Fatores como número prévio de cópulas, peso e período refratário dos machos estão diretamente relacionados com sua capacidade reprodutiva, podendo influenciar o tamanho do espermatóforo produzido durante a cópula. Por exemplo, cópulas consecutivas promovem um declínio no volume e peso dos espermatóforos produzidos por machos de *Ostrinia nubilalis* Hübner (Pyralidae) e *Choristoneura rosaceana* Harris (Tortricidae), respectivamente (Royer & McNeil, 1993; Delisle & Bouchard, 1995). A redução no tamanho dos espermatóforos em cópulas consecutivas é geralmente mais acentuada da primeira para segunda cópula, como observado em *C. rosaceana* e *Choristoneura fumiferana* Clemens (Tortricidae) (Delisle & Bouchard, 1995; Marcotte *et al.*, 2005).

Royer & McNeil (1993) encontraram uma relação entre o peso pupal dos machos de *O. nubilalis* com o volume do primeiro espermatóforo produzido, sendo que os machos mais pesados produziram espermatóforos mais volumosos. Resultados similares são relatados para *C. rosaceana* e *Melitaea cinxia* L. (Nymphalidae), onde machos advindos de pupas mais pesadas produzem maiores espermatóforos nas fêmeas (Delisle & Bouchard, 1995; Duploux & Hanski, 2015).

O período refratário (ou intervalo entre cópulas) do macho também afeta o tamanho dos espermatóforos. Períodos refratários longos entre as primeiras cópulas estão associados a um aumento do espermatóforo em: peso para *Pararge aegeria* L. (Nymphalidae) (Svärd, 1985) e *Pseudaletia separata* Walker (Noctuidae) (He & Tsubaki, 1992), volume em *O. nubilalis* (Royer & McNeil, 1993) e massa em *C. rosaceana* (Marcotte *et al.*, 2007).

A traça-do-tomateiro *Tuta absoluta* Meyrick (Gelechiidae) é um microlepidóptero nativo da América do Sul e uma das principais pragas do tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Guedes & Picanço, 2012). Ao alimentar, as lagartas produzem galerias nos brotos terminais, flores, frutos e folhas do tomate (Haji, 1982). O principal método empregado no controle de *T. absoluta* são os inseticidas, porém, o hábito endofítico das lagartas as deixam protegidas no

mesófilo foliar ou dentro dos frutos, diminuindo a eficiência dos produtos químicos (Cocco *et al.*, 2012).

Para evitar ou reduzir o uso indiscriminado de inseticidas, feromônios sexuais são cada vez mais utilizados na agricultura para controlar insetos praga através das técnicas de atrai-e-mata, confusão sexual e coleta massal (Prasad & Prabhakar, 2012). A coleta massal consiste em utilizar uma alta densidade de armadilhas iscadas com feromônio sexual sintético da fêmea para atrair e capturar o maior número possível de machos (Jones, 1998). Dessa forma, uma reduzida frequência de machos minimiza os acasalamentos e mantém a densidade populacional da espécie praga abaixo do nível de dano econômico (Lôbo, 2005). Apesar da coleta massal alterar a razão sexual, o controle das populações de machos de *T. absoluta* nem sempre é satisfatório (Caparros Megido *et al.*, 2013).

Cocco *et al.* (2012) demonstraram que a coleta massal utilizando feromônio sexual em diferentes densidades em casas de vegetação não foi eficiente na redução dos danos nas folhas e frutos de tomate. Prováveis causas das falhas da coleta massal para controle de *T. absoluta* têm sido associadas ao acasalamento múltiplo de ambos os sexos, migração de fêmeas acasaladas e competição de fêmeas silvestres com as armadilhas (Lôbo, 2005). Speridião (2020) observou em túnel de vento que os machos alcançam mais rapidamente o extrato da glândula do que os componentes sintéticos, sugerindo uma vantagem das fêmeas em relação as armadilhas.

O espermatóforo é uma forma de investimento nutricional (Thornhill, 1976), portanto machos virgens ou pesados podem produzir um maior espermatóforo (Royer & McNeil, 1993; Delisle & Bouchard, 1995) e fornecer mais benefícios à fêmea e sua prole (Lee *et al.*, 2014). Assim, as fêmeas devem apresentar uma preferência de acasalamento por indivíduos de maior qualidade reprodutiva (Phelan & Baker, 1986; Muller *et al.*, 2016). Ao contrário, machos que produzem espermatóforos menores podem ser classificados como de menor qualidade e ser mais rejeitados pelas fêmeas, sendo possivelmente atraídos para as armadilhas com feromônio sexual sintético. Assim, a competição entre fêmeas e armadilhas, além da suposta preferência da fêmea por machos de maior qualidade reprodutiva, podem ser os fatores que tornam o armadilhamento menos eficiente e o controle dificultado.

Uma limitação para verificar esta hipótese é a determinação do estado reprodutivo dos machos de *T. absoluta* que são capturados nas armadilhas, ou seja, se estes são virgens ou acasalados. Visualmente isto não possível. Por estar associado à capacidade reprodutiva, o tamanho do espermatóforo pode constituir um parâmetro para determinar o estado reprodutivo dos machos. Além do número de sucessivas cópulas, alguns outros fatores como peso pupal e período refratário dos machos podem contribuir para alterar o tamanho do espermatóforo, gerando assim, dúvidas sobre a estimativa do estado reprodutivo no campo. No

entanto, ainda é desconhecido como esses fatores modificam o tamanho do espermátóforo em *T. absoluta*.

No presente trabalho testamos a hipótese de que cópulas consecutivas, peso pupal dos machos e intervalo entre cópulas alteram o tamanho do espermátóforo produzido por machos de *T. absoluta*. Previmos que machos mais pesados e com maior período refratário produziram espermátóforos maiores. Retas de regressão linear do tamanho do espermátóforo foram elaboradas e contrastadas. Determinamos em quais circunstâncias ou situações espermátóforos produzidos por indivíduos de uma população de laboratório, possivelmente seriam equivalentes com os produzidos por machos coletados em campo. Os resultados são discutidos no contexto da aplicabilidade das retas de regressão, evidenciando os fatores biológicos e ambientais que podem afetar, direta ou indiretamente, o tamanho dos espermátóforos em campo.

