

ANA CRISTINA RODRIGUES DA CRUZ

**EFEITO DO MILHO TRANSGÊNICO DE GENE DUPLO NA CAPACIDADE
REPRODUTIVA DE MACHOS RESISTENTES E SUSCETÍVEIS DE *Spodoptera
frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

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

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

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

T

C957e
2023
Cruz, Ana Cristina Rodrigues, 1997-
Efeito do milho transgênico de gene duplo na capacidade reprodutiva de machos resistentes e suscetíveis de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) / Ana Cristina Rodrigues Cruz. – Viçosa, MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (27 f.): il.

Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Entomologia, 2023.

Referências bibliográficas: f. 24-27.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.671>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Spodoptera frugiperda* - Espermatozoides. 2. *Bacillus thuringiensis*. 3. Milho - Doenças e pragas - Controle biológico. I. Lima, Eraldo Rodrigues de, 1960-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de Pós-Graduação em Entomologia. III. Título.

CDD 22. ed. 595.78

ANA CRISTINA RODRIGUES DA CRUZ

**EFEITO DO MILHO TRANSGÊNICO DE GENE DUPLO NA CAPACIDADE
REPRODUTIVA DE MACHOS RESISTENTES E SUSCETÍVEIS DE *Spodoptera
frugiperda* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

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: 31 de julho de 2023

Assentimento:



Ana Cristina Rodrigues da Cruz
Autora



Eraldo Rodrigues de Lima
Orientador

*Dedico este trabalho aqueles que acreditam
na importância de sua pesquisa por mais
simples que seja, sabendo que até os
maiores trabalhos começaram pequenos.*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos à Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, da mesma forma que agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Quero agradecer também a dona Giovanna, minha mãe e amiga e meus irmãos e Michellen, por todo apoio e incentivo a começar uma nova vida longe, só nós sabemos o quanto foi difícil chegar até aqui. Aproveito para agradecer ao meu pai e irmã que não estão mais presentes em terra, mas sempre viram o melhor de mim.

Agradeço aos meus queridos orientadores do Departamento de Entomologia, professor Eraldo Lima e professora Maria Goreti, por todo apoio, todo conselho e amizade, creio que as intenções sempre foram as melhores. Aos meus amigos do Laboratório de semioquímicos e comportamento de insetos, Ane, Ká, Natália, Jô e Lucas, sem vocês ao meu lado os dias seriam mais difíceis e obrigada por toda ajuda na minha caminhada do mestrado. O laboratório de Ultraestrutura Celular do Departamento de Biologia que não poderia ficar de fora nos meus agradecimentos, principalmente Mauricio, Dayvson, Maísa, Lilito, Vinicius, Ana, Maura, Glenda, Paulo e o professor Lino, por todo aprendizado, amizade, café e por suportarem minhas piadinhas, muito obrigada.

Aos meus amigos que não fazem parte desses laboratórios também merecem meus agradecimentos, em especial a Maria, Pedro, João, Diego, Keminy, Faultier, Rafael e meus amiguinhos da t9, vocês me proporcionaram muitas risadas e apoio emocional em momentos difíceis, obrigada.

Por último e não menos importante agradeço aos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho sair, seja no apoio profissional ou no emocional, esse trabalho é nosso.

“E um dia os homens descobrirão que esses discos voadores estavam aqui apenas estudando a vida dos insetos.”

(Mário Quintana)

RESUMO

CRUZ, Ana Cristina Rodrigues da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Efeito do milho transgênico de gene duplo na capacidade reprodutiva de machos resistentes e suscetíveis de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**. Orientador: Eraldo Rodrigues de Lima.

Spodoptera frugiperda, lagarta do cartucho, é a principal praga que ataca a cultura do milho e a tecnologia Bt (*Bacillus thuringiensis*) é a principal ferramenta usada para controle desses insetos. Até então sabe-se que *S. frugiperda* resistentes à toxina Bt apresentam custos no desenvolvimento, na fertilidade e na fecundidade, porém não se sabe como esse custo afeta diretamente parâmetros reprodutivos de machos, como os testículos e espermatozoides. Os machos de *Spodoptera frugiperda* possuem os testículos fusionados e produzem dois tipos diferentes de espermatozoides, eupirenes (nucleados) e apirenes (anucleados). Portanto, nosso trabalho teve como objetivo avaliar as possíveis alterações que o custo de aptidão podem ocasionar a produção de espermatozoides eupirenes de *S. frugiperda* resistentes e suscetíveis, através de uma avaliação histofisiológica e aferição do tempo de cópula. Para avaliar a histofisiologia (espermatozoides eupirenes e apirenes), foram feitas lâminas histológicas do testículo de indivíduos suscetíveis e resistentes coradas com DAPI. As imagens obtidas dos feixes e a montagem total dos testículos foram analisadas através do *software* Adobe Photoshop 2022. Para avaliar o tempo de cópula, utilizamos um cronômetro. Nossos resultados mostraram que o número de feixes eupirenes foi maior no testículo dos machos suscetíveis comparado com os resistentes. Já o tempo de cópula foi maior em insetos resistentes. Nossos resultados podem fornecer informações adicionais sobre a histofisiologia testicular de *S. frugiperda*. E além disso, mostra que existe um possível custo de aptidão relacionado a produção de espermatozoides eupirenes em insetos resistentes, que deve ser investigado.

Palavras-chave: *Bacillus thuringiensis*. Custo de aptidão. Espermatozoides. Eupirenes. Testículos.

ABSTRACT

CRUZ, Ana Cristina Rodrigues da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2023. **Effect of double-gene transgenic corn on the reproductive capacity of resistant and susceptible males of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)**. Advisor: Eraldo Rodrigues de Lima.

