

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ASPECTOS DA ECOLOGIA DA MOVIMENTAÇÃO E DA
REPRODUÇÃO COMO BASES PARA O MANEJO DE**
***Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**
(Lepidoptera: Noctuidae)

Gabriel Fernandes Rezende
Engenheiro Agrônomo

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ASPECTOS DA ECOLOGIA DA MOVIMENTAÇÃO E DA
REPRODUÇÃO COMO BASES PARA O MANEJO DE**
***Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**
(Lepidoptera: Noctuidae)

Discente: Gabriel Fernandes Rezende
Orientador: Prof. Dr. Odair Aparecido Fernandes

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Entomologia Agrícola).

R467a Rezende, Gabriel Fernandes
Aspectos da ecologia da movimentação e da reprodução
como bases para o manejo de *Spodoptera frugiperda* (J. E.
Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) / Gabriel Fernandes Rezende.
-- Jaboticabal, 2022
89 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Odair Aparecido Fernandes

1. Entomologia Agrícola. 2. Insetos. 3. Insects Resistance to
insecticides. 4. Insect flight. 5. Ecologia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

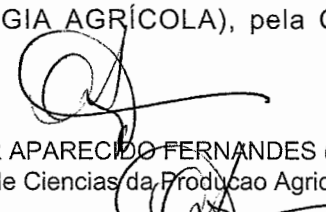
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ASPECTOS DA ECOLOGIA DA MOVIMENTAÇÃO E DA REPRODUÇÃO COMO BASES PARA O MANEJO DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

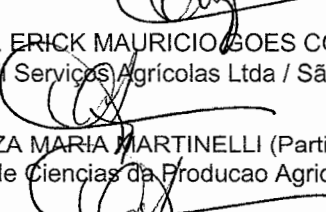
AUTOR: GABRIEL FERNANDES REZENDE

ORIENTADOR: ODAIR APARECIDO FERNANDES

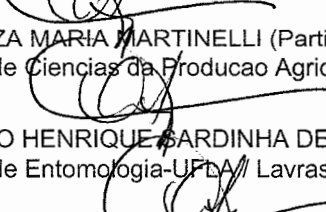
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA (ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:



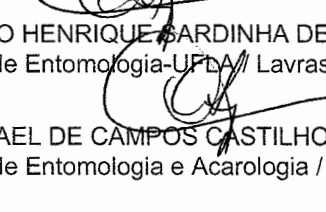
Prof. Dr. ODAIR APARECIDO FERNANDES (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola Fitossanidade / FCAV UNESP Jaboticabal



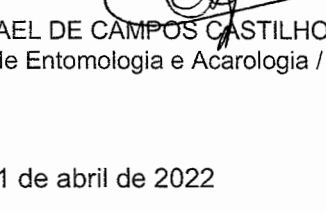
Pesquisador Dr. ERICK MAURICIO GOES CORDEIRO (Participação Virtual)
Provivi Do Brasil Serviços Agrícolas Ltda / São Paulo/SP



Profa. Dra. NILZA MARIA MARTINELLI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Produção Agrícola / FCAV UNESP Jaboticabal



Prof. Dr. BRUNO HENRIQUE SARDINHA DE SOUZA (Participação Virtual)
Departamento de Entomologia-UFPA / Lavras/SP



Prof. Dr. RAPHAEL DE CAMPOS CASTILHO (Participação Virtual)
Departamento de Entomologia e Acarologia / ESALQ/USP - Piracicaba/SP

Jaboticabal, 01 de abril de 2022

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GABRIEL FERNANDES REZENDE – Nasceu em Uberlândia – MG no dia 23 de março de 1992. Ingressou no curso de Agronomia, pela Universidade Federal de Uberlândia – UFU, em 2010. Estagiou por três anos no Laboratório de Análise de Solos – LABAS da Universidade Federal de Uberlândia, auxiliando em atividades laboratoriais e pesquisas a campo. Nesse período teve a oportunidade de desenvolver trabalho de iniciação científica com a recuperação de áreas de pastagem degradada. Foi monitor das disciplinas de Fisiologia Vegetal, Hidráulica na Agricultura e Genética na Agropecuária. Graduiu-se em 2015, obtendo o título de Engenheiro Agrônomo. Em 2016 iniciou o curso de Mestrado em Agronomia, com foco em Fitotecnia pela mesma instituição, trabalhando com a indução de resistência de plantas a herbívoros pela aplicação de silício. Obteve o título de mestre em 2018, mesmo ano em que ingressou no curso de doutorado em Agronomia (Entomologia Agrícola), na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê”*

Arthur Schopenhauer

*“A ciência nunca resolve um problema sem criar
pelo menos outros dez”.*

George Bernard Shaw

Aos meus pais, Gilda e Gecimar.

Ao meu irmão, Gregório.

À minha noiva, Beliza.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pelos anjos que me guardam e me guiam, pelos bons pensamentos e ensinamentos, agradeço pela força e o amor.

Aos meus pais, pela minha formação moral e intelectual. Obrigado pelo esforço que sempre fizeram para que eu alcançasse meus objetivos. Obrigado pelo apoio e suporte. Acima de tudo, obrigado pelo amor incondicional. Que um dia eu possa retribuir a tudo isso.

À minha noiva, companheira e conselheira. Escolher estar ao lado de alguém exige muitos sacrifícios. Vejo os que tem feito, são muito importantes para mim. Amote como ser humano, como mulher, como minha alma gêmea e muito além. Nem mesmo as mais linda palavras podem substituir um sincero: “Muito obrigado”.

Ao Professor Odair Aparecido Fernandes, pela parceria concretizada ao longo dos quatro anos de convívio, pelos ensinamentos que foram muito além daquilo que uma tese pode contemplar, pelo apoio e direcionamentos. Foram ensinamentos valiosos.

Aos amigos do coração Welliny Soares Rocha Dias, Hermann Moller, Éllen Rimkevicius Carbognin, Luís Augusto Gervásio Junqueira e os reis dos canxas José Chamessanga Álvaro e José Ricardo Lima Pinto (e ao canxinha Joaquim). Obrigado por me acolherem, pelo carinho e pelo apoio, tanto no âmbito acadêmico quanto pessoal.

À família do ApEcoLab: André Maurício Múscari, César Sampaio Pavani, João Marcelo Venturin Filho, Vinícius Cesarin, Victor Scanavez Martins, João Rafael Silva Soares, Sabrina Juvenal de Oliveira, Marina Guimarães Brum de Castro, Thaynara Arantes Soares Junqueira, Gabriela Franchini, Yasmin Esteves Izidro e Jivago de Oliveira Rosa. Obrigado pelo apoio nas atividades e pela oportunidade de aprender com vocês. Cada um, ao seu modo, me ensinou coisas que me acompanharão sempre.

Aos colegas do Departamento de Ciências da Produção Agrícola, por compartilharem de momentos ímpares durante as aulas, intervalos e encontros rotineiros. Obrigado aos companheiros que dividiram as atividades do Curso de Inverno, um marco da minha vida acadêmica.

Aos insetos utilizados nos experimentos, fundamentais para a construção de todo conhecimento!

Aos docentes do programa de Pós-graduação em Entomologia Agrícola por transmitirem o conhecimento que possuem e apoiarem sempre que solicitados.

Aos funcionários da Fundação de Apoio a Pesquisa, Ensino e Extensão - Funep, que me apoiaram de forma espetacular. A educação, proatividade, paciência e o empenho de vocês muito me ensinaram. Vocês fizeram a diferença, muito obrigado.

À FCAV/UNESP e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola), pela oportunidade na realização do doutorado.

À PROVIVI pela disponibilização dos dados de movimentação de adultos de *Spodoptera frugiperda*.