2 Material e Métodos

2.1 Criação de *T. absoluta*

Os experimentos foram efetuados no Laboratório de Semioquímicos e Comportamento de Insetos da Universidade Federal de Viçosa (UFV), MG, Brasil. Ovos de *T. absoluta* depositados em folhas de tomate (*S. lycopersicum*) foram colocados em gaiolas de madeira (30 x 20 x 30 cm) cobertas com tela organza para possibilitar o fluxo de ar. As lagartas eclodidas foram alimentadas com folhas de tomate cujos pecíolos estavam submersos em água para manter a turgidez das mesmas. Sempre que necessárias novas folhas de tomate eram colocadas na gaiola como fonte de alimento para as lagartas. Após o período larval, as pupas foram retiradas das folhas e inseridas em placas Petri (90 x 15 mm) dentro de gaiolas para o desenvolvimento e emergência dos adultos. Os adultos foram alimentados *ad libitum* com uma solução de açúcar 10% e folhas de tomate foram colocadas diariamente em cada gaiola para novas oviposições. A população de *T. absoluta* foi mantida em uma sala de criação com condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo (12:12) e umidade relativa ($70 \pm 5\%$).

2.2 Plantas de tomate

Para a alimentação das lagartas de *T. absoluta* foram utilizadas plantas de tomate da variedade Santa Clara, obtidas de semeadura em bandejas plásticas contendo substrato para hortaliças. As plantas de tomate com duas folhas definitivas, além do par de folhas cotiledonares, foram transplantadas para vasos de 3L contendo condicionador de solo MecPlant®. As plantas foram microirrigadas diariamente por sistema automatizado e macronutrientes foram fornecidos a cada semana pelo uso de NPK granulado (10:10:10), de acordo com as especificações do fabricante. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação em condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa ($70 \pm 5\%$).

2.3 Padronização do peso de machos e fêmeas de *T. absoluta*

Todos os indivíduos utilizados nos experimentos (com exceção do tratamento controle) foram previamente pesados conforme a massa pupal (Muller *et al.*, 2016). As pupas foram sexadas de acordo com a localização do poro genital, conforme o método proposto por Coelho

& França (1987). Após sexadas, cada pupa foi pesada em uma balança analítica Shimadzu AUW220D. A massa pupal de machos e fêmeas foi padronizada em $2,12 \pm 0,14$ mg e $2,3 \pm 0,16$ mg, respectivamente. Cada intervalo de peso corresponde ao valor da média $\pm 25\%$ do desvio padrão, estimado a partir do peso de 200 pupas de cada sexo. Em uma análise preliminar, pupas de diferentes pesos ($n = 10$) foram selecionadas aleatoriamente e os adultos que emergiram foram novamente pesados. Todos os adultos apresentaram uma redução de aproximadamente 30% no peso total da pupa após a remoção da exúvia.

2.4 Formação de casais de *T. absoluta*

Pupas de *T. absoluta* foram colocadas, segundo o sexo, em placas Petri contendo vermiculita para simular o solo, e logo inseridas dentro de gaiolas distintas para a emergência dos adultos. Após a emergência dos mesmos, um macho e uma fêmea foram transferidos para uma gaiola plástica de 70 mL para copularem.

2.5 Extração do espermátóforo

Após a cópula, a fêmea foi crio anestesiada a -5°C durante 10 minutos e seguidamente imobilizada em posição ventral em uma placa Petri contendo parafina. Um corte foi realizado cuidadosamente no penúltimo segmento abdominal da fêmea utilizando agulhas e tesouras cirúrgicas, sob um microscópio estereoscópico Leica EZ4. O espermátóforo foi extraído utilizando solução tampão PBS (pH= 7,2) para evitar a dessecação, desnaturação e mudanças no formato das estruturas (Bancroft & Gamble, 2008). O espermátóforo foi depositado em um microtubo Eppendorf (0,6 mL) e conservado com 0,2 mL de fixador Karnovsky a 5°C até sua posterior análise.

2.6 Mensuramento do espermátóforo

O espermátóforo foi fotografado em um microscópio estereoscópico Leica M205A acoplado a uma câmera multifocal Leica MC170 HD. Seguidamente, a área do espermátóforo foi mensurada utilizando o software ImageJ (versão 1.52, National Institutes of Health, U.S.A.). Neste trabalho o valor da área equivale ao tamanho do espermátóforo. O posicionamento das estruturas e a escala das imagens foram padronizados. Por possuírem forma irregular, foi calculada a área dos espermátóforos, contornando o limite das estruturas de formato único (Figura 1).

