

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 29/06/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Julio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Análise comparativa dos efeitos do biopesticida azadiractina e do inseticida sintético piriproxifem nos testículos de *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). Uma abordagem morfológica, ultraestrutural e molecular

ANA SILVIA GIMENES GARCIA

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Carvalho dos Santos

Co-Orientador: Prof. Dr. Elton Luiz Scudeler

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional.

**BOTUCATU – SP
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Garcia, Ana Silvia Gimenes.

Análise comparativa dos efeitos do biopesticida azadiractina e do inseticida sintético piriproxifem nos testículos de *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae) : uma abordagem morfológica, ultraestrutural e molecular / Ana Silvia Gimenes Garcia. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Daniela Carvalho dos Santos
Coorientador: Elton Luiz Scudeler
Capes: 20100000

1. Insetos úteis. 2. Crisopídeo. 3. Controle biológico de vetores. 4. Inseticidas. 5. Testículos. 6. Transcriptoma.

Palavras-chave: Azadiractina; *Ceraeochrysa claveri*; Morfologia; Piriproxifem; Transcriptoma.

Agradecimientos

Agradeço primeiramente à minha família, especialmente meus pais Orlando e Silvia, e minhas irmãs Selma e Tatiane, por sempre me incentivarem e compreenderem minha ausência em tantos momentos.

Ao meu namorado Fernando pelo apoio incondicional em todos os momentos, e por sempre me incentivar a ser melhor.

Profa. Daniela, por tudo o que fez por mim nesses mais de 10 anos de parceria. Por abrir as portas de seu laboratório e por toda a ajuda, tanto profissional quanto pessoal. Serei eternamente grata por tudo.

Prof. Elton, por toda parceria nesses anos como colega de laboratório, amigo, e co-orientador. Muito obrigada por todos os ensinamentos.

CAPES, pela bolsa de estudos concedida (Código de Financiamento 001).

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de estudos e auxílio concedidos (Processos 2017/09901-1 e 2017/15120-2).

Ao Marino e funcionários do laboratório CETMA - Comércio de Agentes para Controle Biológico Ltda., Lençóis Paulista-SP, pelo fornecimento de material biológico utilizado neste trabalho.

Ao Fábio, por toda a ajuda com as análises de bioinformática.

Aos funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica: Carolina, Claudete, Luciana, Maria Helena, Shelly e Tiago. Muito obrigada por toda a ajuda nos experimentos, e mais do que isso, pelo companheirismo e amizade durante todos esses anos.

Aos amigos que fiz em Botucatu: Shelly, Márcio (Gabi e Pedrinho tb!), Aime, Mari, Junior, Bertha, Giovana, Ana Júlia, Ariane, Brenda, David e Andrea. Vocês contribuíram, e muito, para a realização desse trabalho (e para minha saúde mental!).

Aos colegas e professores do departamento por toda ajuda e empréstimos de equipamentos e reagentes!

Aos funcionários do Departamento de Morfologia, da Seção de Pós-graduação, biblioteca, enfim, do IB, meu muito obrigada pela atenção e serviços prestados.

“nós não precisamos de muita coisa
só precisamos uns dos outros...
e de sonhos”
(Oscar Wilde)

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	12
3. REFERÊNCIAS	13
4. RESULTADOS	19
4.1. CAPÍTULO 1	20
4.2. CAPÍTULO 2	46
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65

Resumo

Insetos da família Chrysopidae são inimigos naturais utilizados no controle biológico, sendo uma importante ferramenta na agricultura orgânica e no manejo integrado de pragas. Além do controle biológico utilizando esses insetos, o uso de inseticidas naturais vem ganhando grande destaque, pois são menos prejudiciais ao homem e ao ambiente. Entretanto, o uso de inseticidas sintéticos ainda é muito alto e acaba interferindo no ciclo de vida dos inimigos naturais, e consequentemente, no controle biológico de pragas. Com o propósito de avaliar o efeito da azadiractina e piriproxifem sobre os testículos do crisopídeo *Ceraeochrysa claveri*, insetos foram expostos a esses compostos nas concentrações 12 e 36mg i.a./L para a azadiractina (formulação comercial Azamax®), e 50 e 100mg i.a./L para o piriproxifem (formulação comercial Tiger 100 EC®). Os testículos de adultos foram avaliados através de técnicas morfológicas e análise do transcriptoma, além da avaliação do ciclo de vida dos insetos, fecundidade e fertilidade. Os resultados mostraram que os dois inseticidas causaram poucas alterações morfológicas nos testículos, como espaçamento entre os cistos, e alterações na túnica que o recobre. Os grupos tratados não apresentaram alterações nas marcações dos filamentos de actina e microtúbulos, bem como nas análises estatísticas, onde houve apenas redução da fecundidade, mas mantendo a viabilidade dos indivíduos gerados. Já a análise do transcriptoma apontou diferença na expressão dos genes de nucleoporinas, proteínas ribossomais e dedo de zinco, podendo estar relacionadas ao processo de espermatogênese e fecundidade dos insetos. Esses resultados nos mostram que os dois inseticidas podem ser adequados para uso em programas de manejo que visam conservar e aumentar a população de inimigos naturais, entretanto a compatibilidade em campo desses inseticidas com *C. claveri* deve ser avaliada.