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

Muito obrigado!!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
1.2.1 Importância econômica e aspectos bioecológicos de <i>Spodoptera frugiperda</i>	3
1.2.2 Ecologia de insetos.....	4
1.2.2.1 Dispersão de insetos	5
1.2.2.2 Marcação de insetos	6
1.2.2.3 Voo tutorado	7
1.2.3 Fisiologia do acasalamento	8
1.3 REFERÊNCIAS.....	10
CAPÍTULO 2 – MARCAÇÃO DE ESTRUTURAS INTERNAS DE LARVAS E ADULTOS DE LEPIDOPTERA VIA ALIMENTAÇÃO LARVAL.....	15
2.1 INTRODUÇÃO	16
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	18
2.2.1 Insetos	18
2.2.2 Ensaio de marcação	18
2.2.3 Avaliações	20
2.2.4 Análise estatística.....	21
2.3 RESULTADOS.....	22
2.4 DISCUSSÃO	25
2.5 REFERÊNCIAS.....	31
CAPÍTULO 3 – DINÂMICA ESPAÇO-TEMPORAL DE ADULTOS DE <i>Spodoptera frugiperda</i> EM ÁREA DE CULTIVO	34
3.1 INTRODUÇÃO	35
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.3 RESULTADOS.....	38
3.4 DISCUSSÃO	41
3.5 REFERÊNCIAS.....	46

CAPÍTULO 4 – CAPACIDADE DE VOO DE ADULTOS DE <i>Spodoptera frugiperda</i>	48
4.1 INTRODUÇÃO	49
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.2.1 Insetos	50
4.2.2 Montagem dos insetos.....	51
4.2.3 Coleta de dados.....	51
4.2.4 Delineamento.....	52
4.2.5 Análise estatística.....	52
4.3 RESULTADOS.....	53
4.4 DISCUSSÃO	55
4.5 REFERÊNCIAS.....	58
CAPÍTULO 5 – DETERMINAÇÃO DO STATUS SEXUAL DE MACHOS DE <i>Spodoptera frugiperda</i> COMO BASE PARA O MANEJO DE RESISTÊNCIA DE INSETOS.....	61
5.1 INTRODUÇÃO	62
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
5.2.1 Ensaio 1.....	63
5.2.2 Ensaio 2.....	65
5.3 RESULTADOS.....	67
5.3.1 Ensaio 1.....	67
5.3.2 Ensaio 2.....	69
5.4 DISCUSSÃO	70
5.4.1 Ensaio 1.....	70
5.4.2 Ensaio 2.....	72
5.5 REFERÊNCIAS.....	75
CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77

ASPECTOS DA ECOLOGIA DA MOVIMENTAÇÃO E DA REPRODUÇÃO COMO BASES PARA O MANEJO DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)

RESUMO – A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, é uma das principais pragas de cultivos agrícolas no mundo. O manejo desse inseto consta de técnicas que, para assegurar sua eficiência a longo prazo, necessitam de conhecimentos básicos a respeito da movimentação e reprodução. Para plantas que expressam proteínas inseticidas, o manejo de pragas deve incluir a adoção de áreas de refúgio próximas das plantas transgênicas para permitir fluxo gênico entre insetos suscetíveis e resistentes. A distância máxima entre o cultivo transgênico e o refúgio leva em consideração o movimento e status sexual dos insetos, os quais não completamente compreendidos. O objetivo desse trabalho foi determinar métodos para se compreender a movimentação de adultos de *S. frugiperda*, bem como caracterizar o status sexual dos adultos e sua implicação na reprodução. O fornecimento de corantes hidrossolúveis à fase larval não foi efetivo para marcar os espermatóforos transferidos às fêmeas, embora tenha sido eficiente para a marcação de larvas. O estudo da movimentação em campo de milho demonstrou a chegada de adultos de *S. frugiperda* logo após a emergência de plantas de milho e início da oviposição que deu origem à primeira população desenvolvida na área. Ressalta-se que os primeiros adultos coletados na área incluíram um grande número de fêmeas acasaladas, mas nenhum inseto foi capturado quando as plantas entraram em estágio reprodutivo. No teste de voo tutorado, a capacidade de voo de *S. frugiperda* não foi afetada pelo status sexual dos adultos. Entretanto, a presença de feromônio aumentou o tempo de voo dos machos. O status sexual dos machos pode ser determinado diretamente por meio da dissecação ou indiretamente pela observação do espermatóforo transmitido à fêmea, embora esse fator não interfira na fertilidade de fêmeas acasaladas com machos previamente virgens ou acasalados. Esse estudo conclui que a presença de feromônio liberado por fêmeas desenvolvidas em área de refúgio apresentam potencial de atração aos machos potencialmente resistentes desenvolvidos em área Bt. Este estudo traz conhecimentos relacionados ao movimento e reprodução da lagarta-do-cartucho e pode ser útil para aprimorar os programas de manejo integrado de pragas e de resistência de insetos.

Palavras-chave: Dispersão, planta hospedeira, manejo integrado de pragas, manejo de resistência, status sexual, voo tutorado.

**ASPECTS OF THE ECOLOGY OF MOVEMENT AND REPRODUCTION AS
BASES FOR THE MANAGEMENT OF *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)
(Lepidoptera: Noctuidae)**

ABSTRACT – The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, is an important pest of agricultural crops worldwide. The management of this insect pest consists of some techniques whose long-term efficiency needs to be based upon basic knowledge about movement and reproduction. For insecticidal protein-expressing plants, pest management should include the adoption of refuge areas near to the transgenic plants to allow gene flow between susceptible and resistant insects. The maximum distance between the transgenic crop and its associated refuge area takes into consideration the movement and sexual status of insects which are not fully comprehended yet. The objective of this work was to determine methods to understand adult movement of *S. frugiperda* as well as to characterize the sexual status of adults and its implication in the reproduction. The supply of water-soluble dyes along with larval diet was not effective to mark the spermatophores transferred to females, although it was efficient for marking the larvae. The study of movement in a maize field showed the arrival of adults of *S. frugiperda* soon after the emergence of plants and onset of oviposition that gave rise to the first in-maize population developed. Interestingly, the first adults caught in the area included a large number of mated females, but no insects were captured when the plants entered the reproductive stage. During the tethered flight tests, the flight ability of *S. frugiperda* was not affected by the sexual status of adults. However, the presence of pheromone increased the flight time of males. The sexual status of males can be determined directly through dissection or indirectly by observing the spermatophore transferred to the female, although this factor does not affect the fertility of females mated with previously virgin or mated males. This study concludes that the presence of pheromone released by females developed in a refuge area has the potential to attract potentially resistant males developed in a Bt area. This study brings insights related to movement and reproduction of fall armyworm and can be useful to enhance both integrated pest management and insect resistance management programs.

Key-words: dispersal, host plant, Integrated pest management, resistance management, sexual status, tethered flight

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

O controle de insetos-praga é um dos grandes desafios vivenciados pelos produtores agrícolas, sobretudo referente a insetos altamente polívoros, como a lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) (Valicente, 2015). Esse inseto possui mais de 350 espécies vegetais como hospedeiras e está presente em quase todos os continentes (Georgen et al., 2016; He et al., 2021; Sun et al., 2021).

O melhoramento genético de plantas é uma das principais ferramentas utilizadas para o controle de *S. frugiperda* (ISAAA, 2019). A expressão de proteínas inseticidas por plantas denominadas Bt, decorrentes da inserção de parte do material genético da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt), ocasiona a morte da fase larval de *S. frugiperda*, principalmente dos ínstaros iniciais (Bravo, Likitvivatanavong e Soberón, 2011). Porém, devido à elevada variabilidade genética dos insetos, alguns indivíduos apresentam resistência genética natural e sobrevivem, mesmo expostos a altas doses da proteína inseticida (Fatoretto et al., 2017; Tabashnik e Carrière, 2017; Gilreath et al., 2021).

Para evitar a propagação do material genético desses insetos resistentes, o que daria origem a populações resistentes e reduziria a eficiência de controle dessa tecnologia, técnicas adicionais devem ser adotadas junto ao cultivo de plantas Bt, como é o caso da adoção de áreas de refúgio. Essas áreas são cultivadas com plantas de ciclo semelhante ao das plantas Bt, porém devem ser plantas que não expressem proteínas inseticidas, permitindo o desenvolvimento de insetos suscetíveis a essa ferramenta de controle (Fatoretto et al., 2017). O intuito de áreas de refúgio é de produzir insetos suscetíveis, que ao se acasalarem com possíveis resistentes, gerem indivíduos heterozigotos para a resistência, que são controlados pela expressão em alta dose das proteínas inseticidas.

Para a correta determinação da forma de condução das áreas de refúgio, deve-se compreender como ocorre a movimentação de insetos a campo. Vilarinho et al. (2011) capturaram insetos marcados que haviam sido liberados em lavoura de milho

a até 800 m de distância do ponto de liberação. A partir desse estudo ficou determinado que a distância máxima entre a área de refúgio e um ponto na área com plantas Bt seja de 800 m. Porém, o grande número de estudos com *S. frugiperda* não esclareceu ainda de que forma é feito o deslocamento dos adultos da espécie, ou seja, qual o status sexual dos insetos que se movimentam a maiores distâncias.

Uma das formas para determinar o deslocamento do material genético de *S. frugiperda* é a marcação do material genético no corpo dos machos e a captura de fêmeas a diferentes distâncias portando esse material. A marcação por cor do espermátóforo foi descrita por Sparks e Cheatam (1973) como sendo uma eficiente técnica para a marcação em massa de insetos, além de apresentar facilidade de avaliação. Assim, a liberação de insetos portando espermátóforos marcados em estudos de marcação-liberação-captura deve permitir determinar o deslocamento do material genético de machos de *S. frugiperda* em condições de campo.