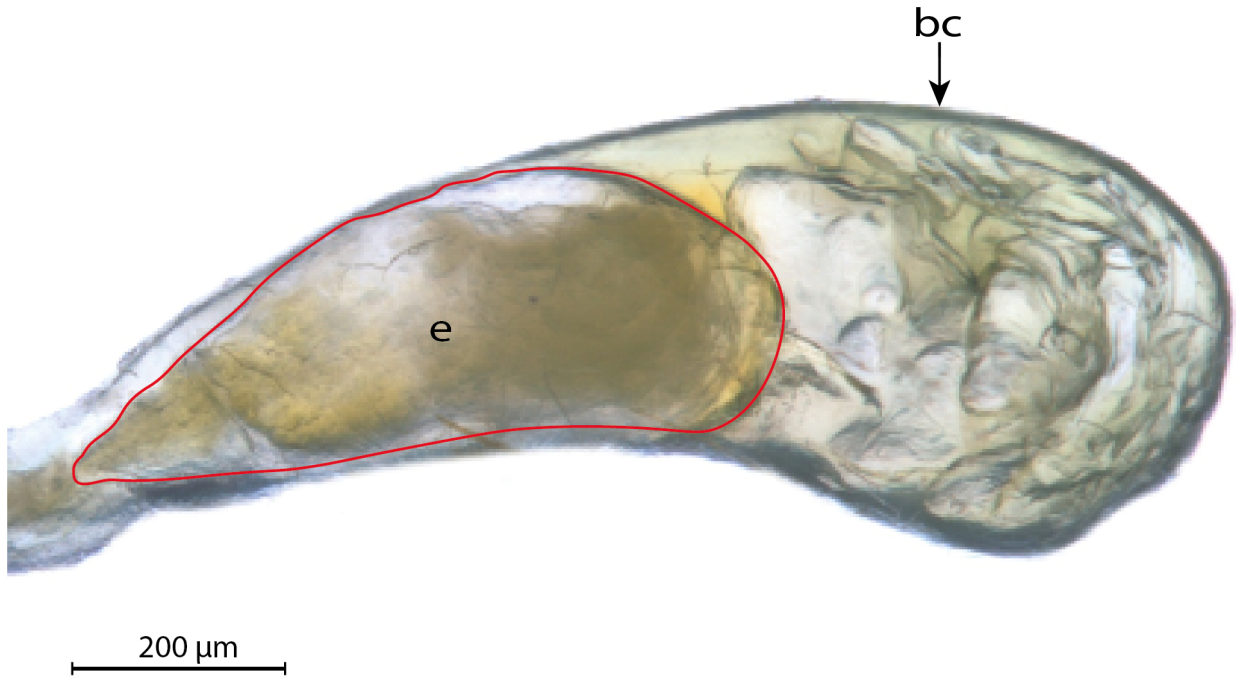


Figura 1: Espermatóforo produzido por um macho de *Tuta absoluta*. Os limites do espermatóforo (e) são indicados pela linha vermelha. bc: bolsa copuladora da fêmea.

2.7 Experimentos

Os experimentos foram realizados em três etapas. No primeiro, denominado controle, selecionamos de forma aleatória pupas sem a pesagem de machos e fêmeas, com a finalidade de obter uma reta geral do tamanho dos espermatóforos da população de laboratório. No segundo e terceiro experimentos analisamos o efeito do peso pupal e período refratário dos machos no tamanho do espermatóforo. Em todos os experimentos foram utilizadas fêmeas virgens com um dia de idade e o peso pupal da fêmea foi padronizado unicamente nos experimentos de peso pupal e período refratário dos machos. Machos e fêmeas foram alimentados *ad libitum* com uma solução de açúcar a 10%.

2.7.1 Controle

Pupas de *T. absoluta* foram retiradas das folhas de tomate, sexadas e separadas em gaiolas, como descrito acima. 24 h após a emergência dos adultos, um macho e uma fêmea foram selecionados de forma aleatória, colocados em gaiolas plásticas e ao término da cópula o espermatóforo foi extraído. Uma nova fêmea foi oferecida ao mesmo macho 24 e 48 h após a primeira cópula. Desta forma foram obtidos espermatóforos de primeira, segunda

e terceira cópula de um mesmo macho, quando este possuía um, dois e três dias de idade, respectivamente. As cópulas consecutivas equivalem a um período refratário de 24 horas. O espermatozóide da primeira cópula foi considerado como proveniente de um macho virgem e os espermatozóides de segunda e terceira cópulas como provenientes de machos acasalados. Nessa etapa foram analisados 31 machos diferentes, com 3 cópulas para cada indivíduo, totalizando 93 espermatozóides analisados.

2.7.2 Peso pupal dos machos

Pupas de *T. absoluta* foram retiradas das folhas de tomate, sexadas e durante a pesagem das pupas, os machos foram classificados em dois grupos: leves e pesados. Os machos pesados tinham um peso pupal igual ou maior a 2,26 mg [peso médio das pupas (2,12 mg) + 25% (0,14 mg) do desvio padrão (0,56 mg)]. Os machos leves tinham um peso pupal igual ou menor a 1,98 mg (peso médio das pupas - 25% do desvio padrão). Os machos tinham um e dois dias de idade na primeira e na segunda cópula, respectivamente. Após o acasalamento, o espermatozóide foi extraído e mensurado. Foram avaliados 45 machos do grupo leve e 43 machos do grupo pesado, totalizando 176 espermatozóides analisados.

2.7.3 Período refratário dos machos

Pupas foram sexadas, pesadas e 24 h após a emergência dos adultos os machos foram acasalados. A massa pupal de machos e fêmeas utilizados nesse experimento, foi padronizada em $2,12 \pm 0,14$ mg e $2,3 \pm 0,16$ mg, respectivamente. Cada intervalo de peso corresponde ao valor da média $\pm 25\%$ do desvio padrão. Seguidamente, os machos foram submetidos de forma aleatória a dois períodos refratários: curto e longo. Para cada período curto os machos aguardavam um intervalo de 24 h até a segunda cópula, e para o período longo, 96 h. Após o acasalamento o espermatozóide era extraído e mensurado. 32 e 46 machos foram utilizados para analisar o período refratário de 24 h e 96 h, respectivamente, totalizando 156 espermatozóides analisados.

3 Análise Estatística

Para comparar as médias do tamanho do espermatóforo entre cópulas no tratamento controle foi realizada uma ANOVA. Análises de regressão linear simples foram realizadas para determinar a relação entre o tamanho do espermatóforo e (I) cópulas consecutivas, (II) peso pupal e (III) período refratário dos machos. Antes das análises de regressão, os resíduos de cada conjunto de dados foram analisados para confirmar a distribuição de erros e a adequação dos modelos. Seguidamente, os modelos de regressão foram contrastados utilizando ANOVA: controle com peso pupal dos machos (leve e pesado) e controle com período refratário (curto e longo). Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa R (R Development Core Team, 2019).