Palavras-chave: *Ceraeochrysa claveri*; morfologia; azadiractina; piriproxifem; transcriptoma; testículos

Abstract

Insects of the Chrysopidae family are natural enemies used in biological control, being an important tool in organic agriculture and in integrated pest management. In addition to the biological control using these insects, the use of natural insecticides has gained great prominence, as they are less harmful to man and the environment. However, the use of synthetic insecticides is still very high and ends up interfering in the life cycle of natural enemies, and consequently, in the biological control of pests. In order to evaluate the effect of azadirachtin and pyriproxyfen on the testes of the chrysopid *Ceraeochrysa claveri*, insects were exposed to these compounds in concentrations 12 and 36mg ia / L for azadirachtin (commercial formulation Azamax®), and 50 and 100mg ia / L for pyriproxyfen (commercial formulation Tiger 100 EC®). Adult testes were evaluated using morphological techniques and transcriptome analysis, in addition to assessing the life cycle of insects, fecundity and fertility. The results showed that the two insecticides caused few morphological changes in the testes, such as spacing between the cysts, and changes in the tunic that covers it. The treated groups showed no changes in the markings of the actin filaments and microtubules, as well as in the statistical analyzes, where there was only a reduction in fecundity, but maintaining the viability of the generated individuals. The analysis of the transcriptome pointed out a difference in the expression of the genes of nucleoporins, ribosomal proteins and zinc finger, which may be related to the process of spermatogenesis and fecundity of insects. These results show us that the two insecticides may be suitable for use in management programs that aim to conserve and increase the population of natural enemies, however the compatibility in the field of these insecticides with *C. claveri* must be evaluated.

Keywords: *Ceraeochrysa claveri*; morphology; azadirachtin; pyriproxyfen; transcriptome; testis

1. Introdução

A família Chrysopidae contém cerca de 1200 espécies distribuídas em 75 gêneros e 11 subgêneros. As larvas de todas as espécies, bem como alguns adultos, são predadoras e podem ser importantes no controle biológico de insetos praga. *Ceraeochrysa* é um dos gêneros de Chrysopidae mais diversos, com 46 espécies descritas no mundo, dentre elas *Ceraeochrysa claveri* (Canard et al., 1984; Freitas, 2002; Pappas et al., 2011).

Os insetos da família Chrysopidae são encontrados em diversas culturas de interesse econômico como algodoeiro, citros, milho, entre outras. Podem alimentar-se de ovos, lagartas neonatas, pulgões, cochonilhas, ácaros e vários outros artrópodes de pequeno tamanho e de tegumento facilmente perfurável. Os crisopídeos se destacam pela voracidade na fase jovem, facilidade de criação em laboratório, elevado potencial de reprodução, além de não necessitarem de presas na fase adulta (Freitas, 2002; Gallo et al., 2002; Pappas et al., 2011).

Os crisopídeos são insetos holometabólicos, caracterizados por apresentarem as fases de ovo, larva, pupa e adulto (Figura 1). Os ovos são colocados na extremidade de um pedicelo, que serve como mecanismo de proteção contra predação ou canibalismo (Canard et al., 1984; Gallo et al., 2002; Pappas et al., 2011). O desenvolvimento larval apresenta três instares, nos quais as larvas são predadoras. As larvas possuem o hábito de cobrirem-se com detritos diversos ou com suas próprias exúvias, o que lhes confere o nome de bicho-lixeiro (Gepp, 1984; Pappas et al., 2011). Ao final do terceiro instar, as larvas tecem um casulo e empupam, e, ao completarem o seu desenvolvimento, abandonam o casulo por meio de uma abertura circular, passam por mais uma ecdise e surge o adulto (Gepp, 1984; Canard et al., 1984; Bezerra et al., 2009; Scudeler et al., 2013).

Segundo Canard et al. (1984), os adultos são insetos pequenos, apresentando corpo delicado e coloração geralmente esverdeada, asas membranosas reticuladas e pernas ambulatórias normais (Gallo et al., 2002; Freitas, 2002). Seus hábitos alimentares são variáveis, sendo constituídos de pólen, exsudatos açucarados das plantas, honeydew e néctar; outras podem ser predadoras (Freitas, 2002).