À parte do deslocamento do material genético, a movimentação dos adultos de *S. frugiperda* a campo não é esclarecida, sobretudo em condições de cultivo intensivo, como é observado em algumas regiões no Brasil. A presença constante de plantas a campo gera a ponte verde, que permite a sucessão de insetos no tempo e no espaço, aumentando a população na área. Dessa forma, compreender o deslocamento do adulto por meio da coleta constante de insetos selvagens, desde o início da safra até a senescência das plantas permite observar a chegada e saída de insetos na área, informações essas valiosas para o manejo de sistemas.

Visando entender o comportamento dos insetos a campo com variáveis mais precisas de velocidade de voo e máximo deslocamento, estudos em condições controladas utilizando de estruturas para voo tutorado são realizados. Por meio de equipamentos denominados flight mill a distância, tempo e velocidade de voo dos insetos é determinada, permitindo comparar grupos de insetos em diferentes condições ambientais, que visam dar maior robustez aos resultados observados a campo, desde a resposta a estímulos quanto a comparação da capacidade de deslocamento.

Conforme o avanço da ciência, se faz necessário refinar as informações a respeito dos insetos, como caracterizar a capacidade de movimentação, a campo e condições controladas, de machos e fêmeas virgens e acasalados. Embora em

laboratório a obtenção da informação do status sexual é facilitada pelo isolamento de insetos de diferentes sexos, a campo a determinação deve ser realizada após a captura dos insetos. Nesse sentido, a observação do status sexual de fêmeas de *S. frugiperda* é largamente difundida pela presença de espermatóforos na bursa copulatrix, enquanto a determinação do status sexual do macho não é constantemente observada. Assim, a observação do status sexual dos machos, bem como as implicações do acasalamento de machos virgens ou previamente acasalados devem ser compreendidos.

Dessa forma, é necessário entender como ocorre a biologia da movimentação de *S. frugiperda* atrelada à ecologia do acasalamento e as implicações dessas informações na dinâmica de insetos nos sistemas de cultivo e na longevidade de umas das principais ferramentas de controle da praga. Portanto, o estudo teve por objetivo determinar técnica de marcação do material genético de machos de *S. frugiperda* como base para estudos de movimentação a campo, compreender a movimentação desses insetos em ambiente de produção de milho durante todo o ciclo da cultura, determinar a capacidade de voo dos adultos de *S. frugiperda* sob diferentes estímulos ambientais e, por fim, caracterizar os impactos do status de acasalamento dos machos sobre o ciclo de vida de *S. frugiperda*.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Importância econômica e aspectos bioecológicos de *Spodoptera frugiperda*

A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das principais pragas agrícolas mundiais. Originária das Américas, está atualmente distribuída na também na África, Europa e Ásia (Georgen et al., 2016; Sun et al., 2021). Trata-se, assim, de uma praga cosmopolita, mas também polífaga, que já foi relatada em mais de 350 plantas hospedeiras, embora tenha o milho como principal hospedeiro (Valicente, 2015; He et al., 2021).

O ciclo do inseto é de cerca de 30 dias de ovo a adulto. As massas de ovos contêm em média 200, mas podem alcançar até 1000 ovos, cujo período de incubação

é de aproximadamente três dias. As larvas, após eclosão, se alimentam por aproximadamente 15 dias e passam por seis ínstares larvais até se transformarem em pupa. A fase pupal dura de oito a dez dias. Os adultos de *S. frugiperda* vivem, em média 15 dias. Normalmente, a cópula ocorre a partir do segundo dia após a emergência, sendo a primeira postura realizada a partir do terceiro dia após a emergência (Lekha et al., 2020).

A atividade dos adultos de *S. frugiperda* ocorre, principalmente, no período noturno, a partir do crepúsculo e tem duração de seis a oito horas (Miranda-Anaya, Guevara-Fefer e García-Rivera, 2010). As mariposas apresentam voo disperso, denominado errante, não descrevendo uma linha direta (Garcia e Godoy, 2016). Os principais estímulos de movimentação para a mariposa são voláteis de plantas, feromônio sexual (para o macho), luminosidade e fonte alimentar (Robinet, David e Jactel, 2019).

A relação prejudicial inseto-planta se dá na fase larval, em que o inseto se alimenta de material vegetal, podendo ocasionar perdas de mais de 50% na cultura do milho (Valicente, 2015). O hábito polífago desse inseto beneficiou sua adaptação a outras culturas de grande interesse econômico, como soja e algodão. A intensificação do cultivo durante todo o ano faz com que esses insetos tenham recurso alimentar durante todo o período e passem a ser pragas de importância também para essas culturas.

1.2.2 Ecologia de insetos

Ecologia é o estudo da distribuição e abundância de organismos e das interações que os determinam (Price et al., 2011; Begon et al., 2006). Os principais focos de estudos ecológicos são o indivíduo, a população e a comunidade. É uma área do conhecimento que permite compreender a interação dos organismos com o ambiente, a flutuação do número de indivíduos em uma população e composição e organização de comunidades ecológicas (Begon et al., 2006).

1.2.2.1 Dispersão de insetos

Dispersão é um termo que se refere ao movimento de afastamento inicial de determinado local. Ocorre pela capacidade dos insetos de escapar de condições adversas e procurar condições ótimas, como temperatura, umidade, em novos ambientes (Schowalter, Noriega e Tschardtke, 2018). Esse comportamento reduz os riscos de extinção de toda a população em condições de ausência de recursos, além de permitir a exploração de outros recursos e maximizar a heterogeneidade genética (Wellington, 1980; Schowalter, 1985; Johnson, 2004).

A dispersão pode ocorrer de maneira passiva ou ativa (Begon et al., 2006). A ativa, mais comum entre os insetos, é caracterizada pela dispersão de exploração, buscando por habitats favoráveis ao seu desenvolvimento. Pode ser limitada ao entorno, marcada pelo caminhar aleatório do indivíduo, como o realizado por larvas recém eclodida, as quais movimentam para longe da massa de ovos da qual eclodiram (Southwood e Henderson, 2000). Também, pode representar a mudança de área e tem a possibilidade de gerar nova população, isolada pela localidade.

A capacidade de encontrar ambiente favorável para o desenvolvimento é dependente do modo de dispersão, sendo três mecanismos gerais de dispersão: aleatório, forético e direcionado (Schowalter, Noriega e Tschardtke, 2018). O caminhar aleatório é característico de insetos de pequeno porte que não se orientam por pistas encontradas no ambiente, como voláteis de plantas. Esse padrão é observado em larvas de lepidópteros de ínstaes iniciais, que se utilizam do vento, por meio da produção de fio de seda, para a dispersão, denominado “*ballooning*” (Zalucki, Clarke e Malcolm, 2002).

O mecanismo do tipo forésia é comum entre insetos ápteros, que se utilizam de outros animais para a dispersão. É um mecanismo dependente da dispersão de outras espécies. Dessa forma, esse mecanismo depende da associação de duas espécies que vivem em um mesmo ambiente e que se utilizam de mesma fonte de recursos alimentares (Schowalter, Noriega e Tschardtke, 2018). A dispersão direcionada é aquela que apresenta maior probabilidade de sucesso na colonização de novo ambiente, pois é realizada, em sua maioria, por insetos voadores que se

orientam na direção de recursos adequados. A orientação é privilegiada pela emissão de voláteis pelos primeiros insetos, da mesma espécie, a ocuparem a área.

1.2.2.2 Marcação de insetos

Nos estudos de dispersão, em geral, um grupo de insetos é avaliado em relação à movimentação num espaço de tempo determinado. Para tanto, esses insetos precisam ser devidamente identificados para permitir a distinção daqueles já presentes na natureza. Assim, técnicas como a Marcação – Liberação – Captura (MLC) e a Captura – Marcação – Recaptura (CMR) têm sido bastante utilizadas para esse fim (Gangwere, Chavin e Evans, 1964; Southwood e Henderson, 2000; Svensson et al., 2011; Hagler, Machtley e Blackmer, 2014).

Com o desenvolvimento das técnicas de marcação, foram estabelecidos critérios a serem seguidos para que o meio de marcação utilizado não seja prejudicial para os estudos de movimentação. A marcação deve ser de fácil e rápida aplicação e avaliação, capaz de marcar grande número de insetos, não pode ser perdida para o ambiente ou ser transferível entre insetos, dure pelo período necessário para a realização do estudo e que, principalmente, não afete a biologia ou interação do inseto com o ambiente (Gangwere; Chavin; Evans, 1964; Southwood e Henderson, 2000; Svensson et al., 2011).