4 Resultados

4.1 Tamanho do espermátóforo e cópulas consecutivas dos machos

A comparação entre cópulas no tratamento controle mostrou uma redução significativa do tamanho do espermátóforo entre a primeira e segunda cópula ($F_{1,60} = 34,92$; $p < 0,001$) porém não houve diferença estatística do tamanho do espermátóforo entre a segunda e terceira cópula ($F_{1,60} = 3,345$; $p = 0,0724$) (Figura 2). Portanto, para método comparativo com os tratamentos seguintes (peso pupal e período refratário dos machos), foram utilizados apenas espermátóforos provenientes da primeira e segunda cópula.

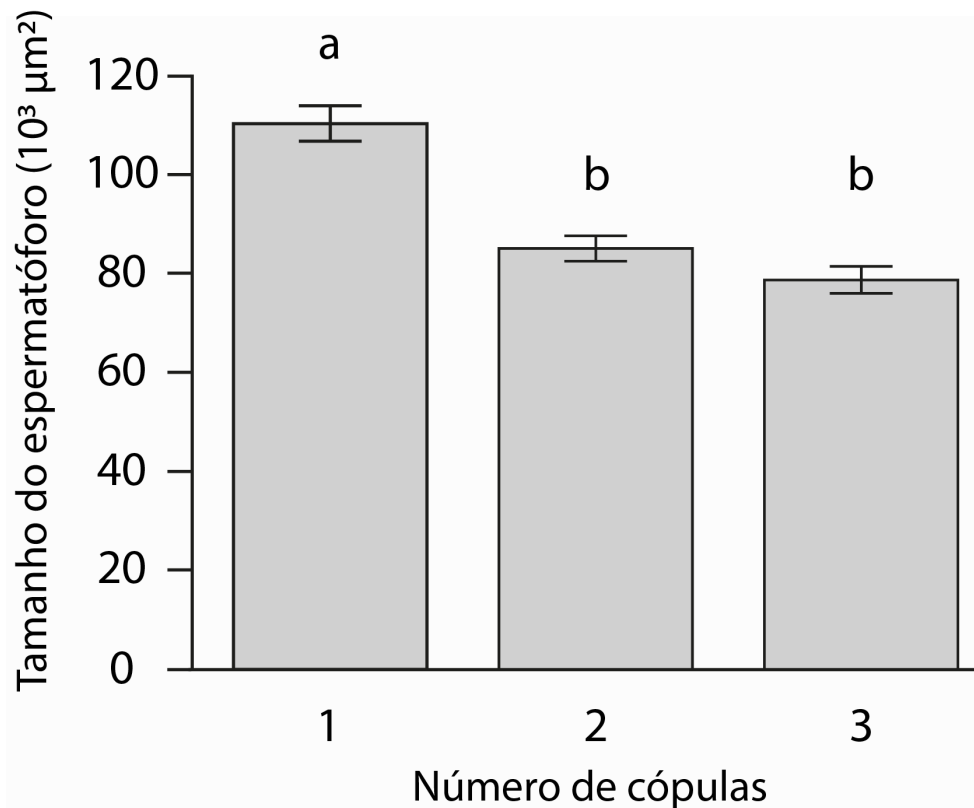


Figura 2: Tamanho dos espermátóforos de machos de *Tuta absoluta* produzidos pelo grupo controle, provenientes da primeira, segunda e terceira cópula. Os valores do tamanho do espermátóforo equivalem a $10^3 \mu m^2$, que corresponde ao valor da área do espermátóforo. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos (ANOVA).

4.2 Relação entre tamanho do espermatóforo e peso dos machos

O tamanho dos espermatóforos decresceu linearmente com o número de cópulas, tanto para machos leves ($F_{1;88} = 21,34$; $p < 0,001$) como para machos pesados ($F_{1;84} = 68,32$; $p < 0,001$) (Figura 3). O comportamento geral dos modelos mostrou que as retas eram paralelas, porém o tamanho dos espermatóforos diferiu entre os modelos. Os machos pesados produziram espermatóforos maiores em relação aos produzidos pelos machos leves ($F_{1;174} = 82,35$; $p < 0,001$) e machos do grupo controle ($F_{1;146} = 3,98$; $p = 0,0478$). Os espermatóforos produzidos pelos machos controle foram maiores em comparação aos espermatóforos produzidos pelos machos leves ($F_{1;150} = 45,15$; $p < 0,001$).