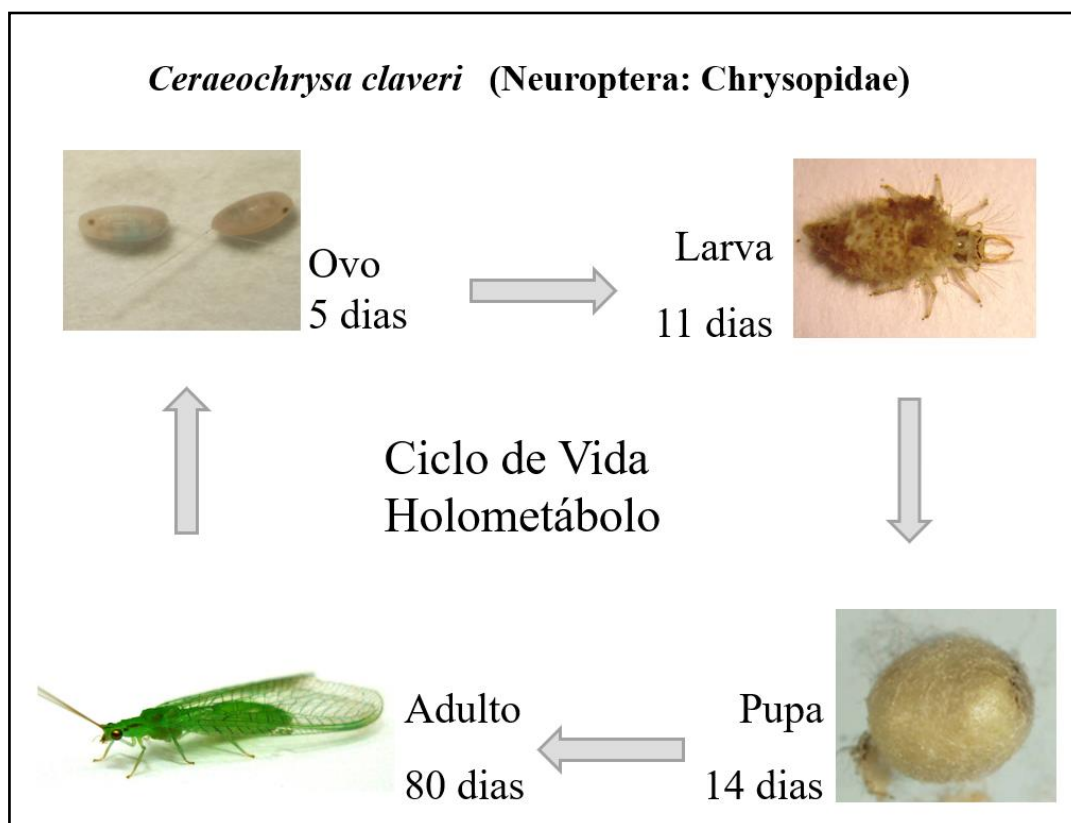


Figura 1. Esquema representando o ciclo de vida de *Ceraeochrysa claveri* e a duração dos estágios de desenvolvimento.

A presença de crisopídeos é relatada em diferentes ecossistemas naturais e implantados. Dentre os gêneros que ocorrem no Brasil, *Ceraeochrysa* Adams (Neuroptera: Chrysopidae) contém espécies com atributos que podem torná-las predadoras importantes em vários ecossistemas agrícolas (Medina et al., 2003). Algumas espécies são consideradas relativamente tolerantes a alguns pesticidas, podendo desenvolver resistência seja consumindo outros insetos que foram expostos com inseticidas ou por contato direto com inseticidas (Wu; Miyata, 2005; Pathan et al., 2008; Sayyed et al., 2010; Mansoor et al., 2017; Mansoor; Shad, 2019). O Manejo Integrado de Pragas (MIP) visa reduzir a quantidade de pragas a níveis toleráveis utilizando métodos de manejo ecologicamente corretos e economicamente sustentáveis, envolvendo o uso de pesticidas quando necessário. Portanto, o conhecimento sobre os efeitos dos pesticidas em organismos benéficos é indispensável, (Chen; Liu, 2002; Medina et al., 2003; Cloyd; Dickinson, 2006; Jonsson et al., 2008; Biondi et al., 2012), e a seleção daqueles que podem ser utilizados em conjunto é considerado crucial (Roubos et al., 2014).

A busca por métodos alternativos de controle inclui a utilização de produtos naturais que geralmente são menos prejudiciais ao ambiente, dentre os quais destacam-se os inseticidas de origem vegetal (Adnan et al., 2014; Celestino et al., 2014). Pesquisas envolvendo plantas com

atividade inseticida evoluíram bastante nas últimas décadas e a família Meliaceae têm sido uma das mais investigadas. O nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss) tem se destacado devido à presença de um composto denominado azadiractina, presente nas folhas, frutos e sementes, cuja atividade sobre alguns insetos é comparável à dos melhores inseticidas sintéticos encontrados no mercado (Schmutterer, 1990; Benelli et al., 2014).