As técnicas de marcação podem ser divididas em dois grupos: marcação externa e marcação interna dos insetos. A marcação externa foi a primeira a ser desenvolvida e foi utilizada para a marcação isolada de alguns indivíduos (Severin e Hartung, 1912). Ela pode ser feita pela marcação física ou mecânica, diretamente no corpo do inseto, como a retirada de tarsos ou corte do tegumento. A marcação também pode ser realizada por coloração, utilizando pó seco, spray ou tintas. O uso da coloração tem a vantagem de permitir a marcação em larga escala ou individual e é de fácil avaliação. A principal desvantagem, no entanto, é a possibilidade de afetar órgãos sensoriais, como antenas e pelos sensores, interferindo na relação do inseto com o ambiente (Southwood e Henderson, 2000; Hagler e Jackson, 2001) e, desse modo, podendo afetar o comportamento. A marcação externa também pode ser realizada com etiquetas, fixadas ao inseto. O material utilizado como etiqueta pode

variar com o objetivo do estudo, variando entre tiras de papel e chips que enviam o posicionamento em tempo real para leitores de telemetria (Gangwere; Chavin; Evans, 1964; Southwood; Henderson, 2000; Wang, Huang e Pierce, 2019).

A marcação interna é obtida por meio da alimentação das larvas, ninfas ou adultos, ou, ainda, pela injeção de corantes diretamente na hemolinfa. Ressalta-se que a marcação pode, eventualmente, ser transferida entre estágios de vida. Nesses casos, a alimentação dos imaturos com corantes permite a marcação de adultos em larga escala. Para tanto, a determinação do corante e dose mais eficientes é imprescindível, pois altas doses podem alterar de forma significativa a biologia do inseto (Vail; Howland; Henneberry, 1966; Hendricks e Graham, 1970; Hunt et al., 2000; Vilarinho et al., 2006). Os insetos também podem ser marcados internamente com elementos raros na natureza. A incorporação de elementos como rubídio (Rb), estrôncio (Sr), célio (Cs), e o nitrogênio na forma de ^{15}N diferenciam os insetos daqueles selvagens (Hershey et al., 1993; Fernandes et al. 1997; Hagler; Jackson, 2001; Benedict et al. 2018). Algumas desvantagens dessa técnica são o elevado custo de avaliação e o baixo tempo de retenção de alguns elementos pelos insetos (Fleischer et al., 1986; Guillebeau et al., 1993; Benedict et al. 2018), que podem inviabilizar estudos de longo prazo.

Com o desenvolvimento científico, possibilitou-se o uso de outras técnicas de marcação, como o uso de marcadores imunológicos e proteínas, bem como a edição genética com o objetivo de alterações fenológicas, técnicas que permitem a marcação em larga escala, além da auto marcação (Hagler et al., 1992; Macdonald e Loxdale, 2004). São técnicas que apresentam elevada persistência e facilidade de avaliação dos insetos marcados, mas que podem apresentar elevado custo em alguns casos.

1.2.2.3 Voo tutorado

Embora a dispersão possa ser determinada por estudos a campo utilizando a marcação dos insetos, a estimativa da capacidade de dispersão dos insetos fica limitada a experimentos de elevados custos e tempo de execução. Assim, para determinar a dinâmica de movimentação de insetos, estabelecendo tratamentos, foram desenvolvidas ferramentas para avaliar parâmetros em voo tutorado (Minter et

al., 2018). Para isso, os insetos são tutorados – fixados – em equipamentos chamados “flight mills”, que anulam o movimento vertical, fazendo com que o impulso gerado pela batida de asa dos insetos gere movimento horizontal circular (Naranjo, 2019).

A fixação dos insetos se dá pelo mesonoto, utilizando de substâncias adesivas, como colas instantâneas (Caixeta, 2014). O equipamento, ligado a sensores que captam o movimento da haste horizontal em que os insetos estão tutorados, determina a distância voada, velocidade e duração do voo (Naranjo, 1990; Minter et al., 2018). Esses dados permitem estimar a capacidade de voo de insetos em diferentes cenários, que devem ser comparados, gerando importantes informações para compreender a dinâmica de voo dos adultos. Porém, esses dados não podem ser extrapolados para situações de campo, em que os insetos são expostos a outros estímulos, podendo acasalar, pousar e, no caso das fêmeas, ovipositar (Gatehouse e Woodrow, 1987). Ainda, o inseto não necessita gerar sustentação vertical o que pode superestimar a sua capacidade de voo (Minter et al., 2018).

O estímulo natural para o início do voo é a perda de contato dos tarsos com a superfície. Esse princípio é observado no primeiro voo dos insetos em “flight mill”. Porém, os voos seguintes não têm esse estímulo, pois os insetos não têm substrato sobre o qual possam pousar. A continuidade do voo, após iniciado, é dada pela passagem de vento pelo corpo durante o voo rotacional (Naranjo, 2019).

Um dos principais ganhos ao utilizar a técnica de comparação de capacidade de voo é a aplicação de fatores externos e únicos, isolando demais fatores e observando a resposta dos insetos. As variáveis alteradas podem ser ambientais, como temperatura, luminosidade, umidade relativa e presença de voláteis que estimulem ou inibam o voo, ou ainda alterações entre grupos de insetos, como a observação de insetos marcados e não marcados, machos e fêmeas ou ainda o status de acasalamento (Avalos et al., 2014; Caixeta, 2014).

1.2.3 Fisiologia do acasalamento

O acasalamento é uma base ecológica muito explorada para compreender o surgimento de populações, espécies e variabilidade genética. Um dos objetivos dessa linha de estudos é determinar como ocorre o comportamento de acasalamento dos

insetos em condições naturais, relacionando com condições ambientais (Price et al., 2011).

Várias são as formas de determinar o acasalamento, como a observação direta da cópula ou da eclosão de descendentes e ainda o uso de mutações genéticas para a comprovação da transferência de material genético de um determinado macho (Mann et al., 2011). Essas técnicas exigiam o acompanhamento dos insetos, o que se mostra um desafio em condições naturais, ou demandam elevado custo. Para contornar esses pontos, o estudo da fisiologia determinou que a presença da estrutura reprodutiva dos machos dentro do aparelho reprodutor feminino não só comprova o acasalamento, como determina a quantidade de cópulas realizadas pela fêmea (Callahan, 1958, 1960; Callahan e Chapin, 1960; Callahan e Cascio, 1963). Vale a ressalva que, embora a maioria das cópulas resultem na passagem de um espermatozóide do macho para a fêmea, nem sempre isso ocorre, podendo ser transmitidos dois ou, eventualmente, nenhum espermatozóide (Scudder, 1971; Oliva et al., 2013).

Dessa forma, em condições laboratoriais, em que casais são acondicionados isoladamente em uma gaiola de criação, a presença de espermatozóide na bursa copulatrix das fêmeas não só confirma o status sexual das fêmeas, mas também dos machos, pois o acasalamento é marcado pela passagem do material genético do macho, contido na estrutura denominada espermatozóide, para a fêmea. Como o espermatozóide é formado no momento do acasalamento, ele só é observado no corpo de fêmea após a cópula. Ao avaliar esses machos, Snow (1967) observou diferenças na morfologia interna ao compará-los a machos criados na ausência de fêmeas. Os ductos ejaculatórios, local onde o frênulo dos espermatozoides é formado, apresentou coloração amarelo-avermelhado em machos na ausência de fêmeas e, portanto, virgens (Callahan, 1958). Porém, essa coloração não foi observada em machos acasalados. Dessa forma, essa diferença permite a determinação do status sexual de machos de forma direta.

Assim, o estudo de status de acasalamento de insetos selvagens, ou daqueles liberados em estudos de marcação, capturados na natureza é viabilizado pela observação em machos e fêmeas, gerando importante resposta para estudos ecológicos.