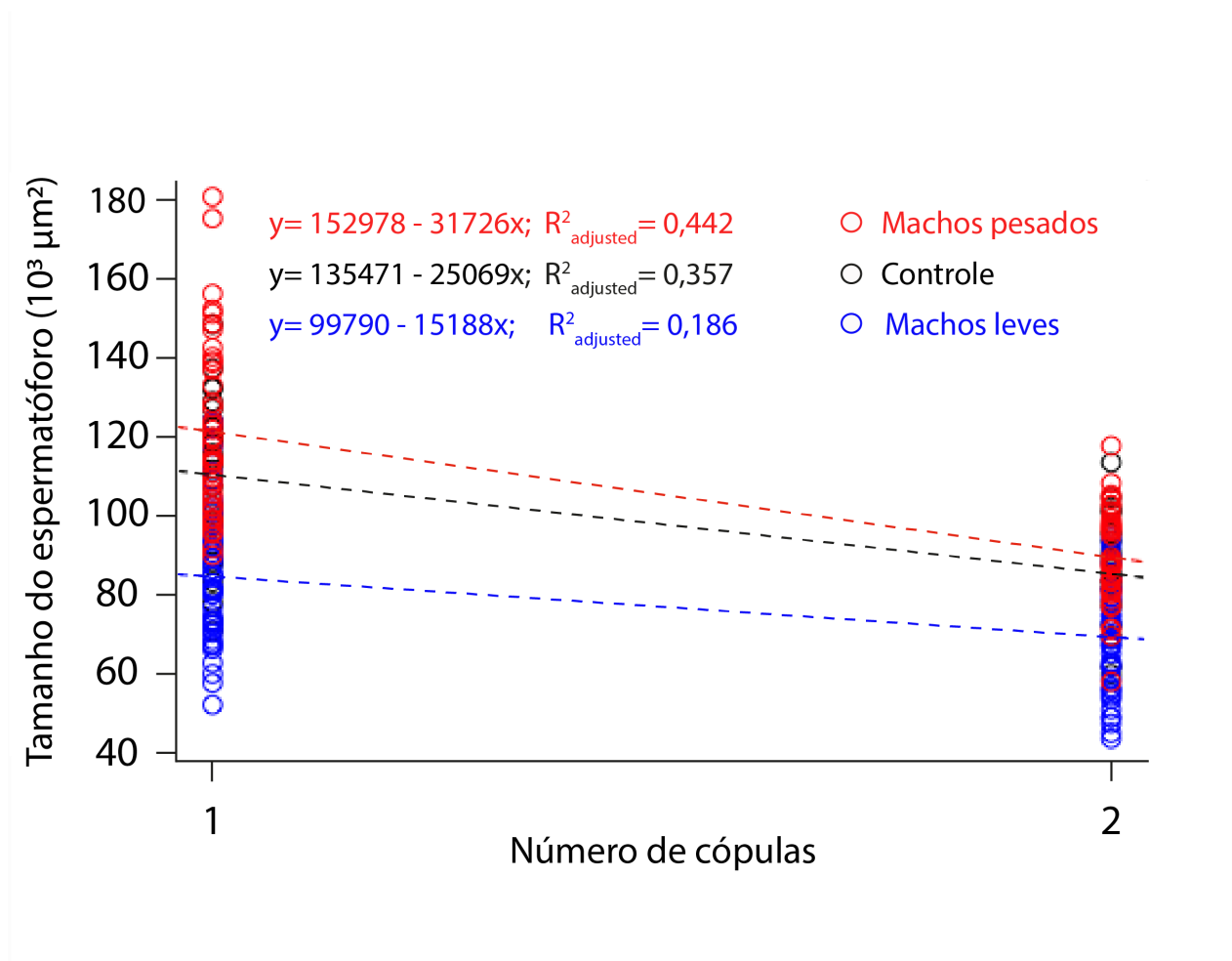


Figura 3: Relação entre o tamanho dos espermatóforos produzidos por machos leves, pesados e indivíduos do grupo controle de *Tuta absoluta*, provenientes da primeira e segunda cópula e representadas por três retas distintas. Os valores do tamanho do espermatóforo equivalem a $10^3 \mu m^2$, que corresponde ao valor da área do espermatóforo.

4.3 Relação entre tamanho do espermátóforo e o período refratário dos machos

O tamanho dos espermátóforos decresceu no período refratário curto (24 h) ($F_{1;62} = 50,76$; $p < 0,001$), porém aumentou com um longo (96 h) intervalo entre cópulas ($F_{1;90} = 69,73$; $p < 0,001$) (Figura 4). A comparação entre os modelos mostrou que o comportamento geral dos modelos controle e período refratário curto eram iguais, uma vez que seus coeficientes angulares não diferiram estatisticamente ($F_{1;124} = 3,31$; $p = 0,0712$). Portanto os valores dos modelos controle e período refratário curto foram juntados e contrastados com o modelo do período refratário longo, sendo encontrada uma interação com diferenças estatísticas entre os modelos ($F_{3;214} = 62,54$; $p < 0,001$).

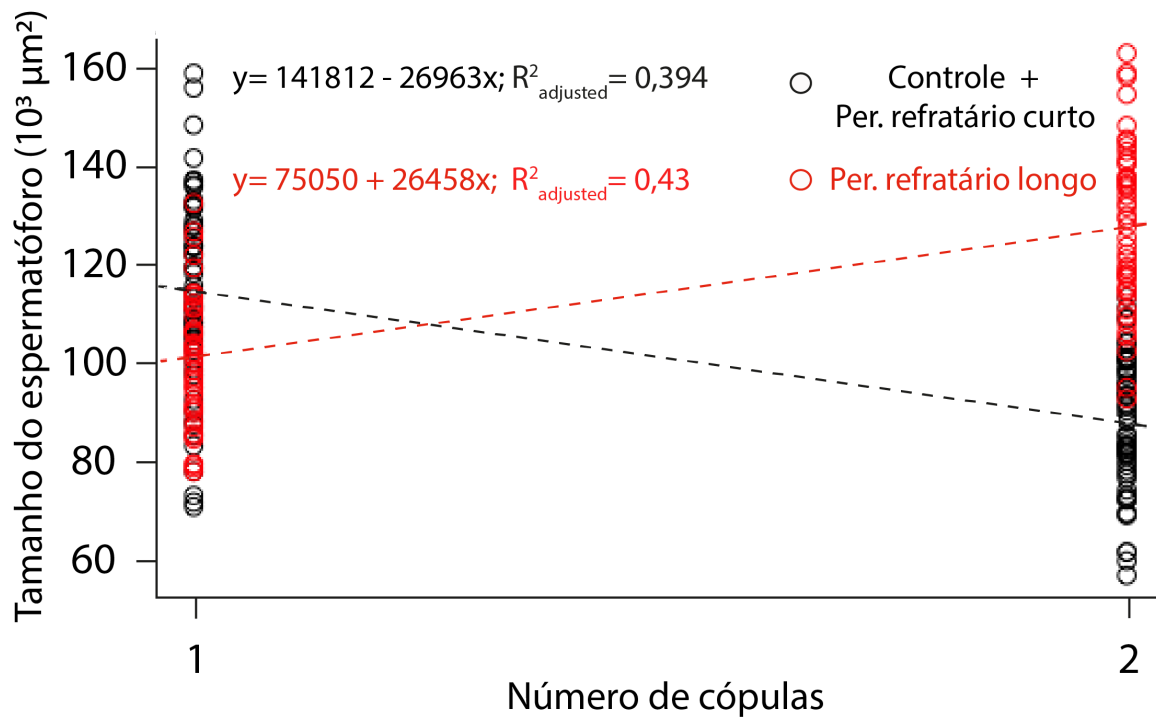


Figura 4: Relação entre o tamanho dos espermátóforos produzidos por machos de *Tuta absoluta* do grupo controle e machos submetidos a diferentes períodos refratários, provenientes da primeira e segunda cópula. Os modelos controle e período refratário curto não diferiram estatisticamente, portanto seus valores foram unidos em uma reta. Os valores do tamanho do espermátóforo equivalem a $10^3 \mu\text{m}^2$, que corresponde ao valor da área do espermátóforo.