Spodoptera frugiperda, fall armyworm, is the main pest that attacks corn crops and Bt technology (*Bacillus thuringiensis*) is the main tool used to control these insects. Until now, it is known that *S. frugiperda* resistant to Bt toxin present costs in development, fertility and fecundity, but it is not known how this cost directly affects male reproductive parameters, such as testes and sperm. *Spodoptera frugiperda* males have fused testicles and produce two different types of sperm, eupyrenes (nucleated) and apyrenes (anucleated). Therefore, our work aimed to evaluate the possible changes that the fitness cost may cause in the production of resistant and susceptible eupyrene *S. frugiperda* sperm, through a histophysiological assessment and measurement of copulation time. To evaluate histophysiology (eupyrene and apyrene spermatozoa), histological slides were made from the testis of susceptible and resistant individuals stained with DAPI. The images obtained from the bundles and the total assembly of the testicles were analyzed using Adobe Photoshop 2022 software. To evaluate the copulation time, we used a stopwatch. Our results showed that the number of eupyrene bundles was greater in the testis of susceptible males compared to resistant males. Copulation time was longer in resistant insects. Our results may provide additional information about the testicular histophysiology of *S. frugiperda*. Furthermore, it shows that there is a possible fitness cost related to the production of eupyrene sperm in resistant insects, which should be investigated.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*. Fitness cost. Sperm. Eupirenes. Testicles.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3. RESULTADOS	16
4. DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS	24

1. INTRODUÇÃO

Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) conhecida como lagarta do cartucho, é a principal praga que ataca a cultura do milho e atualmente, o milho transgênico, que expressa toxinas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) é a tecnologia mais utilizada para seu controle (FARIAS *et al.*, 2014; KENIS *et al.*, 2022). Porém, o uso constante do milho *Bt* sem implementar a área de refúgio, deu origem a insetos de *S. frugiperda* resistentes (RR) a essa proteína, tornando-se uma ameaça ao uso dessa tecnologia (SANTOS-AMAYA *et al.*, 2016). Essa área de refúgio refere-se ao plantio de milho não *Bt*, com o objetivo de diminuir a pressão de seleção, mantendo populações de insetos suscetíveis (SS) a essa tecnologia no campo, aumentando assim, a chance de insetos resistentes da praga-alvo se acasalarem com esses insetos SS. Desse acasalamento podem nascer heterozigotos recessivos (RS), que não sobrevivem no milho *Bt* (OSTILE *et al.*, 1997).

Para tentar solucionar o problema da resistência, foram lançadas sementes que expressam outras toxinas e até mesmo toxinas duplas como a cry1a.105 + cry2ab2 que chamamos de “genes piramidados” (SANTOS-AMAYA *et al.*, 2015; BERNARDI *et al.*, 2016). Porém, em campo, já há relatos de populações de *S. frugiperda* resistentes a essas novas toxinas lançadas em cultivos de milho *Bt* (CHANDRASENA *et al.*, 2018). Essa perda progressiva de susceptibilidade às toxinas *Bt*, em populações de insetos, dá-se pela ocorrência de altas taxas reprodutivas, alta polifagia e abundante número de gerações por ano (GASSMANN; CARRIERE; TABASHNIK, 2009).

Essa resistência pode ter um custo chamado de adaptativo, *fitness cost* (GASSMANN *et al.*, 2009). Se existir um custo adaptativo para esses insetos, ao investir em resistência, esses insetos podem deixar de investir em outros parâmetros importantes como fecundidade e fertilidade e isso pode acarretar em um retardo na evolução da resistência, uma vez que esses insetos podem diminuir sua descendência (CARRIÈRE *et al.*, 2006; GASSMANN *et al.*, 2009). Por exemplo, fêmeas resistentes, no geral, têm menor fecundidade e fertilidade do que as suscetíveis, assim como diferenças em comportamento reprodutivo e na fisiologia (ZHAO *et al.*, 2003; CARRIÈRE *et al.*, 2006; GASSMANN; CARRIÈRE; TABASHNIK, 2009; ZHANG *et al.*, 2014).

Já os machos, podem transferir para a fêmea uma estrutura chamada espermatóforo contendo grandes quantidades de espermatozoides apirenes (anucleados) e eupirenes (nucleados) (THORNHILL, 1976; BOGGS; GILBERT, 1979; DRUMMOND, 1984). Esses insetos podem passar por um processo chamado de espermatogênese dicotômica, no qual compõe-se dois tipos diferentes de espermatozoides (JAMIESON, 1987; SWALLOW; WILKINSON, 2002). Um deles, com núcleo, que chamamos de eupirenes e são capazes de fecundar os ovos e gerar descendentes férteis e outros anucleados denominados apirenes, que são inférteis (MANCINI; DOLDER, 2004). Os dois tipos de espermatozoides alcançam igualmente a espermateca das fêmeas (FRIEDLÄNDER; GITAY, 1972). Embora os apirenes sejam inférteis, estudos relatam que mais de 50% desses espermatozoides são transferidos para o trato feminino, o que pode indicar que os apirenes estão associados a competição espermática (JAMIESON, 1987; FRIEDLÄNDER, 1997; FRANÇA; BÃO, 2000; MANCINI; DOLDER, 2004).

A produção de espermatozoides, também, pode ser afetada pela resistência, como mostraram Carrière *et al* (2006), em que machos de Lepidoptera como *Pectinophora gossypiella* resistentes à proteína Cry1Ac transferiram uma quantidade de espermatozoides menor em relação aos machos suscetíveis. Adicionalmente, HIGGINSON *et al* (2005) mostraram que machos suscetíveis dessa mesma espécie copulam mais que os resistentes, sendo que os resistentes chegam primeiro para cópula e tem uma menor fertilidade em comparação aos machos suscetíveis. Portanto, o custo adaptativo, também, pode afetar a capacidade reprodutiva dos machos. A própria produção de espermatozoides podem apresentar um custo notável para os machos, limitando assim sua oferta para as fêmeas (DEWSBURY 1982; NAKATSUR; KRAMER, 1982; OLSSON; MADSEN; SHINE, 1997).