1.3 REFERÊNCIAS

- Avalos JA, Marti-Campoy A, Soto A (2014) Study of the flying ability of *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Dryophthoridae) adults using a computer-monitored flight mill. **Bulletin of Entomological Research** 104:462–470.
- Begon M, Townsend CR, Herper JL (2006) **Ecology: from individuals to ecosystems**. Oxford, UK:Blackwell Publishing, 759p.
- Benedict MQ, Charlwood JD, Harrington LC, Lounibos LP, Reisen WK, Tabachnick, W. J (2018) Guidance for evaluating the safety of experimental releases of mosquitoes, emphasizing mark-release-recapture techniques. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 18:39-48.
- Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, e Soberón M (2011) *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. **Insect biochemistry and molecular biology**, 41:423-431.
- Caixeta DF (2014) **Marcação, voo tutorado e dispersão de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Erebidiae) e *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 83 f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Unesp, Jaboticabal.
- Callahan PS (1960) **A morphological study of spermatophore placement and mating in the subfamily *Plusiinae* (Noctuidae, Lepidoptera)**. Proc. 11th International Congress of Entomology. 4:339-45.
- Callahan PS (1958) Behavior of the imago of the corn earworm, *Heliothis zea* (Boddie), with special reference to emergence and reproduction. **Annals of the Entomological Society of America** 51:271-283.
- Callahan PS, Cascio T (1963) Histology of the reproductive tracts and transmission of sperms in the corn earworm, *Heliothis zea*. **Annals of the Entomological Society of America**. 56: 535—56.
- Callahan PS, Chapin JB (1960) Morphology of the reproductive systems and mating in two representative members of the family Noctuidae, *Pscudaletia unipuncta* and *Peridroma margaritosa*, with comparison to *Heliothis* sea. **Annals of the Entomological Society of America** 53:763-82.
- Fatoretto JC, Michel AP, Silva Filho MC, Silva N (2017) Adaptive potential of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) limits Bt trait durability in Brazil. **Journal of Integrated Pest Management** 8:17.
- Fernandes OA, Wright RJ, Baumgarten KH, Mayo ZB (1997) Use of rubidium to label *Lysiphlebus testaceipes* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of greenbugs (Homoptera: Aphididae), for dispersal studies. **Environmental entomology**, 26:1167-1172.
- Fleischer SJ, Gaylor MJ, Hue NV, Graham LC (1986) Uptake and elimination of rubidium, a physiological marker, in adult *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). **Annals of the Entomological Society of America** 79:19–25.

Gangwere SK, Chavin W, Evans FC (1964). Methods of marking insects, with especial reference to Orthoptera (Sens. Lat.). **Annals of the Entomological Society of America**, 57:662-669.

Garcia AG, Godoy WAC (2017) A theoretical approach to analyze the parametric influence on spatial patterns of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) populations. **Neotropical Entomology**, 46:283-288.

Gatehouse AG, Woodrow KP (1987) Simultaneous monitoring of flight and oviposition of individual velvetbean caterpillar moths (by Wales, Barfield e Leppla, 1985): a critique. **Physiological entomology** 12:117-121.

Georgen G, Kumar PL, Sankung SB, Togola A, Tamò M (2016) First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (JE Smith)(Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. **PloS one** 11:e0165632.

Gilreath RT, Kerns DL, Huang F, Yang F (2021) No positive cross-resistance to Cry1 and Cry2 proteins favors pyramiding strategy for management of Vip3Aa resistance in *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science** 77:1963-1970.

Guillebeau LP, All JN, Nutter FW, Kuhn C (1993) Comparison of foliar and soil drench applications of aqueous rubidium chloride solution to plants for marking feeding aphids (Homoptera: Aphidae). **Journal of Entomological Science**, 28:370–75.

Hagler JR, Cohen AC, Bradley-Dunlop D, Enriquez FJ (1992) New approach to mark insects for feeding and dispersal studies. **Environmental Entomology** 21:20–25.

Hagler JR, Jackson CG (2001) Methods for marking insects: current techniques and future prospects. **Annual review of entomology** 46:511-543.

Hagler JR, Naranjo SE, Machtley SA, Blackmer F (2014) Development of a standardized protein immunomarking protocol for insect mark–capture dispersal research. **Journal of Applied Entomology**, 138:772-782.

He LM, Zhao SY, Gao XW, Wu KM (2021). Ovipositional responses of *Spodoptera frugiperda* on host plants provide a basis for using Bt-transgenic maize as trap crop in China. **Journal of Integrative Agriculture**, 20:804-814.

Hendricks DE, Graham HM (1970) Oil-soluble dye in larval diet for tagging moths, eggs, and spermatophores of tobacco budworms. **Journal of Economic Entomology**, 63:1019-1020.

Hershey AE, Pastor J, Peterson BJ, Kling GW (1993) Stable isotopes resolve the drift paradox for Baetis mayflies in an arctic river. **Ecology** 74:2315–25.

Hunt TE, Hellmich RL, Dyer JM, Higley LG, Witkowski J (2000) Oil-soluble dyes for marking European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). **Journal of Entomological Science**, 35:338.

ISAAA (2019) ISAAA 2019 Accomplishment report 40p. GM Crops.

Johnson DM (2004) Life history and demography of *Cephaloleia fenestrata* (Hispiinae: Chrysomelidae: Coleoptera). **Biotropica** 36:352–361.

Lekha, M. K., Mahla, H., Swami, A. K., & Vyas, A. K. (2020). Biology of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) on different artificial diets. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, 8:584-586.

MacDonald C, Loxdale H (2004) Molecular markers to study population structure and dynamics in beneficial insects (predators and parasitoids). **International Journal of Pest Management** 50:215-224.

Mann RS, Pelz-Stelinski K, Hermann SL, Tiwari S, Stelinski LL (2011) Sexual Transmission of a Plant Pathogenic Bacterium, *Candidatus Liberibacter asiaticus*, between Conspecific Insect Vectors during Mating. **PLoS ONE** 6:e29197.

Minter M, Pearson A, Lim KS, Wilson K, Chapman JW, Jones CM (2018) The tethered flight technique as a tool for studying life-history strategies associated with migration in insects. **Ecological entomology** 43:397-411.

Miranda-Anaya M, Guevara-Fefer P, García-Rivera BE (2002) Circadian locomotor activity in the larva and adult fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae): Effect of feeding with the resistant variety of maize CML67. **Biological rhythm research**, 33:475-486.

Naranjo SE (1990) Influence of two mass-marking techniques on survival and flight behavior of *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Economic Entomology** 83:1360-1364.

Naranjo SE (2019) Assessing insect flight behavior in the laboratory: a primer on flight mill methodology and what can be learned. **Annals of the Entomological Society of America** 112:182-199.

Oliva CF, Damiens D, Vreysen MJ, Lemperi re G, Gilles J (2013) Reproductive strategies of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and implications for the sterile insect technique. **PLoS One** 8:e78884.

Price PW, Denno RF, Eubanks MD, Finke DL, Kaplan I (2011) **Insect ecology: behavior, populations and communities**. Cambridge: Cambridge University Press, 829p.

Robinet C, David G, Jactel H (2019) Modeling the distances traveled by flying insects based on the combination of flight mill and mark-release-recapture experiments. **Ecological Modelling**, 402:85-92.

Schowalter TD (1985) Adaptations of insects to disturbance. In: Pickett STA, White PS (Eds) **The Ecology of Natural Disturbance and Patch Dynamics** pp. 235–252. Academic Press: Orlando, FL.

Schowalter TD, Noriega JA, Tscharrntke T (2018) Insect effects on ecosystem services—Introduction. **Basic and Applied Ecology** 26:1-7.

Scudder GGE (1971) Comparative morphology of insect genitalia. **Annual Review of Entomology** 16:379-406.

Severin HH, Hartung WJ (1912) The flight of two thousand marked male Mediterranean fruit flies (*Ceratitidis capitata* Wied.). **Annals of the Entomological Society of America** 5:400-407.

Snow JW, Carlysle TC (1967) A characteristic indicating the mating status of male fall armyworm moths. **Annals of the Entomological Society of America** 60:1071-1074.

Southwood TRE, Henderson PA (2009) **Ecological methods**. Oxford, UK:Blackwell Publishing, 593p.

Sparks MR, Cheatham JS (1973) Tobacco hornworm: marking the spermatophore with water-soluble stains. **Journal of Economic Entomology** 66:719-722.

Sun, XX, Hu CX, Jia HR, Wu QL, Shen XJ, Zhao SY, Jiang YY, Wu KM (2021) Case study on the first immigration of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* invading into China. **Journal of Integrative Agriculture**, 20:664-672.

Svensson GP, Sahlin U, Brage B, Larsson MC (2011) Should I stay or should I go? Modelling dispersal strategies in saproxylic insects based on pheromone capture and radio telemetry: a case study on the threatened hermit beetle *Osmoderma eremita*. **Biodiversity and conservation**, 20:2883-2902.

Tabashnik BE, Carrière Y (2017) Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nature Biotechnology** 35:926-935.

Vail PV, Howland AF, Henneberry TJ (1966) Fluorescent Dyes for Mating and Recovery Studies with Cabbage Looper Moths1. **Journal of Economic Entomology** 59:1093–1097.

Valicente, FH (2015) **Manejo integrado de pragas na cultura do milho**. Embrapa: Sete Lagoas (Circular técnica nº 208). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/125260/1/circ-208.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2022.

Vilarinho EC, Fernandes OA, Hunt TE, Caixeta DF (2011) Movement of *Spodoptera frugiperda* adults (Lepidoptera: Noctuidae) in Maize in Brazil. **Florida Entomologist** 94:480-488.