A azadiractina foi um dos primeiros componentes ativos a serem isolados do nim, e provou ser o principal ingrediente no combate aos insetos, atuando por contato ou ingestão (Schmutterer, 1990; Medina et al., 2003; Isman, 2006). Esta molécula interfere no sistema endócrino ao prejudicar as vias do hormônio juvenil (JH) e 20-hidroxiecdisona, que estão envolvidas na regulação de muitas funções fisiológicas, levando a efeitos deletérios no desenvolvimento e reprodução, como efeito anti-alimentar, redução do crescimento, inibição da ecdise, redução da fecundidade e longevidade de adultos, esterilização, inibição de oviposição, mortalidade e repelência (Mordue (Luntz); Blackwell, 1993; Coats, 1994; Mordue (Luntz) et al., 2005; Isman, 2006; Bernardi et al., 2013; Correia et al., 2013; Adnan et al., 2014; Aribi et al., 2017; Oulhaci et al., 2018).

Como o uso de inseticidas sintéticos ainda é muito grande, estudos têm sido realizados para avaliar a compatibilidade desses inseticidas com insetos predadores, incluindo algumas espécies de crisopídeos (Medina et al., 2003; Cloyd; Dickinson, 2006). A maioria dos estudos avaliou principalmente os efeitos letais de inseticidas sintéticos, no entanto, é importante avaliar os efeitos subletais ou a longo prazo, que também podem afetar a viabilidade do uso de inimigos naturais com pesticidas (Cloyd; Dickinson, 2006).

Entre os inseticidas sintéticos utilizados que mimetizam o hormônio juvenil, destacamos o piriproxifem, que provoca desequilíbrio nos níveis desse hormônio no inseto, resultando em forte supressão da embriogênese, metamorfose, formação de adultos e esterilidade em muitos insetos praga (Boina et al., 2010; Fernandez et al., 2012). É bastante utilizado no controle de mosca branca, cochonilhas e em programas de manejo em culturas de algodão (Ishaaya et al., 1994; 2007).

Os efeitos de ambos os inseticidas sobre insetos alvo (pragas) são bem conhecidos, principalmente os efeitos relacionados ao ciclo de vida e a reprodução dos mesmos, devido ao objetivo de se criar estratégias efetivas no controle destas pragas. Contudo, os inimigos naturais que se encontram nesses ecossistemas/ambientes ou que fazem parte do manejo integrado de pragas, também sofrem as ações desses inseticidas, e conhecer os efeitos destes produtos nesses

indivíduos e em especial, na sua reprodução, é de extrema importância para a manutenção destas espécies, assegurando uma agricultura mais sustentável.

Nos crisopídeos, o aparelho reprodutor masculino é constituído por um par de testículos, vasos deferentes, vesículas seminais, glândulas acessórias e canal ejaculador, onde a principal função é a produção e armazenamento de espermatozoides e seu transporte, de forma viável, para o trato reprodutivo feminino (Chapman, 1998; Gullan, 2007). Os testículos são constituídos por folículos testiculares, e em larvas de *C. claveri* apresentam-se em pares, com formato arredondado e coloração esbranquiçada, passando para formato alongado em pupas e espiralados em adultos, adquirindo coloração amarela intensa (Garcia et al., 2019). Dentro dos folículos, as células germinativas são agrupadas em cistos, que se encontram em diferentes estágios de maturação, no sentido apical-basal. Dentro de cada cisto o desenvolvimento é sincrônico, devido à presença de pontes citoplasmáticas que surgem durante a citocinese incompleta das células germinativas (Gullan, 2007; Klowden, 2007; Garcia et al., 2019).

Diversos autores relataram efeitos da azadiractina em testículos de insetos praga, como degeneração dos feixes de espermatozoides, espermatócitos, diminuição do número de cistos por testículo, e ainda ação direta da azadiractina na membrana testicular (Shimizu, 1988; Linton et al., 1997; Abdel-Rahman et al., 2004; Tayade, 2012; Aribi et al., 2017; Oulhaci et al., 2018), mas seus efeitos sobre insetos não-alvo ainda são pouco conhecidos. A literatura aponta a existência de efeitos negativos sobre os inimigos naturais, embora pareçam ser menos intensos do que sobre as pragas (Schmutterer, 1990; Isman, 2006; Celestino et al., 2014).

A compatibilidade de piriproxifem com crisopídeos e outros inimigos naturais tem sido relatada na literatura como segura (Rugno et al., 2015; 2016), mas em alguns estudos mostrou-se prejudicial, possuindo efeito ovicida e larvicida, reduzindo fecundidade de fêmeas e viabilidade de ovos, e sua compatibilidade vem sido questionada, (Chen; Liu, 2002; Cloyd; Dickinson, 2006; Ginjupalli; Baldwin, 2013; Fogel et al., 2016; Ono et al., 2017; He et al., 2018; Sohail et al., 2019). A maioria desses estudos relatam apenas os efeitos no ciclo de vida e alguns aspectos reprodutivos dos insetos como fecundidade e fertilidade, enquanto aspectos morfológicos e/ou ultraestruturais dos órgãos reprodutivos não são abordados.