5 Discussão

O tamanho do espermátóforo produzido por machos de *T. absoluta* diminuiu tanto no grupo controle como nos machos leves e pesados, quando submetidos a cópulas com intervalo de 24 h (Figura 3). Em Lepidoptera a produção do ejaculado é custosa (Dewsbury, 1982), portanto, após múltiplos acasalamentos deve haver um declínio no desempenho reprodutivo dos machos (Muller *et al.*, 2016). Assim a quantidade de esperma transferido para fêmeas durante cópulas consecutivas pode ficar limitado (Marcotte *et al.*, 2005), e influenciar o sucesso reprodutivo futuro (Torres-Vila & Jennions, 2005), ocasionando a redução no tamanho do espermátóforo, como mostram nossos resultados. A análise mostra uma relação entre peso pupal dos machos de *T. absoluta* e tamanho do espermátóforo. Machos leves produzem espermátóforos menores e machos pesados produzem espermátóforos maiores, entretanto machos do grupo controle produziram espermátóforos de tamanho intermediário entre os machos leves e pesados. Resultados semelhantes sobre influência do peso pupal dos machos no tamanho do espermátóforo foram encontrados por Royer & McNeil (1993); Delisle & Bouchard (1995); Duploux & Hanski (2015); Duploux *et al.* (2018) analisando indivíduos das famílias Pyralidae, Tortricidae e Nymphalidae.

A aptidão para acasalamento de um indivíduo depende do balanço entre os custos e benefícios do acasalamento que irão variar de acordo com a qualidade reprodutiva do parceiro escolhido (Muller *et al.*, 2016). Fêmeas de *Lobesia botrana* Denis & Schiffermüller (Tortricidae) apresentaram maior interesse de acasalamento (tempo de chamamento) por machos virges em relação aos que já haviam acasalado algumas vezes (Muller *et al.*, 2016). Pistas olfativas podem estar atreladas à percepção da qualidade e escolha dos parceiros. Phelan & Baker (1986) demonstraram que machos leves de *Ephestia elutella* Hübner (Pyralidae) produzem um composto do feromônio sexual em menor proporção, sendo que 50% dos machos leves foram rejeitados pelas fêmeas em relação a apenas 8% de machos pesados. As fêmeas acasaladas com machos pesados tiveram sua fecundidade aumentada, gerando indivíduos maiores e com maior probabilidade de acasalarem. Associado a isso, foi notável a maior rejeição dos machos leves de *T. absoluta*, em comparação aos machos pesados (observações pessoais).

As retas de regressão do tamanho dos espermátóforos produzidos pelos machos pesados, leves e controle não se sobrepõem e foram estatisticamente diferentes entre si. Portanto, poderiam ser empregadas para inferir o estado reprodutivo de machos de *T. absoluta* prove-

nientes do campo. No entanto, deve-se considerar que fatores biológicos e ambientais também influenciam o peso dos machos em campo limitando o uso desta metodologia. Fatores biológicos como a competição intraespecífica por alimento e/ou espaço podem afetar a aquisição de alimentos pelas lagartas e alterar o peso pupal dos machos (Dai *et al.*, 2019). Pereyra (2002) observou um decréscimo significativo no peso pupal de *T. absoluta* quando se aumentava a densidade de ovos por folíolo. Fatores como a qualidade do alimento larval também influenciam o peso das pupas e adultos em Lepidoptera (Delisle & Bouchard, 1995; Rodrigues & Moreira, 2004; Xue *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2016). Krechmer & Foerster (2017) analisando diferentes cultivares comerciais de tomate, observaram que lagartas de *T. absoluta* alimentadas com a variedade Santa Clara, quando adultos, apresentaram maior comprimento de asas, parâmetro comumente usado para medir o tamanho de insetos adultos (Awmack & Leather, 2002). Variações ambientais como as flutuações de temperatura em campo também podem afetar o peso dos insetos (Kamata & Igarashi, 1995; Rodrigues & Moreira, 2004). Além disso, a utilização de produtos químicos como inseticidas é mais um fator que pode alterar o peso dos mesmos (Deecher *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 2008).

As evidências mostradas anteriormente indicam que distintos fatores podem modificar o peso pupal dos indivíduos em campo, e conseqüentemente o tamanho do espermatóforo que será produzido. Em laboratório, a população de *T. absoluta* utilizada nos experimentos foi criada com temperatura e umidade controladas, abundância de folhas para alimentação, folhas novas, grandes e sadias para oviposição dos adultos, assim como solução açucarada *ad libitum* para alimentação dos mesmos. Portanto, se a população presente no campo for constituída por uma mistura de indivíduos de pesos diferentes, a reta controle talvez possa representar como se comporta essa população. Caso os indivíduos sejam majoritariamente leves ou pesados, possivelmente as retas dos espermatóforos produzidos por machos leves ou pesados sejam mais adequadas para representar a população de campo.