Vilarinho EC, Fernandes OA, Omoto C, Hunt TE (2006) Oil-soluble dyes for marking *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology** 99:2110-2115.

Wang, Z., Huang, Y., e Pierce, N. E. (2019). Radio telemetry helps record the dispersal patterns of birdwing butterflies in mountainous habitats: Golden Birdwing (*Troides aeacus*) as an example. **Journal of Insect Conservation**, 23:729-738.

Wellington WG (1980) Dispersal and population change. In: **Dispersal of Forest Insects: Evaluation, Theory and Management Implications**. Proceedings of the International Union of Forest Research Organizations Conference (A.A. Berryman e L. Safranyik, Eds.), pp. 11–24. Washington State University Cooperative Extension Service, Pullman, WA.

Zalucki MP, Clarke AR, Malcolm SB (2002) Ecology and behavior of first instar larval Lepidoptera. **Annual review of entomology**, 47: 361-393.

CAPÍTULO 2 – MARCAÇÃO DE ESTRUTURAS INTERNAS DE IMATUROS E ADULTOS DE LEPIDOPTERA VIA ALIMENTAÇÃO LARVAL

RESUMO – A compreensão da ecologia de insetos tem elevada aplicabilidade na relação entre insetos-praga e as formas de controle. Um exemplo é o uso de estudos de dispersão para a determinação de distância máxima entre áreas de refúgio em cultivos Bt. Buscando refinar a técnica de estudos de dispersão do material genético de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), o presente estudo teve por objetivo determinar a eficiência de corantes hidrossolúveis para a marcação interna de imaturos e adultos de *S. frugiperda* via alimentação larval, com ênfase na marcação do espermatóforo, estrutura que carrega o material genético dos insetos machos. Para isso, os corantes hidrossolúveis Rodamina B, Azul de Metileno, Ponceau, Coomassie e Eosina – Nigrosina foram adicionados à dieta artificial de larvas nas concentrações de 0, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 ppm. Avaliou-se os efeitos do corante sobre a mortalidade e duração do estágio larval, bem como a eficiência de marcação de estruturas internas em larvas e adultos. O corante Rodamina B aumentou tanto mortalidade quanto desenvolvimento larval, enquanto Azul de Metileno aumentou apenas a duração do período larval. A marcação do intestino, hemolinfa e discos imaginiais, na fase larval, foi constatada para os corantes Rodamina B, Azul de Metileno e Coomassie. Os corantes não foram eficientes para a marcação dos espermatóforos. Dessa forma, a adição de corantes hidrossolúveis à dieta larval de *S. frugiperda* é capaz de marcar estruturas internas da larva, mas a marcação não é transferida para o adulto.

Palavras-chave: fluxo gênico, áreas de refúgio, corantes hidrossolúveis

2.1 INTRODUÇÃO

Dentre as principais estratégias para o manejo de pragas agrícolas, a resistência de plantas por meio da expressão de proteínas inseticidas se destaca em eficiência, o que justifica sua crescente adoção em áreas de cultivo em todo o mundo (ISAAA, 2019). Todavia, a disponibilidade de poucas variedades de proteínas inseticidas e o uso intensivo destas plantas tem causado o desenvolvimento de populações de insetos resistentes a essa tática de controle (Bentivenha et al., 2019). Assim, para assegurar a durabilidade da tecnologia, é necessário que o manejo dos insetos resistentes, como parte dos programas de manejo integrado de pragas, seja realizado e, para tanto, deve haver diversificação das estratégias de manejo.

A alta pressão de seleção dessa tecnologia, largamente utilizada no Brasil desde 2005 (Brasil, 2005), possibilitou a seleção de insetos resistentes rapidamente. Este foi o caso da lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), cuja população desenvolveu resistência a proteína Cry1F de *Bacillus thuringiensis* expressa em híbridos de milho em apenas quatro anos após a liberação da tecnologia (Farias et al., 2014; Monnerat et al., 2015).

Visando minimizar o desenvolvimento de populações resistentes, algumas estratégias de manejo foram desenvolvidas, com destaque para a adoção de áreas de refúgio, cultivo de plantas que expressem as proteínas inseticidas em altas doses (capaz de controlar 95% dos indivíduos heterozigotos) e a piramidação de proteínas (Fatoretto et al., 2017; Tabashnik e Carrière, 2017; Gilreath et al., 2021). A adoção de áreas de refúgio tem por objetivo principal a manutenção de insetos suscetíveis à tecnologia Bt, ou seja, que não entraram em contato com plantas que expressam proteínas inseticidas e, assim, com menor ou nenhuma frequência dos alelos de resistência (Ortego et al., 2009). Entretanto, para que esta estratégia seja eficiente, a localização das áreas de refúgio deve ser próxima às áreas de cultivo de material Bt, para que viabilize maior taxa de acasalamento entre insetos resistentes e suscetíveis. A distância máxima estabelecida entre áreas de refúgio e plantas de milho Bt é de 800 m tanto para *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Crambidae) em cultivos de milho nos Estados Unidos (Showers et al., 2001), como para *S. frugiperda* (Vilarinho et al., 2011) no Brasil.

A determinação da distância máxima entre áreas de refúgio e o ponto mais distante em cultivo Bt considera a capacidade de dispersão de insetos, que, de modo geral, é determinada pela junção da técnica de marcação de insetos a técnica de Marcação – Liberação – Captura. Nessa técnica, libera-se a campo insetos marcados criados em laboratório, sendo a captura realizada a diferentes distâncias do ponto de liberação, o que permite determinar a distância percorrida pelo inseto. Dessa forma, a marcação permite reconhecer o inseto liberado e diferenciá-lo dos insetos selvagens, permitindo assim a avaliação da capacidade de movimentação do indivíduo. Portanto, o sucesso dos estudos de movimentação se devem, em parte, à capacidade de marcação do inseto, que pode ser feita de forma externa ou interna (Gangwere et al., 1964; Southwood, 1978; Hagler e Jackson, 2001).

A marcação interna de insetos é uma técnica altamente recomendada para estudos a campo, visto que não é transferível de inseto para inseto durante o contato e tem baixa taxa de perda por fatores como chuva ou vento (Southwood, 1978). Porém, pode apresentar desafios para se adequar aos requisitos de eficiência da marcação. Idealmente, os corantes devem propiciar fácil marcação e a avaliação de grande número de insetos sem a necessidade de equipamentos sofisticados, mínima manipulação do inseto, facilidade de distinção dos indivíduos selvagens, persistência pelo período de estudo e não afetar a biologia ou comportamento do inseto (Gangwere et al., 1964; Hagler e Jackson, 2001). Ainda, deve-se considerar os corantes com menores taxas de excreção (Nijhout, 1975; Southwood, 1978; Hagler e Jackson, 2001).

A marcação de estruturas internas do adulto permite fazer inferências importantes a respeito da dispersão do material genético. A marcação da estrutura contendo os espermatozoides (espermatóforo), que é transferida do macho para a fêmea durante a cópula permite, por exemplo, identificar de qual grupo de machos provém cada espermatóforo. Assim, conhecendo o ponto de liberação dos insetos marcados é possível traçar a distância em que ocorre o fluxo gênico. Estudo de dispersão de adultos de *S. frugiperda* via marcação interna por corantes lipossolúveis, embora tenha determinado a capacidade de dispersão dos insetos, não pode afirmar sobre a dispersão do material genético, por não ter avaliado a presença de espermatóforos nas fêmeas capturadas (Vilarinho et al., 2011).

Em razão das importantes inferências possíveis a partir da marcação dos espermatóforos, essa técnica tem o potencial de readequar a estruturação de áreas de refúgio em cultivos comerciais de milho. Diante deste cenário, o presente estudo teve por objetivo avaliar a eficiência de corantes hidrossolúveis na marcação de estruturas internas de larvas e adultos de *S. frugiperda*, sobretudo os espermatóforos, pelo fornecimento de corantes junto à dieta artificial oferecida na fase larval.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Insetos

Para a instalação dos ensaios, foram utilizadas larvas de *S. frugiperda* provenientes de posturas obtidas em criação de insetos. A população foi inicialmente coletada em milho e mantida por aproximadamente 10 anos sem a reintrodução de insetos de campo e, portanto, não tem a presença de alelos de resistência às proteínas inseticidas (dados não publicados). As posturas foram lavadas em solução de 10% de formol, água destilada e solução de sulfato de cobre a 1% e colocadas em pote plástico (COPAZA®) de 100 mL tampados. Após a eclosão, as larvas foram alimentadas com 4 cm³ de dieta artificial a base de feijão (Vilela et al., 2014) e mantidas em condições ambientais controladas (25 ± 2°C; UR 70 ± 10%; Fotofase 12h).