Outra forma de conhecer esses efeitos é através da introdução de novas tecnologias como o sequenciamento de próxima geração (NGS), que é uma ferramenta valiosa para a obtenção de grandes quantidades de informação genética de organismos não-modelo, como insetos (Schuster, 2008). Análise de transcriptoma é uma poderosa ferramenta para a pesquisa, permitindo o desenvolvimento de estratégias de controle de pragas com base na caracterização e

exploração de genes relacionados a vários fatores importantes, como a ação inseticida e o desenvolvimento de mecanismos de resistência (Oppenheim et al., 2015; Liu et al., 2016), tendo sido bastante utilizada em estudos com insetos praga (Ridgeway; Timm, 2014; Nascimento et al., 2015; Gao et al., 2018; Merlim; Cônsoli, 2019; Wei et al., 2019; Chen et al., 2020; Meng et al., 2020; Chen et al., 2021). O uso de ferramentas de bioinformática também tem sido amplamente utilizadas no âmbito de expressão gênica baseada em read counts (Anders; Huber, 2010; Anders et al., 2013). Tais ferramentas associadas a análises de ontologia permitem estabelecer uma relação entre genes alterados e respectivas funções de uma forma global e eficaz, possibilitando um melhor entendimento sobre as variações presentes entre tipos diferentes de tratamento.

Considerando a importância econômica de *C. claveri* na agricultura e manejo integrado de pragas, este trabalho tem por objetivo avaliar o efeito do biopesticida azadiractina e do inseticida sintético piriproxifem neste inimigo natural. Com base em análises morfológicas, ultraestruturais e moleculares dos testículos desse inseto, pretendemos avaliar o efeito da ingestão de azadiractina e piriproxifem neste órgão, bem como avaliar a fecundidade de fêmeas e a fertilidade dos ovos provenientes do cruzamento entre fêmeas controle e machos tratados.

Referências

- Adnan, S.M.; Uddin, M.M.; Alam, M.J.; Islam, M.S.; Kashem, M.A.; Rafii, M.Y.; Latif, M.A. Management of mango hopper, *Idioscopus clypealis*, using chemical insecticides and neem oil. **The Scientific World Journal**, 2014: 1-5, 2014.
- Antony, P.; Dehry, P.; Abdelaziz, M.; Malla, J.; Asad, M.A.; Paie, A. Global constitutive overexpression of cytochrome P450s confers tolerance to imidacloprid in palm weevils in date palm fields. **BMC Genomics**, 20: 1-23, 2019.
- Aribi, N.; Oulhaci, M.C.; Kilani-Morakchi, S.; Sandoz, J.C.; Kaiser, L.; Denis, B.; Joly, D. Azadirachtin impact on mate choice, female sexual receptivity and male activity in

- Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 143: 95-101, 2017.
- Bernardi, D.; Botton, M.; Cunha, U.S.; Bernardi, O.; Malausa, T.; Garcia, M.S.; Nava, D.E. Effects of azadirachtin on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and its compatibility with predatory mites (Acari: Phytoseiidae) on strawberry. **Pest Management Science**, 69: 75-80, 2013.
- Boina, D.R.; Rogers, M.E.; Wang, N.; Stelinski, L.L. Effect of pyriproxyfen, a juvenile hormone mimic, on egg hatch, nymph development, adult emergence and reproduction of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. **Pest Management Science**, 66: 349–357, 2010.
- Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. **Bioinformatics**, 30: 2114-2120, 2014.
- Canard, M.; Séméria, Y.; NEW, T.R. **Biology of Chrysopidae**. The Hague: Dr. W. Junk Publishers, 294p, 1984.
- Cao, Y.; Li, J.X.; Ji, C.N.; Xu, X.W.; Wu, M. Molecular cloning and characterization of a novel splice variant of human ZNF300 gene, which expressed highly in testis. **DNA Sequence**, 18(4): 312–315, 2007.
- Celestino, D.; Braoios, G.I.; Ramos, R.S.; Gontijo, L.M.; Guedes, R.N.C. Azadirachtin-mediated reproductive response of the predatory pirate bug *Blaptostethus pallescens*. **BioControl**, 59: 697-705, 2014.
- Chen, J.; Ye, X.; Wang, J.; Xia, B.; Xin, T. Transcriptome analysis of *Tetranychus cinnabarinus* responses to exposure of an insecticide (diflubenzuron). **Systematic & Applied Acarology**, 25(7): 1329–1342, 2020.
- Chen, T.Y.; Liu, T.X. Susceptibility of immature stages of *Chrysoperla rufilabris* (Neurop., Chrysopidae) to pyriproxyfen, a juvenile hormone analog. **Journal of Applied Entomology**, 126: 125–129, 2002.
- Chen, X.D.; Neupane, S.; Gill, T.A.; Gossett, H.; Pelz-Stelinski, K.S.; Stelinski, L.L. Comparative transcriptome analysis of thiamethoxam susceptible and resistant Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), using RNA-sequencing. **Insect Science**, 00: 1–13, 2021.
- Cloyd, R.A.; Dickinson, A. Effect of insecticides on mealybug destroyer (Coleoptera: Coccinellidae) and parasitoid *Leptomastix dactylopii* (Hymenoptera: Encyrtidae), natural enemies of citrus mealybug (Homoptera: Pseudococcidae). **Journal of Economic Entomology**, 99(5): 1596-1604, 2006.