Os períodos refratários de 24 e 96 h entre cópulas dos machos de *T. absoluta* geraram resultados opostos no tamanho do espermatóforo (Figura 4). O período refratário curto promoveu uma diminuição no tamanho do espermatóforo. Espermatóforos produzidos pelo grupo controle não diferiram estatisticamente do período refratário curto, resultado possivelmente associado ao mesmo intervalo de 24 h entre cópulas. Em Lepidoptera, o número de cópulas realizadas pelos machos durante sua vida influencia o sucesso reprodutivo dos mesmos (Trivers, 1972), portanto, um atraso entre essas cópulas pode ser custoso. Lee *et al.* (2014) observaram casais de *T. absoluta* copulando todos os dias durante 10 dias, podendo chegar até 15 cópulas, já (Silva, 2008) encontrou uma média de 7 acasalamentos para os machos desta espécie. Durante a realização dos experimentos, os machos de *T. absoluta* tentaram frequentemente acasalar quando lhes foram oferecidas fêmeas em 2 ou 3 dias consecutivos,

independente do peso ou intervalo entre cópulas (observações pessoais). Em *T. absoluta* os machos são poligínicos e as fêmeas poliândricas (Lôbo, 2005), ambos os sexos possuem curto período refratário de um dia (Lee *et al.*, 2014) e possuem vida adulta curta de aproximadamente 7-10 dias (Coelho & França, 1987). O anterior sugere que os machos de *T. absoluta* devem passar maior parte do tempo ativo em busca de fêmeas receptivas. Portanto, as retas controle e de período refratário curto produzidas em laboratório possivelmente devem refletir o que ocorre com maior frequência em campo.

O período refratário longo promoveu um aumento no tamanho do espermatozóide. A cópula esgota as reservas de esperma e fluidos acessórios dos machos, sendo necessário um período refratário para que se possam acumular essas substâncias novamente (Drummond, 1984). O aumento do tamanho do espermatozóide devido a um longo intervalo entre cópulas (96 h) sugere o reabastecimento dessas reservas, provavelmente pelo alimento fornecido *ad libitum* (Watanabe & Hirota, 1999; Duploux *et al.*, 2018) ou pela liberação periódica de esperma do testículo e seu acúmulo no ducto ejaculatório (Giebultowicz *et al.*, 1988). Em nossos resultados, um espermatozóide de segunda cópula produzido por um macho submetido a um período refratário de 96 horas pode equivaler a um espermatozóide de primeira cópula e ser erroneamente atribuído a um macho virgem. Porém a ocorrência dessa situação em campo parece pouco provável devido aos fatores relacionados à biologia reprodutiva de *T. absoluta*: ambos os sexos reacasalam, possuem vida adulta e período refratário curtos, entre outros. Portanto a alta capacidade e frequência reprodutiva dos indivíduos, além do pequeno período de tempo para tal nos sugerem que a reta de regressão do tamanho dos espermatozoides produzidos em um longo período refratário parece pouco provável de ocorrer em campo.

Este trabalho promoverá melhor entendimento sobre as falhas no controle da traça-do-tomateiro, possibilitando estabelecer novas estratégias para conter ou reduzir os danos causados por essa praga tão relevante no Brasil e no mundo, assim como compreender características de sua biologia reprodutiva que podem alterar o tamanho do espermatozóide que o macho transfere para a fêmea durante a cópula.

6 Conclusões

Os resultados obtidos ao longo dos experimentos sugerem que a medida da área é um parâmetro consistente para inferir o tamanho dos espermatozoides produzidos por machos de *T. absoluta* e fornecem evidências que podem permitir determinar o estado reprodutivo dos mesmos. Cópulas consecutivas ocasionam uma diminuição do tamanho do espermatozoide, independente do peso dos machos. Machos pesados produzem espermatozoides maiores em relação aos machos leves. O período refratário influencia o tamanho do espermatozoide, sendo o espermatozoide menor com períodos refratários curtos (24 h) e maior com períodos refratários longos (96 h). Como modelo de estudo utilizamos a espécie *T. absoluta*, porém, sugerimos que esta abordagem pode ser útil para produzir curvas padrão em distintas espécies de insetos e em outros sistemas biológicos onde os machos transferem espermatozoides para as fêmeas durante a cópula.

7 Referências

- Awmack, C. S. & Leather, S. R. (2002). Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annual Review of Entomology*, 47, 817–844.
- Bancroft, J. D. & Gamble, M. (2008). *Theory and practice of histological techniques*. Elsevier Health Sciences.
- Boggs, C. L. (1981). Selection pressures affecting male nutrient investment at mating in heliconiine butterflies. *Evolution*, 35, 931–940.
- Boggs, C. L. & Gilbert, L. E. (1979). Male contribution to egg production in butterflies: evidence for transfer of nutrients at mating. *Science*, 206, 83–84.
- Caparros Megido, R.; Haubruge, E. & Verheggen, F. J. (2013). Pheromone-based management strategies to control the tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 17, 475–482.
- Cocco, A.; Deliperi, S.; Delrio, G. *et al.* (2012). Potential of mass trapping for *Tuta absoluta* management in greenhouse tomato crops using light and pheromone traps. *Integrated Control in Protected Crops, Mediterranean Climate IOBC-WPRS Bulletin*, 80, 319–324.
- Coelho, M. d. C. & França, F. H. (1987). Biologia, quetotaxia da larva e descrição da pupa e adulto da traça-do-tomateiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 22, 129–135.
- Dai, X.; Xu, J.; Guo, Q.; Lai, S.; Liu, P.; Fan, J. & Tang, P. (2019). Density effect and intraspecific competition in a leaf-mining moth on bamboo leaves. *Journal of Forestry Research*, 30, 689–697.
- Deecher, D. C.; Brezner, J. & Tanenbaum, S. W. (1990). Sublethal effects of avermectin and milbemycin on the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Journal of Economic Entomology*, 83, 710–714.
- Delisle, J. & Bouchard, A. (1995). Male larval nutrition in *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae): an important factor in reproductive success. *Oecologia*, 104, 508–517.
- Dewsbury, D. A. (1982). Ejaculate cost and male choice. *The American Naturalist*, 119, 601–610.