2.2.2 Ensaios de marcação

Para a condução do experimento foram adicionados corantes hidrossolúveis à dieta padrão para alimentação de larvas em criação de insetos (Vilela et al., 2014). Essa via de marcação foi proposta para possibilitar a marcação de um maior número de insetos e viabilizar estudos de campo, nos quais adultos recém emergidos são liberados. Para isso, 250 mL de dieta foram vertidos em recipientes plásticos de 500 mL (12 cm x 12 cm x 5 cm). Sobre a dieta ainda em estado líquido, foram adicionados volumes específicos dos corantes avaliados.

Os corantes sólidos foram diluídos em 10 mL de água destilada, para propiciar melhor incorporação à dieta, enquanto os corantes líquidos foram adicionados à dieta sem diluição prévia em água. Após a incorporação do corante, a dieta foi homogeneizada utilizando espátula, em movimentos circulares até atingir coloração homogênea. Posteriormente, a dieta foi mantida sob luz UV por 60 min em sala a temperatura ambiente. Após este período, a dieta foi transferida refrigerador (18°C) para solidificação.

A instalação dos ensaios ocorreu com larvas de terceiro ínstar, que corresponde a cerca de oito dias após a eclosão. Essa metodologia foi empregada devido aos resultados obtidos em testes preliminares, que apontaram maior mortalidade de larvas recém eclodidas quando alimentadas com dietas contendo corantes. Assim, as larvas foram individualizadas em placas de Petri (6 cm diâmetro x 2 cm altura) contendo 4 cm³ de dieta com corante, de acordo com o tratamento estabelecido (corante e concentração).

Os corantes utilizados no experimento foram estabelecidos a partir de estudos já realizados, nos quais os corantes foram eficientes para a marcação de espermátforo ou proteína, principal unidade constituinte do espermátforo (Heller et al., 1998), conforme segue:

a) Rodamina B (Sigma-Aldrich): apresenta coloração variando entre vermelho e rosa, foi eficiente para a marcação interna de adultos de *Heliothis virescens* (Noctuidae), *Aedes aegypti* (Culicidae), *Anopheles gambiae* (Culicidae) e *Manduca sexta* (Sphingidae) (Sparks e Cheatham, 1973; Blanco et al., 2006a; Johnson et al., 2017; Aviles et al., 2020).

b) Azul de Metileno (Sigma-Aldrich): possui coloração azul e é citado como eficiente para a marcação interna de adultos de *Manduca sexta* (Sphingidae) e *Norileca indica* (Crustacea) (Sparks e Cheatham, 1973; Kottarathil e Kappalli, 2019).

c) Eosina – Nigrosina (BotuVITAL® – Botupharma): capaz de corar tanto em verde (Eosina) quanto de preto (Nigrosina), considerando seus componentes em isolado. Embora não tenha sido utilizado anteriormente para a marcação de insetos, foi eficiente para a marcação, em lâmina, de espermatozoides de *Pecari tajacu* (Artiodactyla) e *Mus* spp. (Rodentia) (Sousa et al., 2013; Mazaheri et al. 2020).

d) Ponceau Red (Sigma-Aldrich): corante de coloração vermelha, foi utilizado para a marcação de insetos, como o cérebro de *Apis mellifera* (Apidae) e bandas de proteína (Almeida Rossi et al., 2013; Venkatesha et al., 2013).

e) Coomassie: corante largamente utilizado em gel de eletroforese (Noaman e Coorssen, 2018).

As concentrações utilizadas foram 0, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 ppm. Isso se deve aos resultados apresentados por Sparks e Cheatham (1973) e Vilarinho et al. (2006), que observaram marcação de insetos, sem afetar sua biologia, em doses de 1000 ppm (injetado no adulto) e 400 ppm (via alimentação larval), respectivamente.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 100 repetições por tratamento (concentração), sendo cada parcela experimental representada por uma placa de Petri contendo um inseto (repetição). Os insetos foram mantidos em sala climatizada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$; UR $70 \pm 10\%$; Fotofase 12h). Os corantes foram avaliados separadamente, de forma que no total foram conduzidos cinco ensaios.

Após o estágio larval, todas as pupas provenientes de um mesmo tratamento foram armazenadas em uma única gaiola de acasalamento, constituída de um tubo de Policloreto de Vinila - PVC (20 cm altura x 10 cm diâmetro) revestido internamente de papel sulfite, que foi utilizado como substrato para oviposição. Sobre cada gaiola foram dispostos recipientes contendo chumaços de algodão hidrofílico embebido em solução de água destilada e mel (10%) para alimentação dos adultos. Após a emergência, os adultos foram mantidos em gaiola por sete dias, momento em que foi realizada a avaliação da marcação interna. Esse período permite a confirmação visual do acasalamento e a observação das primeiras posturas, assegurando a transferência de espermatóforos para as fêmeas (Wang et al., 2020; Ge et al., 2021).

2.2.3 Avaliações

A determinação dos efeitos dos corantes na biologia dos insetos foi realizada pela avaliação de mortalidade e duração do estágio larval. A mortalidade foi confirmada pela observação das larvas e teste de reação destas ao leve toque com pincel de cerdas finas. Larvas que se moveram ao toque do pincel foram consideradas vivas.

A avaliação da marcação dos órgãos internos nas larvas foi feita pela observação direta da alteração de coloração. A observação da alteração da coloração do intestino foi possível sem a dissecação dos insetos, com a observação da larva ventralmente, de forma que a coloração da estrutura foi visível. A observação da hemolinfa se deu no momento da dissecação, realizada em cinco larvas de sexto ínstar para cada tratamento. Com o auxílio de pinças de ponta reta (ESD-12), o tegumento dos insetos foi rompido próximo ao último par de falsas pernas abdominais, para a observação da hemolinfa. Durante a dissecação, observou-se ainda a coloração dos discos imaginais. Os discos imaginais retirados de insetos alimentados com dieta artificial contendo corante foram comparados aos obtidos dos insetos controle. Foram descritos como marcados os discos imaginais de coloração visivelmente diferente do padrão (tratamento controle).

Nos insetos adultos, a dissecação de fêmeas foi realizada com o auxílio de pinças, retirando a porção final do abdômen e extraíndo a bursa copulatrix, estrutura que contém os espermatóforos. Para seguir com a avaliação visual, a bursa copulatrix foi rompida e os espermatóforos retirados e colocados em placa de Petri (6 cm diâmetro x 2 cm altura) contendo água destilada. A observação foi feita em estereomicroscópio em aumento de 10 x. A marcação do espermatóforo foi determinada por análise visual, sendo os espermatóforos dos tratamentos com corante comparados aos espermatóforos do tratamento controle. A marcação foi constatada quando observada coloração, na mesma cor do corante ofertado em alimentação da fase larval.

2.2.4 Análise estatística

Os dados de mortalidade e duração do estágio larval para os corantes testados foram submetidos a análise de variância pelo teste de F (ANOVA – ExpDes.pt Package). Para a característica mortalidade procedeu-se a correção de Abbott, para correção da mortalidade natural observada no controle (sem adição de corante). A comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey a 0,05 de significância pelo programa estatístico R (R Development Core Team, 2020).

2.3 RESULTADOS

A alimentação larval com dieta artificial contendo os corantes Ponceau, Azul de Metileno, Rodamina B e Coomassie proporcionou marcação evidente do intestino, quando observado pela porção ventral do inseto, sem ser necessária a dissecação. A hemolinfa das larvas foi evidentemente marcada quando alimentadas com dieta contendo o corante Rodamina B, sendo que a cor vermelha se apresentava intensa, próximo à cor observada na dieta. Os corantes Azul de Metileno e Coomassie, por outro lado, permitiram a marcação da hemolinfa em tom mais claro do que se apresentou na dieta após a adição dos corantes. A hemolinfa não foi marcada pelos corantes Ponceau e Eosina – Nigrosina.

Os discos imaginais apresentaram marcação pouco evidente quando as larvas foram alimentadas com dieta contendo os corantes Azul de Metileno, Rodamina B e Coomassie (Tabela 1). Ainda, a alimentação larval com os corantes Azul de Metileno, Rodamina B e Coomassie permitiu a identificação do inseto pela observação externa da cor, distinguindo-os assim dos insetos controle. Foi considerada marcação evidente quando foi possível distinguir insetos marcados e insetos controle. Quanto maior a facilidade de distinção, mais evidente foi considerada a marcação.

Tabela 1. Resposta visual de marcação de estruturas de larvas de *S. frugiperda* via coloração oferecida pela alimentação com dieta artificial contendo corante.