- Colozza, G.; Montembault, E.; Quénerch'dub, E.; Riparbelli, M.G.; D'Avino, P.P.; Callaini, G. *Drosophila* nucleoporin Nup154 controls cell viability, proliferation and nuclear accumulation of Mad transcription factor. **Tissue and Cell**, 43(4): 254-261, 2011.
- Desneux, N.; Decourtye, A.; Delpuech, J.M. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. **Annual Review of Entomology**, 52: 81-106, 2007.
- Fernandez, F.C.; Cruz-Landim, C.; Malaspina, O. Influence of the insecticide pyriproxyfen on the flight muscle differentiation of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Microscopy Research and Technique**, 75: 844–848, 2012.
- Gao, S.; Xiong, W.; Wei, L.; Liu, J.; Liu, X.; Xie, J.; Song, X.; Bi, J.; Li, B. Transcriptome profiling analysis reveals the role of latrophilin in controlling development, reproduction and insecticide susceptibility in *Tribolium castaneum*. **Genetica**, 146: 287-302, 2018.
- Ghanim, M.; Kontsedalov, S. Gene expression in pyriproxyfen-resistant *Bemisia tabaci* Q biotype. **Pest Management Science**, 63(8): 776-83, 2007.
- Gigliotti, S.; Callaini, G.; Andone, S.; Riparbelli, M.G.; Pernas-Alonso, R.; Hoffmann, G.; Graziani, F.; Malva, C. *Nup154*, a new *Drosophila* gene essential for male and female gametogenesis is related to the *Nup155* vertebrate nucleoporin gene. **The Journal of Cell Biology**, 142(5): 1195–1207, 1998.
- Gu, Z.Y.; Li, F.C.; Wang, B.B.; Xu, K.Z.; Ni, M.; Zhang, H.; Shen, W.D.; Li, B. Differentially expressed genes in the fat body of *Bombyx mori* in response to phoxim insecticide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 117: 47-53, 2015.
- Hayashi, D.; Tanabe, K.; Katsube, H.; Inoue, Y.H. B-type nuclear lamin and the nuclear pore complex Nup107-160 influences maintenance of the spindle envelope required for cytokinesis in *Drosophila* male meiosis. **Biology Open**, 5:1011-1021, 2016.
- Hsu, J.C.; Chien, T.Y.; Hu, C.C.; Chen, M.J.M.; Wu, W.J.; Feng, H.T.; Haymer, D.S.; Chen, C.Y. Discovery of genes related to insecticide resistance in *Bactrocera dorsalis* by functional genomic analysis of a *De novo* assembled transcriptome. **Plos One**, 7: 1-16, 2011.
- Ishaaya, I.; Barazani, A.; Kontsedalov, S.; Horowitz, A.R. Insecticides with novel modes of action: Mechanism, selectivity and cross-resistance. **Entomological Research**, 37: 148–152, 2007.
- Ishaaya, I.; De Cock, A.; Degheele, D. Pyriproxyfen, a potent suppressor of egg hatch and adult formation of the greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). **Physiology, Toxicology, and Biochemistry**, 87(5): 1185-1189, 1994.

- Isman, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, 51: 45-66, 2006.
- Jonsson, M.; Wratten, S.D.; Landis, D.A.; Gurr, G.M. Recent advances in conservation biological control of arthropods by arthropods. **Biological Control**, 45:172–175, 2008.
- Karatolos, N.; Williamson, M.S.; Denholm, I.; Gorman, K.; ffrench-Constant, R.H.; Bass, C. Over-Expression of a cytochrome P450 is associated with resistance to pyriproxyfen in the greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum*. **Plos One**, 7: 1-8, 2012.
- Kearse, M.G.; Ireland, J.A.; Prem, S.M.; Chen, A.S.; Ware, V.C. RpL22e, but not RpL22e-like-PA, is SUMOylated and localizes to the nucleoplasm of *Drosophila* meiotic spermatocytes. **Nucleus**, 4:241–258, 2013.
- Kiger, A.A.; Gigliotti, S.; Fuller, M.T. Developmental genetics of the essential *Drosophila* nucleoporin *nup154*: allelic differences due to an outward-directed promoter in the *P*-element 3' end. **Genetics**, 153: 799–812, 1999.
- Leng, N.; Dawson, J.A.; Thomson, J.A.; Ruotti, V.; Rissman, A.I.; Smits, B.M.G.; Haag, J.D.; Gould, M.N.; Stewart, R.M.; Kendzierski, C. EBSeq: An empirical Bayes hierarchical model for inference in RNA-seq experiments. **Bioinformatics**, 29: 1035-1043, 2013.
- Li, H.; Zhang, H.; Huan, G.; Dou, Z.; Xie, Y.; Si, J.; Di, C. Heavy ion radiation-induced DNA damage mediates apoptosis via the Rpl27a-Rpl5-MDM2-p53/E2F1 signaling pathway in mouse spermatogonia. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 201: 1-12, 2020.
- Liu, Y.; Qi, M.; Chi, Y.; Wuriyangan, H. De Novo Assembly of the Transcriptome for Oriental Armyworm *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae) and Analysis on Insecticide Resistance-Related Genes. **Journal of Insect Science**, 16(1): 92; 1–8, 2016.
- Luo, S.; Gao, X.; Ding, J.; Liu, C.; Du, C.; Hou, C.; Zhu, J.; Lou, B. Transcriptome sequencing reveals the traits of spermatogenesis and testicular development in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). **Genes**, 10: 1-22, 2019.
- Luoh, S.W.; Bain, P.A.; Polakiewicz, R.D.; Goodheart, M.L.; Gardner, H.; Jaenisch, R.; Page, D.C. Zfx mutation results in small animal size and reduced germ cell number in male and female mice. **Development**, 124: 2275–2284, 1997.
- Mageeney, C.M.; Kearse, M.G.; Gershman, B.W.; Pritchard, C.E.; Colquhoun, J.M.; Ware, V.C. Functional interplay between ribosomal protein paralogues in the eRpL22 family in *Drosophila melanogaster*. **Fly**, 12:143–163, 2018.
- Mageeney, C.M.; Ware, V.C. Specialized eRpL22 paralogue-specific ribosomes regulate specific mRNA translation in spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. **Molecular Biology of the Cell**, 30: 2240-2253, 2019.