Além disso, machos de Lepidoptera possuem dois testículos, onde podem permanecer separados ou fundir-se em uma única estrutura (REINECKE *et al.*, 1983). O sistema reprodutor masculino dos insetos da ordem Lepidoptera, especificamente os testículos, podem se diferenciar entre famílias ou até mesmo entre as espécies (REINECKE *et al.*, 1983). Algumas espécies, como *Bombyx mori*, podem ter dois testículos separados e cada um possuir 4 folículos (ZHANG *et al.*, 2014), além disso, espécies do gênero *Saturnia*, podem possuir dois testículos esféricos, separados e em cada um, possuir 3 folículos testiculares (KATSUNO,

1989) Já em *Diatraea saccharalis* (BILHA; BRANCALHÃ; CONTE, 2014) os testículos podem estar fundidos em uma única estrutura ou organizados isoladamente, mas sem fundir-se entre si.

Sabe-se que a resistência pode afetar não só o desenvolvimento dos insetos, como também características reprodutivas dos mesmos. E também que custos relacionados com essas características reprodutivas podem influenciar o número de descendentes no campo e desacelerar o processo de resistência. Até aqui a literatura carece de informações que comparem a capacidade e biologia reprodutiva de machos resistentes e suscetíveis. Sendo assim, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar se existe custo adaptativo em insetos resistentes de *S. frugiperda* a proteína *Bt* de gene duplo Cry1A.105 + Cry2Ab e como isso pode afetar a produção de espermatozoides eupirenes dos machos suscetíveis e resistentes através de uma avaliação da histofisiologia reprodutiva.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Insetos

Os insetos de *Spodoptera frugiperda* resistentes (RR) e suscetíveis (SS) do presente trabalho, foram adquiridos pelo Laboratório de Interação Inseto-Planta da Universidade Federal de Viçosa. A população de RR resistente às toxinas Cry1.105 + Cry2Ab foi obtida através de uma seleção em laboratório da população de SS suscetível às mesmas toxinas, que foi coletada em lavouras de milho em Luís Eduardo Magalhães no estado da Bahia (Brasil) em 2013. A cada sete gerações as lagartas da população de RR foram alimentadas nas folhas de plantas de milho de variedade *Bt* que expressam as toxinas Cry1A.105 + Cry2Ab (SANTOS-AMAYA *et al.*, 2015) para conferir a resistência. Em laboratório os insetos foram criados em ambiente controlado com temperatura do ar de $27 \pm 3^\circ \text{C}$, $70 \pm 15\%$ UR e fotoperíodo 14:10 h L/D (DE SOUZA RIBAS *et al.*, 2022).

Os adultos de *S. frugiperda* foram colocados em gaiolas de policloreto de vinilo (PVC) (30 cm de altura x 20 cm de diâmetro) recobertas internamente com papel sulfite, onde ocorreu a postura de ovos, as gaiolas foram trocadas a cada 2 dias, assim como a coleta de ovos. Para alimentação foi disponibilizado algodão embebido em uma solução de 500 ml de água filtrada, açúcar a 10% (50 mg) e 5% (5 mg) de ácido ascórbico. Os ovos coletados, foram armazenados em potes plásticos (500 mL) até a eclosão. Grupos de neonatos foram mantidos em potes plásticos, com dieta, até atingirem o 2º instar. Em seguida, as lagartas foram transferidas individualmente para bandejas de PVC de 16 células contendo uma dieta artificial até o estágio de pupa (GREENE *et al.*, 1976). As pupas foram sexadas utilizando um microscópio estereoscópio (Leica Ez4) e pesadas utilizando uma balança analítica (Shimadzu AUW220D), com precisão de 0,01mg. Machos e fêmeas com dois dias de idade foram utilizados nos bioensaios.

Dissecção

Os machos foram colocados individualmente em potes de plástico (30 mL) onde uma extremidade tinha organza para respiração e foram crioanestesiados no

freezer (-20°C) por 15 minutos. Logo após a imobilização, seus sistemas reprodutores foram dissecados em solução tampão de fosfato de sódio (PBS; 0,12 M, pH=7,2). Para essa etapa, foram utilizados microscópio estereoscópico Olympus SZH10, microtesoura e pinça.

Tempo de cópula

Para o tempo de cópula, as pupas das duas populações (RR e SS) foram pesadas e sexadas e transportadas para uma sala de criação que fica no Laboratório de Semioquímicos e Comportamento de Insetos que fica localizado no Instituto de Biotecnologia aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), na Universidade Federal de Viçosa (UFV). As pupas sexadas de ambas populações ficaram em gaiolas de acrílico (30x 30 x 30) até emergirem e transferidas para pequenos potes individuais (9 x 4,5 diâmetros) até dois dias depois da emergência.

A sala foi mantida em condições controladas com temperatura do ar de $27 \pm 3^\circ \text{C}$, $70 \pm 15\%$ UR e fotoperíodo 14:10 h L/D. Para o bioensaio foram utilizados 120 casais. 60 casais de SS e 60 casais de RR. O tempo de início e término de cópula de cada população foram feitos com auxílio de cronômetro. Os casais foram formados ($\text{SS}_\text{f} \times \text{SS}_\text{m}$ e $\text{RR}_\text{f} \times \text{RR}_\text{m}$) no 2º horário da escotofase.

Microscopia de Luz

Para montagem de cortes histológicos, o sistema reprodutor masculino foi fixado em glutaraldeído 2,5% + sacarose 3% em uma placa de kline. Após a fixação, a amostra foi lavada por 1 hora com água destilada, trocando a água de 10 em 10 minutos. Esse processo foi repetido por 6 vezes. O material foi mantido em hematoxilina por 3 minutos e em seguida lavado novamente com água destilada 5 vezes, trocando a água a cada 10 minutos. Ao finalizar esse procedimento, o material foi desidratado em série alcoólica crescente (30%, 50%, 70%, 90%) por 10 minutos e finalizado em três banhos de 10 minutos cada, com álcool 100%, todo esse processamento foram feitos dentro de microtubos tipo eppendorf de 1,5 ml.

Após a desidratação, o material foi infiltrado em uma mistura de Histo-resina Leica (Leica Histo-resin, Heidelberg, Germany) (base – sachê) e álcool por 3 horas, nas seguintes proporções: 2:1 (4 de álcool e 2 de resina), 1:1 (3 de álcool e 3 de resina) e 1:2 (2 de álcool e 4 de resina), finalizando com histo-resina pura por 24 horas. O material foi emblocado em moldes com histo-resina adicionada de catalisador e colocados na estufa à 60° por algumas horas até completar a polimerização. Os cortes semifinos, com espessura de 1.0-1.5 µm foram obtidos em um micrótomo Leica RM 2155, com navalhas de vidro.