- Drummond, B. A. (1984). *Multiple mating and sperm competition in the Lepidoptera*, Academic Press, Inc. (London) Ltd., chap. 9. pp. 291–370.
- Duploux, A. & Hanski, I. (2015). Small spermatophore size and reduced female fitness in an isolated butterfly population. *Ecological Entomology*, 40, 167–174.
- Duploux, A.; Woestmann, L.; Zamorano, J. G. & Saastamoinen, M. (2018). Impact of male condition on his spermatophore and consequences for female reproductive performance in the Glanville fritillary butterfly. *Insect Science*, 25, 284–296.
- Giebultowicz, J. M.; Bell, R. A. & Imberski, R. B. (1988). Circadian rhythm of sperm movement in the male reproductive tract of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Journal of Insect Physiology*, 34, 527–532.
- Guedes, R. N. C. & Picanço, M. C. (2012). The tomato borer *Tuta absoluta* in South America: pest status, management and insecticide resistance. *EPPO Bulletin*, 42, 211–216.
- Haji, F. N. P. (1982). Nova praga do tomateiro no vale do Salitre, no Estado da Bahia. *EMBRAPA-CPATSA. Comunicado Técnico*.
- He, Y. & Tsubaki, Y. (1992). Variation in spermatophore size in the armyworm, *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae) in relation to rearing density. *Applied Entomology and Zoology*, 27, 39–45.
- Jones, O. T. (1998). *Practical applications of pheromones and other semiochemicals*, Springer Science & Business Media, chap. 3. pp. 251–355.
- Kamata, N. & Igarashi, M. (1995). Relationship between temperature, number of instars, larval growth, body size, and adult fecundity of *Quadricalcarifera punctatella* (Lepidoptera: Notodontidae): cost-benefit relationship. *Environmental Entomology*, 24, 648–656.
- Krechemer, F. S. & Foerster, L. A. (2017). Development, reproduction, survival, and demographic patterns of *Tuta absoluta* (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae) on different commercial tomato cultivars. *Neotropical Entomology*, 46, 694–700.
- Lee, M. S.; Albajes, R. & Eizaguirre, M. (2014). Mating behaviour of female *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): polyandry increases reproductive output. *Journal of Pest Science*, 87, 429–439.
- Lôbo, A. P. (2005). *Interfêrencia de componentes do feromônio sexual, densidades de armadilhas e do estado reprodutivo de machos de Tuta absoluta (Meyrick, 1917) na coleta massal*. Ph.D. thesis, Universidade Federal de Lavras (Brasil).

- Marcotte, M.; Delisle, J. & McNeil, J. N. (2005). Impact of male mating history on the temporal sperm dynamics of *Choristoneura rosaceana* and *C. fumiferana* females. *Journal of Insect Physiology*, 51, 537–544.
- Marcotte, M.; Delisle, J. & McNeil, J. N. (2007). Effects of different male remating intervals on the reproductive success of *Choristoneura rosaceana* males and females. *Journal of Insect Physiology*, 53, 139–145.
- Muller, K.; Thiéry, D.; Motreuil, S. & Moreau, J. (2016). What makes a good mate? Factors influencing male and female reproductive success in a polyphagous moth. *Animal Behaviour*, 120, 31–39.
- Pereyra, P. C. (2002). Evidencia de competencia intraespecífica en estadios larvales tempranos de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Ecología Austral*, 12, 143–148.
- Phelan, P. L. & Baker, T. C. (1986). Male-size-related courtship success and intersexual selection in the tobacco moth, *Ephestia elutella*. *Experientia*, 42, 1291–1293.
- Prasad, Y. G. & Prabhakar, M. (2012). *Pest monitoring and forecasting*, CABI, chap. 3. pp. 41–57.
- Rodrigues, D. & Moreira, G. R. P. (2004). Seasonal variation in larval host plants and consequences for *Heliconius erato* (Lepidoptera: Nymphalidae) adult body size. *Austral Ecology*, 29, 437–445.
- Royer, L. & McNeil, J. N. (1993). Male investment in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae): impact on female longevity and reproductive performance. *Functional Ecology*, 7, 209–215.
- Silva, S. S. (2008). *Fatores da biologia reprodutiva que influenciam o manejo comportamental de Tuta absoluta (Meyrick)(Lepidoptera: Gelechiidae)*. Master's thesis, Universidade Federal Rural de Pernambuco (Brasil).
- Speridião, S. V. E. (2020). *Efeito da qualidade do macho na resposta ao feromônio sexual em Tuta absoluta*. Master's thesis, Universidade Federal de Viçosa (Brasil).
- Svärd, L. (1985). Paternal investment in a monandrous butterfly, *Pararge aegeria*. *Oikos*, 45, 66–70.
- Thornhill, R. (1976). Sexual selection and paternal investment in insects. *The American Naturalist*, 110, 153–163.

- Torres-Vila, L. M. & Jennions, M. D. (2005). Male mating history and female fecundity in the Lepidoptera: do male virgins make better partners? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 57, 318–326.
- Trivers, R. L. (1972). *Parental investment and sexual selection*, Chicago, IL.: Aldine Publishing Company, chap. 7. pp. 136–179.
- Wang, D.; Gong, P.; Li, M.; Qiu, X. & Wang, K. (2008). Sublethal effects of spinosad on survival, growth and reproduction of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science*, 65, 223–227.
- Watanabe, M. & Hirota, M. (1999). Effects of sucrose intake on spermatophore mass produced by male swallowtail butterfly *Papilio xuthus* L. *Zoological Science*, 16, 55–61.
- Xue, M.; Pang, Y. H.; Wang, H. T.; Li, Q. L. & Liu, T. X. (2010). Effects of four host plants on biology and food utilization of the cutworm, *Spodoptera litura*. *Journal of Insect Science*, 10, 14–28.