- Mapa - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2020. URL: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons
- Medina, P.; Smagghe, G.; Budia, F.; Tirry, L.; Viñuela, E. Toxicity and absorption of Azadirachtin, Diflubenzuron, Pyriproxyfen, and Tebufenozide after Topical Application in predatory larvae of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). **Environmental Entomology**, 32(1): 196-203, 2003.
- Meng, X.; Dong, F.; Qian, K.; Miao, L.; Yang, X.; Ge, H.; Wu, Z.; Wang, J. Transcriptome analysis reveals global gene expression changes of *Chilo suppressalis* in response to sublethal dose of chlorantraniliprole. **Chemosphere**, 234: 648-657, 2019.
- Meng, X.; Zhang, N.; Yang, X.; Miao, L.; Jiang, H.; Ji, C.; Xu, B.; Qian, K.; Wang, J. Sublethal effects of chlorantraniliprole on molting hormone levels and mRNA expressions of three Halloween genes in the rice stem borer, *Chilo suppressalis*. **Chemosphere**, 238: 1-7, 2020.
- Merlin, B.L.; Cônsoli, F.L. Regulation of the larval transcriptome of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) by maternal and other factors of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Frontiers in Physiology**, 10:1-19, 2019.
- Mordue (Luntz), A.J.; Blackwell, A. Azadirachtin: an update. **Journal of Insect Physiology**, 39: 903-924, 1993.
- Mordue (Luntz), A.J.; Morgan, E.D.; Nisbet, A.J. Azadirachtin, a natural product in insect control. **Comprehensive Molecular Insect Science**, 6: 117-135, 2005.
- Nascimento, A.R.B.; Fresia, P.; Cônsoli, F.L.; Omoto, C. Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC Genomics**, 16:1-12, 2015.
- Oppenheim, S.J.; Baker, R.H.; Simon, S.; Desalle, R. We can't all be supermodels: the value of comparative transcriptomics to the study of non-model insects. **Insect Molecular Biology**, 24(2): 139–154, 2015.
- Oulhaci, C.M.; Denis, B.; Kilani-Morakchi, S.; Sandoz, J.C.; Kaiser, L.; Joly, D.; Aribi, N. Azadirachtin effects on mating success, gametic abnormalities and progeny survival in *Drosophila melanogaster* (Diptera). **Pest Management Science**, 74: 174–180, 2018.
- Pappas, M.L.; Broufas, G.D.; Koveos, D.S. Chrysopid predators and their role in biological control. **Journal of Entomology**, 8(3): 301–326, 2011.
- Park, E.; Lee, B.; Clurman, B.E.; Lee, K. NUP50 is necessary for the survival of primordial germ cells in mouse embryos. **Reproduction**, 151: 51–58, 2016.