Para identificar os espermatozoides apirenes e eupirenes, foram feitas lâminas histológicas do testículo de indivíduos suscetíveis e resistentes e coradas com DAPI (4,6-diamino-2-phenylindole) 0,2 µg/ml em tampão fosfato salino por 40 minutos e lavadas em água corrente. Após esse procedimento, foi realizada a visualização e fotodocumentação dos espermatozoides, utilizando o fotomicroscópio Olympus BX-53, localizado no Laboratório de Sistemática Molecular (BEAGLE) na Universidade Federal de Viçosa (UFV), em que, as lâminas coradas com DAPI, foram cobertas com lamínulas, usando solução aquosa de sacarose a 50%.

Foram obtidas 213 imagens de cada genótipo, cada imagem teve o tamanho de 50 µm. Em seguida, foi utilizado o software Adobe Photoshop 2022 para fazer a reposição de todas as imagens e obter a imagem total de cada testículo. Para a confecção das pranchas científicas, foi utilizado o software Adobe Illustrator 2022.

Para a contagem dos feixes espermáticos eupirenes e apirenes, foram contados em todas as imagens passadas em DAPI, pois a marcação nuclear fica evidente nos feixes eupirenes os diferenciando dos feixes apirenes (figura 3 e 4).

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas em R (v. 4.0.0; R Development Core Team, 2020) usando Análise de Variância (ANOVA), seguida de análise de resíduos para verificar a adequação das distribuições dos modelos testados. Modelos Lineares Generalizados (GLM) com distribuição Gaussiana foram utilizados para

verificar a porcentagem de feixes eupirenes em fotos de microscopia eletrônica de testículos e tempo total de cópula em machos resistentes (RR) e suscetíveis (SS).

3. RESULTADOS

O tempo de cópula, em minutos, de casais resistentes, foi maior quando comparado ao tempo de cópula de casais suscetíveis ($F = 37.70$, $df = 1, 118$; $p < 0.001$).

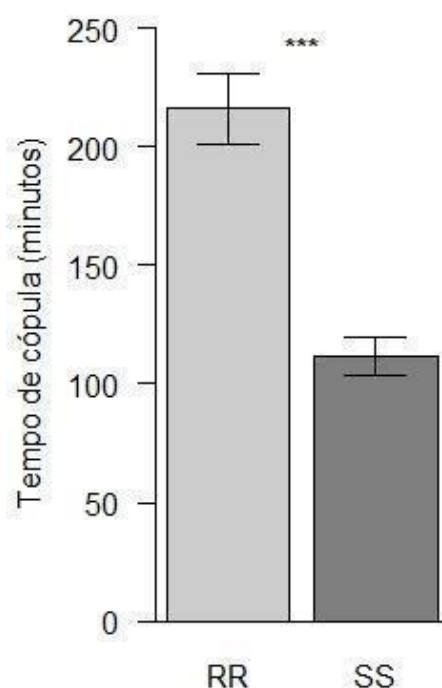


Figura 1: Tempo total de cópula, em minutos, de machos de *Spodoptera frugiperda* resistentes (RR) e suscetíveis (SS) ($n=60$). Os valores de P corrigidos por FDR são dados para comparações de tratamento [modelo linear generalizado (família, gaussiana)], *** $P < 0,001$.

Os pares de testículos são revestidos por uma única bainha peritoneal. Ao atingirem a sua fase adulta, no caso dos insetos estudados com 2 dias de vida, esses testículos se encontram fusionados em uma única estrutura e sem presença de folículos, ou seja, são os cistos que promovem nutrição e suporte para os espermatozoides apirenes (anucleados) e espermatozoides eupirenes (nucleados).

Os cistos com espermatozoides em desenvolvimento ficam localizados nas extremidades do testículo, enquanto os espermatozoides maduros ficam localizados mais ao centro onde se alongam dentro de feixes, ou seja, seu desenvolvimento

espermatogênico é centrípeto. Logo, encontra-se um par de pequenas vesículas seminais conectadas diretamente com os testículos (figura 1a), sendo as vesículas seminais responsáveis pelo armazenamento de espermatozoides.

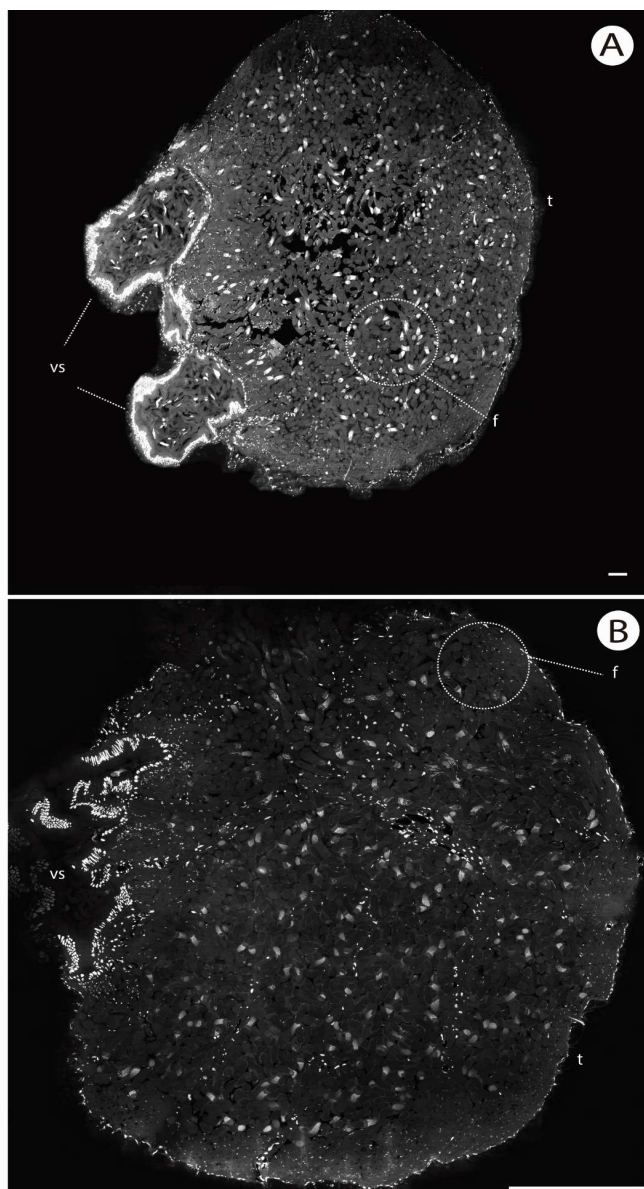


Figura 2: Secções longitudinais de testículos de *Spodoptera frugiperda* corado com DAPI. A -Testículo de *S. frugiperda* (suscetível). t - testículo, vs - vesícula seminal, f - feixes espermáticos. B - Testículo de *S. frugiperda* (resistente). t - testículo, vs - vesícula seminal, f - feixes espermáticos. Barras = 200 μ m.

Em testículos dos machos de *S. frugiperda*, os dois tipos de espermatozoides são encontrados em feixes diferentes (figura 3 e 4), dessa forma, cada cisto é responsável pela produção e maturação de um tipo específico, seja aqueles nucleados (eupirenes) ou anucleados (apirenes).

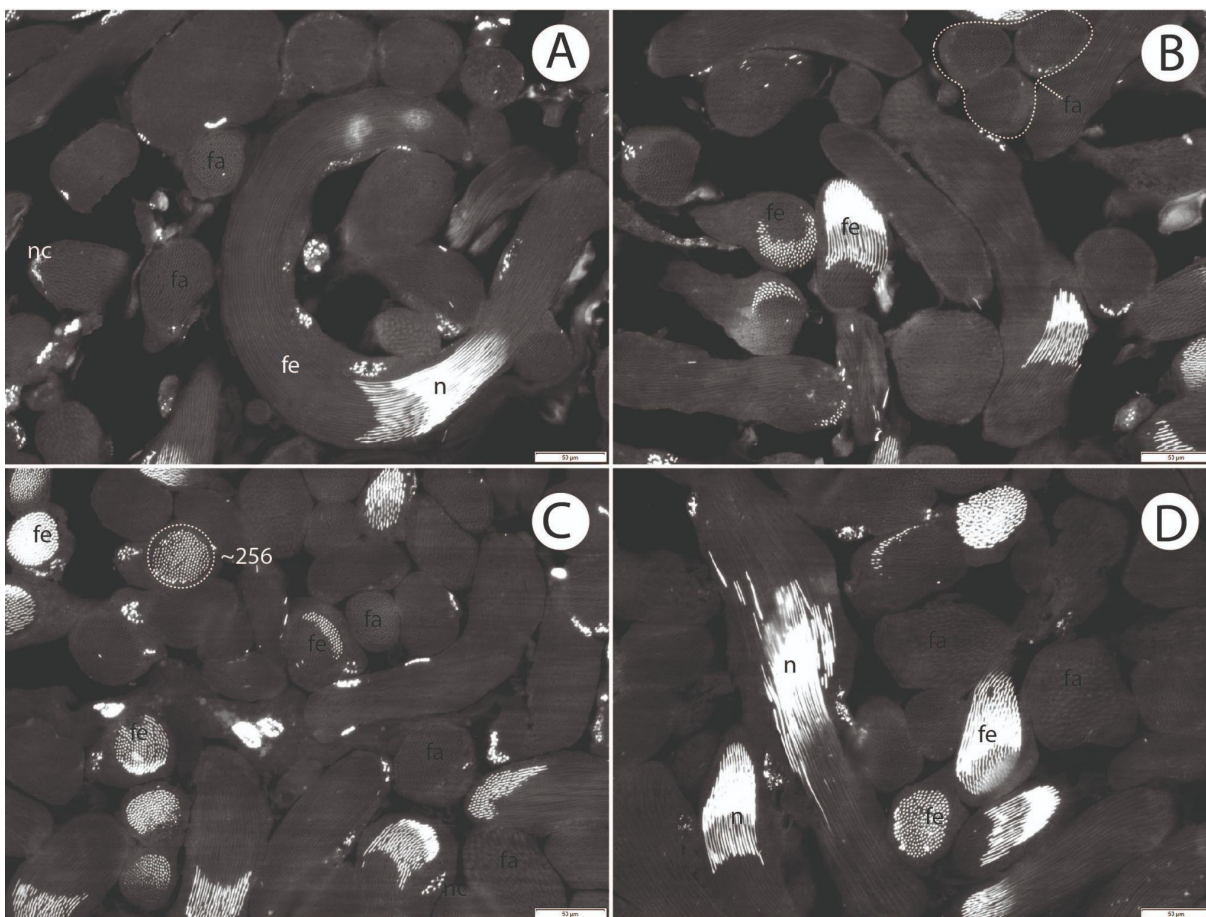


Figura 3: Detalhes de feixes espermáticos eupirenes de *Spodoptera frugiperda* (suscetível) em diferentes cortes longitudinais corados com DAPI. fa - feixe apirene, fe - feixe eupirene, nc - célula cística, n - núcleo, ~256 - aproximadamente 256 espermatozoides. Barras = 50 µm.