- Parrott, B.B.; Chiang, Y.; Hudson, A.; Sarkar, A.; Guichet, A.; Schulz, C. *Nucleoporin98-96* function is required for transit amplification divisions in the germ line of *Drosophila melanogaster*. **Plos One**, 6(9): 1-10, 2011.
- Preston, C.C.; Storm, E.C.; Leonard, R.J.; Faustino, R.S. Emerging roles for nucleoporins in reproductive cellular physiology. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, 97(4):257-264, 2019.
- Przyborski, S.A.; Knowles, B.B.; Handel, M.A.; Gurwitch, S.A.; Ackerman, S.L. Differential expression of the zinc finger gene *Zfp105* during spermatogenesis. **Mammalian Genome**, 9: 758–762, 1998.
- Ridgeway, J.A.; Timm, A.E. Comparison of RNA isolation methods from insect larvae. **Journal of Insect Science**, 14:1-5, 2014.
- Schuster, S.C. Next-generation sequencing transforms today's biology. **Nature Methods**, 5: 16-18, 2008.
- Scudeler, E.L.; Santos, D.C. Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). **Micron**, 44:125–132, 2013.
- Shu, B.; Jia, J.; Zhang, J.; Sethuraman, V.; Yi, X.; Zhong, G. DnaJ homolog subfamily A member1 (*DnaJ1*) is a newly discovered anti-apoptotic protein regulated by azadirachtin in Sf9 cells. **BMC Genomics**, 19: 1-11, 2018.
- Shu, B.; Yu, H.; Li, Y.; Zhong, H.; Li, X.; Cao, L.; Lin, J. Identification of azadirachtin responsive genes in *Spodoptera frugiperda* larvae based on RNA-seq. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 172, 2020.
- Tang, W.; Xiao, Y.; Li, G.; Zheng, X.; Yin, Y.; Wang, L.; Zhu, Y. Analysis of digital gene expression profiling in the gonad of male silkworms (*Bombyx mori*) under fluoride stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 153: 127-134, 2018.
- Vedelek, V.; Bodai, L.; Grézal, G.; Kovács, B.; Boros, I.M.; Laurinyecz, B.; Sinka, R. Analysis of *Drosophila melanogaster* testis transcriptome. **BMC Genomics**, 19:1-19, 2018.
- Wang, H.; Lai, D.; Yuan, M.; Xu, H. Growth inhibition and differences in protein profiles in azadirachtin-treated *Drosophila melanogaster* larvae. **Electrophoresis**, 35: 1122–1129, 2014.
- Wei, D.; Li, H.M.; Yang, W.J.; Wei, D.D.; Dou, W.; Huang, Y.; Wang, J.J. Transcriptome profiling of the testis reveals genes involved in spermatogenesis and marker discovery in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. **Insect Molecular Biology**, 24: 41-57, 2014.

- Wei, N.; Zhong, Y.; Lin, L.; Xie, M.; Zhang, G.; Su, W.; Li, C.; Chen, H. Transcriptome Analysis and Identification of Insecticide Tolerance-Related Genes after Exposure to Insecticide in *Sitobion avenae*. **Genes**, 10: 1-18, 2019.
- Xu, L.; Li, S.; Ran, X.; Liu, C.; Lin, R.; Wang, J. Apoptotic activity and gene responses in *Drosophila melanogaster* S2 cells, induced by azadirachtin A. **Pest Management Science**, 72(9): 1710-1717, 2016.
- Yunta, C.; Grisales, N.; Nász, S.; Hemmings, K.; Pignatelli, P.; Voice, M.; Ranson, H.; Paine, M.J.I. Pyriproxyfen is metabolized by P450s associated with pyrethroid resistance in *An. gambiae*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 78: 50-57, 2016.
- Zhou, H.; Liu, L.H.; Zhang, H.; Lei, Z.; Lan, Z.J. Expression of zinc finger protein 105 in the testis and its role in male fertility. **Molecular Reproduction and Development**, 77(6): 511-520, 2010.
- Zhou, X.; Liao, W.J.; Liao, J.M.; Liao, P.; Lu, H. Ribosomal proteins: functions beyond the ribosome. **Journal of Molecular Cell Biology**, 7(2): 92–10, 2015.
- Zhou, C.; Yang, H.; Wang, Z.; Long, G.Y.; Jin, D.C. Comparative transcriptome analysis of *Sogatella furcifera* (Horváth) exposed to different insecticides. **Scientific Reports**, 8:1-12, 2018.

Considerações finais

Os resultados obtidos neste estudo indicam uma possível resposta tolerante do predador de pragas *C. claveri* à exposição aos inseticidas azadiractina e piriproxifem em ambiente laboratorial, mesmo tendo apresentado algumas alterações morfológicas e ultraestruturais nos testículos, as quais acreditamos estarem relacionadas aos genes diferencialmente expressos observados na análise inicial do transcriptoma. Além disso, a exposição aos inseticidas não gerou alterações importantes nos estágios de desenvolvimento de larvas e pupas e nem na taxa de mortalidade. Houve uma pequena redução da fecundidade, porém com alta viabilidade reprodutiva dos indivíduos que completaram o ciclo de vida.

O estudo gerou, pela primeira vez, um banco de dados moleculares e de bioinformática com a análise da expressão gênica para essa espécie, tanto aquela obtida em resposta aos tratamentos investigados, como para a própria espécie, o que certamente enriquece o conhecimento sobre a biologia desta espécie de inimigo natural, contribuindo para pesquisas futuras e estratégias de controle de pragas. Uma vez que, um dos principais objetivos do manejo integrado de pragas seja a combinação do uso de inseticidas seletivos com inimigos naturais de pragas, este estudo fornece importantes e promissoras informações sobre a possibilidade de uso da azadiractina e do piriproxifem em associação a espécie predadora *C. claveri*.