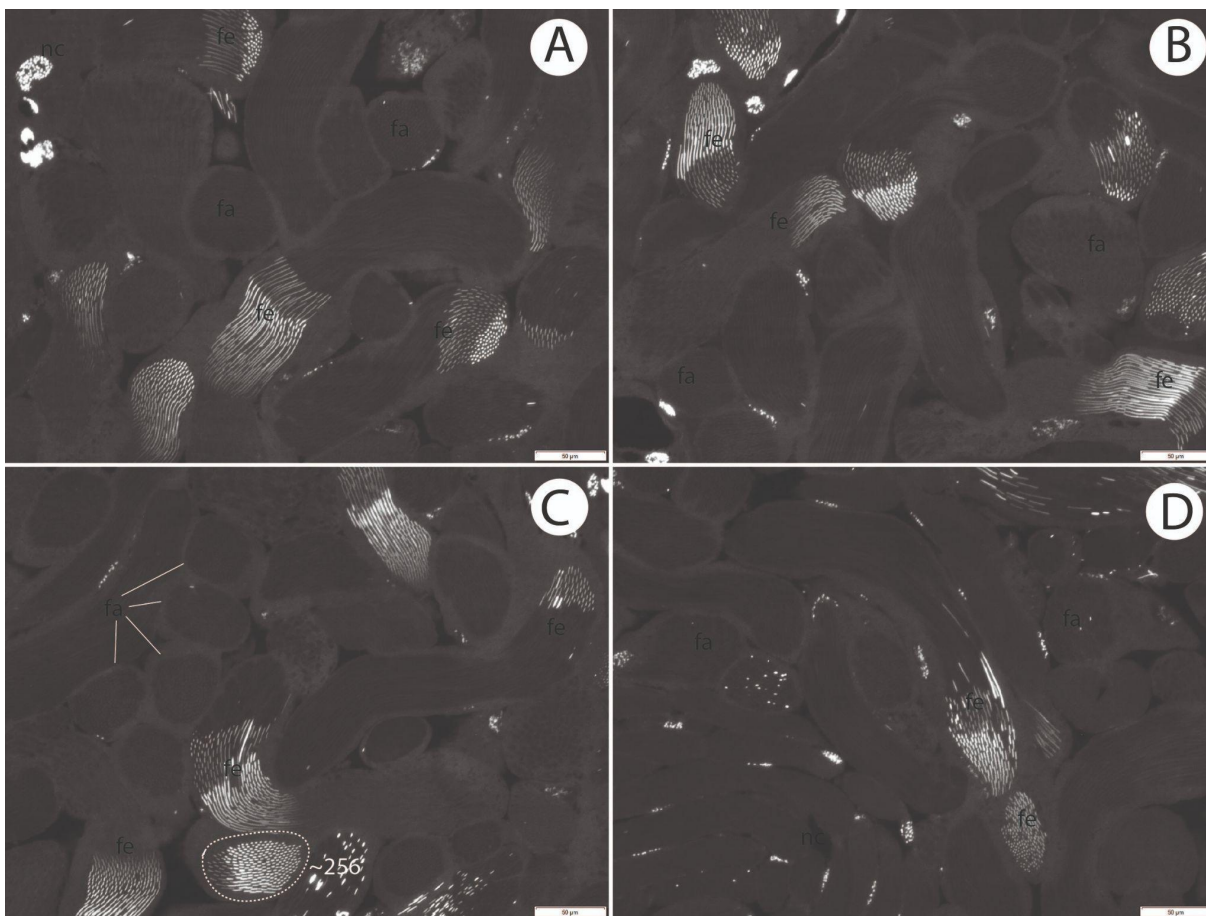


Figura 4: Detalhes de feixes espermáticos em diferentes secções longitudinais do testículo de *Spodoptera frugiperda* (resistente) coradas com DAPI. fa - feixe apirene, fe - feixe eupirene, nc - célula cística, n - núcleo, ~256 - aproximadamente 256 espermatozoides. Barras = 50 μm .

O número de feixes eupirenes foi maior no testículo dos machos suscetíveis (SS), comparado com os machos resistentes (RR) ($F = 5.92$, $df = 1, 424$; $p = 0.01$).

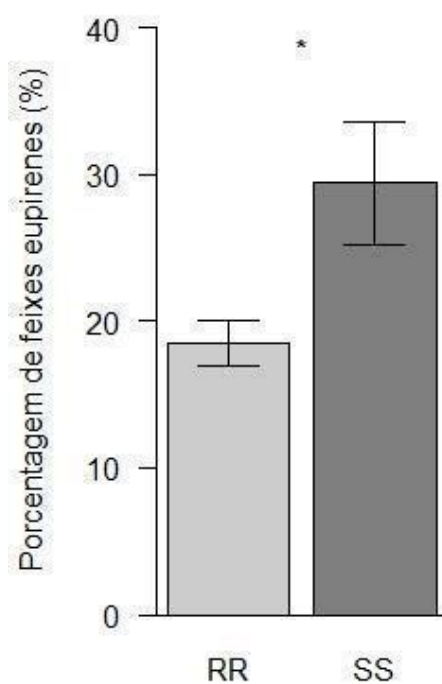


Figura 5: Porcentagem de feixes eupirenes em testículos de machos de *Spodoptera frugiperda* de genótipo resistente (RR) e suscetível (SS) (n=213). Os valores de P corrigidos por FDR são dados para comparações de tratamento [modelo linear generalizado (família, gaussiana)], * P < 0,05.

4. DISCUSSÃO

Os testículos dos machos de *S. frugiperda* são fusionados, o que foi reportado em outras espécies de mariposas pragas como *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville, 1842) (ALVES, *et al.*, 2006), *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (PEREIRA; SANTOS, 2015) e *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (DU, *et al.*, 2019). Essa fusão dos testículos e a espermiogênese ocorrem durante a fase de pupa (LIN; QILI, 2014). Portanto, na fase adulta, é possível encontrar apenas espermatozoides maduros em Lepidópteros. Isso corrobora com os nossos dados, tendo em vista que os machos adultos de *Spodoptera frugiperda* com dois dias de emergência já estão com os espermatozoides maduros.

Em insetos da ordem Lepidoptera, existe um polimorfismo espermático, podendo ser observados espermatozoides apirenes e eupirenes (MANCINI; DOLDER, 2001, 2004). Essa dicotomia espermática, ocorrida durante a fase de pupa e promove a diferenciação dessas células com presença ou não de núcleo (FRIEDLANDER; SETH; REYNOLDS, 2005). Esse polimorfismo espermático é uma característica encontrada em todas as famílias desta ordem, exceto em Micropterigidae, que possuem apenas espermatozoides eupirenes (SONNENSCHNEIN; HAUSER, 1990; HAMON; CHAUVIN, 1992).

Algumas das hipóteses sugeridas para a produção de espermatozoides apirenes, é sua ajuda na locomoção de espermatozoides eupirenes durante a cópula e eles também podem servir como fornecedores de nutrientes para a fêmea ou para os espermatozoides eupirenes, no sistema reprodutor feminino, visto que essas células anucleadas são degradadas, não sendo transferidas para a espermateca (SILBERGLIED; SHEPHERD; DICKINSON, 1984).

Nossos resultados mostraram que a produção de espermatozoides eupirenes em insetos resistentes é mais baixa, quando comparada com os suscetíveis, assim como o tempo de cópula foi maior em insetos resistentes. Sabe-se que machos podem transformar seu comportamento reprodutivo, de acordo com o risco de competição espermática, ficando mais tempo em cópula (BALL; PARKER, 1996, 1997). Portanto, pode ser mais vantajoso para os insetos resistentes manterem um tempo maior de cópula. Assim, eles conseguem passar a maior quantidade de espermatozoides para a fêmea.

Dessa forma, mesmo com uma quantidade menor de células viáveis (eupirenes) à fecundação, o alto número de espermatozoides apirenes transferidos à fêmea, pode auxiliar na eficiência da reprodução pois esses espermatozoides podem promover a formação de *mating plug* na bursa copulatória das fêmeas, evitando que outros machos depositem seu material genético nelas (SAUTER *et al.*, 2001).

A histofisiologia testicular de *S. frugiperda* comparativa entre suscetíveis e resistentes, pode auxiliar no entendimento da biologia reprodutiva deste inseto praga a qual carece de informações complementares, tendo em vista que nossos resultados mostraram que o efeito do milho *bt* com duas toxinas pode afetar a produção de espermatozoides em insetos resistentes.

Pesquisas adicionais podem ser feitas e nos trazer informações sobre a resistência estar acompanhada por um custo (*fitness cost*), pois a baixa produção de espermatozoides eupirenes em insetos resistentes pode ser um custo associado à resistência, visto que o custo adaptativo tem maior impacto em insetos resistentes pois são menos aptos ao ambiente na ausência da pressão de seleção do que os insetos suscetíveis (CARRIÈRE; TABASHINIK, 2001; TABASHINIK, 2005; CARRIÈRE, CROWDER, TABASHINIK 2010; SANTOS-AMAYA *et al.*, 2016; FATORETTO, 2017).

No presente momento foram descritos custos relacionados ao desenvolvimento e a reprodução de *S. frugiperda* (DE SOUZA RIBAS *et al.*, 2022; SANTOS-AMAYA *et al.*, 2022), porém esses custos descritos, não foram avaliados diretamente para a produção de gametas masculinos, que é um importante fator para a descendência de insetos resistentes, pois afeta diretamente a fertilidade e fecundidade de fêmeas (ZHAO *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2014).

Estudos envolvendo o *fitness cost* em produção de espermatozoides podem ser feitos para analisar se existe um efeito direto na capacidade de reprodução de machos. Igualmente trabalhos avaliando a qualidade nutricional do conteúdo passado do macho para a fêmea durante a cópula. Esses conteúdos nutricionais como proteínas, carboidratos e lipídios são importantes, pois ajudam na maturação de ovos em fêmeas (BOGGS; GILBERT, 1979; BOGGS, 1981).

5. CONCLUSÃO

Nossos resultados comprovam a alteração da produção de espermatozoides eupirenes dos indivíduos machos resistentes, e análises futuras podem utilizar esses dados como complemento para aplicação em campo e novos estudos.

REFERÊNCIAS

- BALL, M. A.; PARKER, G. A. Sperm competition games: External fertilization and “adapative” infertility. **Journal of Theoretical Biology**, v. 180, n. 2, p. 141-150, 1996.
- BALL, M. A.; PARKER, G. A. Sperm competition games: inter-and intra-species results of a continuous external fertilization model. **Journal of Theoretical Biology**, v. 186, n. 4, p. 459-466, 1997.
- BERNARDI, O.; BERNARDI, D.; HORIKOSHI, R. J.; OKUMA, D. M.; MIRALDO, L. L.; FATORETTO, J.; OMOTO, C. Seleção e caracterização da resistência à proteína Vip3Aa20 de *Bacillus thuringiensis* em *Spodoptera frugiperda*. **Ciência do manejo de pragas**, v. 72, n. 9, pág. 1794-1802, 2016.
- BILHA, J. K.; BRANCALHÃ, R. M. C.; CONTE, H. Fusão testicular de *Diatraea saccharalis* F. (Lepidoptera; Crambidae) durante o desenvolvimento pós-embrionário. **Journal of the Entomological Research Society**, v. 16, n. 1, pág. 1-7, 2014.
- BOGGS, C. L. Male nuptial gifts: phenotypic consequences and evolutionary implications. In: Leather, S.R., Hardie, j. (Eds.), **Insect Reproduction**. CRC Press, New York, p. 215-242, 1995.
- BOGGS, C. L.; GILBERT, L. E. Male contribution to egg production in butterflies: evidence for transfer of nutrients at mating. **Science**, v. 206, n. 4414, p. 83-84, 1979.
- CARRIÈRE, Y.; ELLERS-KIRK, C.; BIGGS, R. W.; NYBOER, M. E.; UNNITHAN, G. C.; DENNEHY, T. J.; TABASHNIK, B. E. Cadherin-based resistance to *Bacillus thuringiensis* cotton in hybrid strains of pink bollworm: fitness costs and incomplete resistance. **Journal of Economic Entomology** v.99, p.1925–1935, 2006.
- CARRIÈRE Y.; TABASHNIK B. E. Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological. **Sciences** v.268, p.1475-1480, 2001.
- CARRIÈRE Y.; CROWDER D.W.; TABASHNIK B.E. Evolutionary ecology of insect adaptation to Bt crops. **Evolutionary Applications** v.3, p. 561-573, 2010.
- CHANDRASENA, D.; SIGNORINI, A. M.; ABRATTI, G.; STORER, N. G.; OLACIREGUI, M. L.; ALVES, A. P. Characterization of field-evolved resistance to *Bacillus thuringiensis*-derived Cry1F δ -endotoxin in *Spodoptera frugiperda* populations from Argentina. **Pest management science**, v. 74, n. 3, p. 746-754, 2018.

- DEWSBURY, D. A. Ejaculate cost and male choice. **The American Naturalist**, v. 119, n. 5, p. 601-610, 1982.
- DRUMMOND, B. A. Multiple mating and sperm competition in the Lepidoptera. **Sperm competition and the evolution of animal mating systems**, p. 291-370, 1984.
- FARIAS, J. R.; FRESIA, P.; HORIKOSHI, R. J.; SORGATTO, R. J.; FRESIA, P.; SANTOS, A. C.; OMOTO, C. Field-envolved resistance to CryIF maize by *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) in Brasil. **Crop Protection**, v.64, p. 150-158, 2014.
- FATORETTO J. C.; MICHEL A. P.; SILVA FILHO M. C.; SILVA N. Adaptive potential of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) limits Bt trait durability in Brazil. **Journal of Integrate Pest Management**, v. 8, p.1-10, 2017.
- FRANÇA, R. G. R.; BÁO, S. N. Dimorphism in spermatozoa of *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1918 (Insecta, Lepidoptera, Noctuidae). **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 17, p. 5-10, 2000.
- FRIEDLANDER, M.; GITAY, H. The fate of the normal-anucleated spermatozoa in inseminated females of the silkworm *Bombyx mori*. **Journal of Morphology**, v. 138, n. 1, p. 121-129, 1972.
- FRIEDLANDER, M. Control of the eupyrene-apyrene sperm dimorphism in Lepidoptera. **Journal Insect Physiology**, v. 43, n. 12, p. 1085-1092, 1997.
- GASSMANN, A. J.; CARRIÈRE, Y.; TABASHNIK, B. E. Fitness costs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 54, p.147-163, 2009.
- GREENE, G. L.; LEPLA, N. C.; DICKERSON, W. A. Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **Journal of economic entomology**, v. 69, n. 4, p. 487-488, 1976.
- HIGGINSON, D. M.; MORIN, S.; NYBOER, M. E.; BIGGS, R. W.; TABASHNIK, B. E.; CARRIÈRE, Y. Evolutionary trade-offs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* crops: *fitness* cost affecting paternity. **Evolution**, v. 59, n. 4, p. 915-920, 2005.
- JAMIESON, B. G. M. The ultrastructure and phylogeny of insect spermatozoa. Cambridge: Cambridge University Press, p. 320, 1987.
- KATSUNO, Sadaya. Spermatogenesis and the abnormal germ cells in Bombycidae and Saturniidae. **Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University**, v.

64, n. 1, p. 21-34, 1989.

MANCINI, K.; DOLDER, H. Dichotomic Spermiogenesis in *Euptoieta hegesia* (Lepidoptera: Nymphalidae). **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 13-23, 2004.

NAKATSURU, K. E. N.; KRAMER, D. L. Is sperm cheap? Limited male fertility and female choice in the lemon tetra (Pisces, Characidae). **Science**, v. 216, n. 4547, p. 753-755, 1982.

OLSSON, M.; MADSEN, T.; SHINE, R. Is sperm really so cheap? Costs of reproduction in male adders, *Vipera berus*. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 264, n. 1380, p. 455-459, 1997.

POIANI, A. Complexity of seminal fluid: a review. Behavioral **Ecology and Sociobiology**, v 60, p. 289-310, 2006.

REINECKE, L. H.; REINECKE, J. P.; ADAMS, T. S. Morphology of the male reproductive tract of mature larval, pupal, and adult tobacco hornworms (Lepidoptera: Sphingidae), *Manduca sexta*. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 76, n. 3, p. 365-375, 1983.

SANTOS-AMAYA, O. F.; RODRIGUES, J. V.; SOUZA, T. C.; TAVARES, C. S.; CAMPOS, S. O.; GUEDES, R. N.; PEREIRA, E. J. Resistance to dual-gene Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: Selection, inheritance and cross-resistance to other transgenic events. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 18243, 2015.

SANTOS-AMAYA O. F.; TAVARES C. S.; RODRIGUES J. V. C.; CAMPOS S. O.; GUEDES R. N. C.; ALVES A. P.; PEREIRA E. J. G. Fitness costs and stability of Cry1Fa resistance in Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science**. v. 73 p. 35-43, 2016.

SAUTER, A.; BROWN, M. J.; BAER, B.; SCHMID-HEMPEL, P. Males of social insects can prevent queens from multiple mating. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 268, n. 1475, p. 1449-1454, 2001.

SILBERGLIED, R. E.; SHEPHERD, J. G.; DICKINSON, J. L. Eunuchs: the role of apyrene sperm in Lepidoptera?. **The American Naturalist**, v. 123, n. 2, p. 255-265, 1984.

SWALLOW, J. G.; WILKINSON, G. S. The long and short of sperm polymorphism in insects. **Biological Reviews**, v. 77, p. 153-182, 2002.

TABASHNIK, B. E.; DENNEHY, T. J.; CARRIÈRE, Y. Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 43, p. 15389-15393, 2005.

THORNHILL, R. Sexual selection and paternal investment in insects. **The American Naturalist**, v. 110, n. 971, p. 153-163, 1976.

ZHANG, L.; LEONARD, B. R.; CHEN, M.; CLARK, T.; ANILKUMAR, K.; HUANG, F. Fitness costs and stability of Cry1Ab resistance in sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (F.). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 117, p. 26-32, 2014.

ZHANG, Y. D.; Z, G. P.; ZHANG, W.; WANG, D.G.; X.; XIA, Q. Proteomics analysis of adult testis from *Bombyx mori*. **Proteomics**, v. 14, n. 20, p. 2345-2349, 2014.

ZHAO, J.Z.; CAO, J.; LI, Y.; COLLINS, H.L.; ROUSH, R.T.; EARLE, E.D.; SHELTON, A. M. Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect resistance evolution. **Nature Biotechnology**, 21, 1493–1497, 2003.