Corante	Estrutura		
	Intestino	Hemolinfa	Discos imaginais
Ponceau	+++	-	-
Azul de Metileno	+++	++	+
Rodamina B	+++	+++	+
Eosina – Nigrosina	-	-	-
Coomassie	+++	++	+

- marcação não observada; + marcação pouco evidente; ++ marcação evidente; +++ marcação muito evidente.

Ao dissecar os insetos adultos, observou-se que as estruturas internas como intestino, corpo gorduroso e ovários, no caso de fêmeas, não apresentaram marcação para nenhum dos corantes testados. O mesmo foi observado para os espermatóforos, obtidos nas fêmeas acasaladas, quando os corantes testados foram acrescidos à

dieta larval (Figura 1). A eficiência da marcação dos espermatozoides foi determinada de forma visual, observando a sua coloração, sendo os espermatozoides provenientes de insetos do tratamento controle tidos como padrão (Figura 1A) e apresentaram variadas colorações, desde espermatozoides claros e translúcidos até negros e opacos.

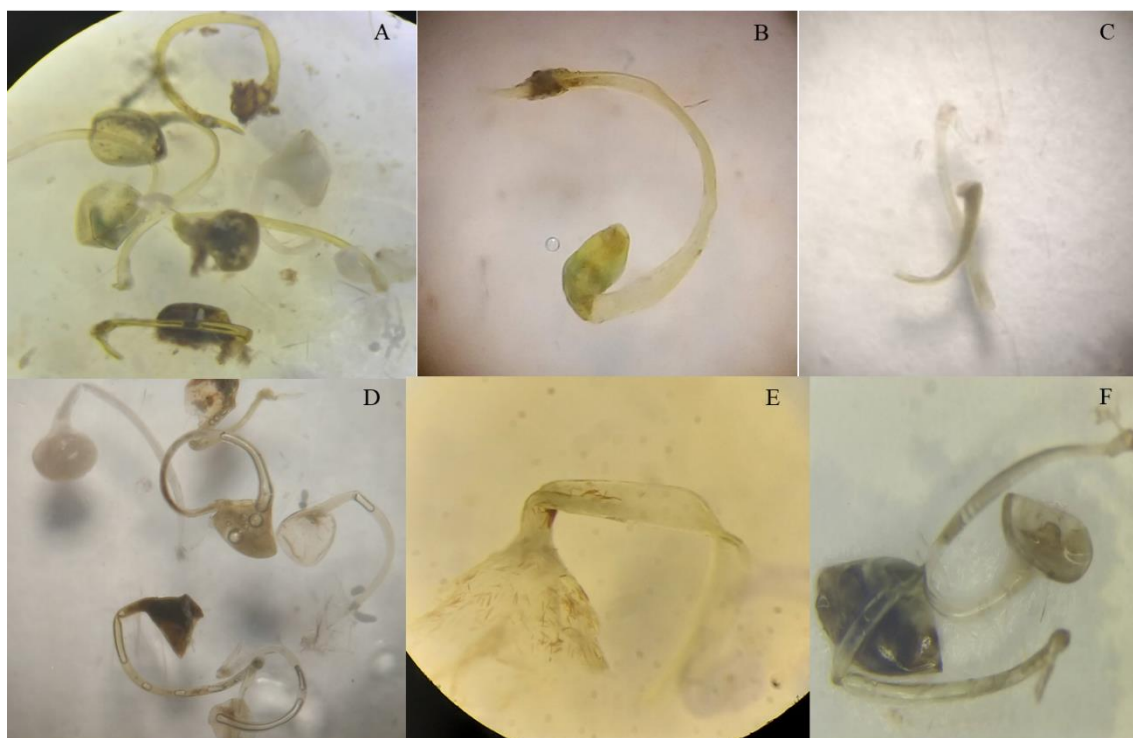


Figura 1. Espermatozoides retirados de fêmeas adultas de *S. frugiperda* cujas larvas foram alimentadas com corantes hidrossolúveis. (A) inseto controle (sem corante); (B) Azul de Metileno; (C) Coomassie; (D) Ponceau; (E) Rodamina B; (F) Eosina – Nigrosina.

Os corantes de coloração azul e vermelha produziram, de forma geral, espermatozoides de coloração clara, indistinguível do padrão observado no controle (Figura 1B-E). Os espermatozoides provenientes do corante Eosina – Nigrosina apresentaram coloração negra (Figura 1F). Apesar de condizente com a cor natural do corante, os espermatozoides não foram considerados marcados, visto que não apresentaram coloração nitidamente diferente da observada nos espermatozoides retirados de insetos controle, que também apresentaram espermatozoides de coloração negra.

A adição dos corantes Ponceau ($F_{5,6} = 0,58$; $P = 0,71$), Azul de Metileno ($F_{5,6} = 0,58$; $P = 0,72$), Eosina – Nigrosina ($F_{5,6} = 0,61$; $P = 0,69$) e Coomassie ($F_{5,6} = 0,99$; $P = 0,99$).

= 0,48) na dieta artificial não aumentou a mortalidade de larvas de *S. frugiperda* em comparação aos valores de mortalidade encontrados no tratamento controle. Em todos os ensaios, a mortalidade observada no tratamento controle (dieta sem corante) se manteve abaixo de 10%, valor considerado aceitável para experimentos com insetos (Hoekstra, 1987). Por outro lado, o corante Rodamina B causou mortalidade de larvas ($F_{5,6} = 73,57$; $P < 0,0001$), sendo as maiores mortalidades observadas nas maiores concentrações, a partir da dose 600 ppm (Figura 2). A mortalidade de larvas se deu, em sua maioria, na fase de pré-pupa, momento em que a larva cessa sua alimentação e inicia o processo de muda para o estágio pupal.

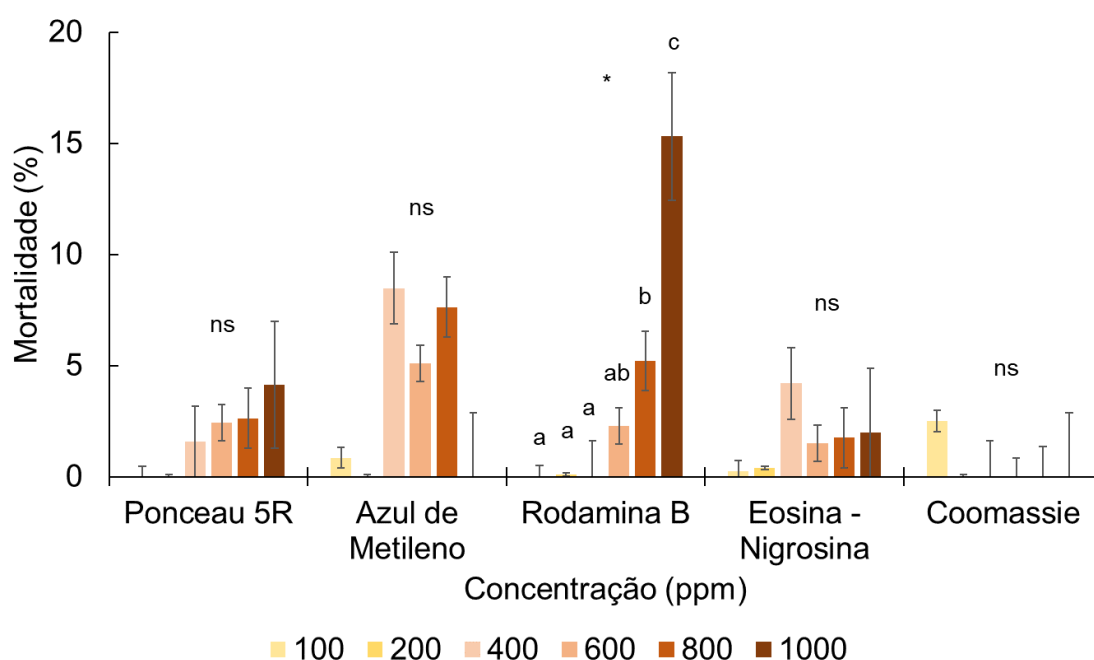


Figura 2. Mortalidade (%) de larvas de *S. frugiperda* submetidas à alimentação com dieta artificial contendo os corantes hidrossolúveis (^{ns} indica que os tratamentos não se diferiram entre si; barras seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 0,05 de significância). Dados corrigidos pela fórmula de Abbott.

O desenvolvimento larval não foi afetado quando os insetos foram alimentados com dieta artificial contendo os corantes Ponceau ($F_{6,7} = 1,94$; $P = 0,20$), Eosina – Nigrosina ($F_{6,7} = 0,27$; $P = 0,94$) e Coomassie ($F_{6,7} = 0,02$; $P = 0,99$). O desenvolvimento larval no controle para esses ensaios foi de 13,20, 15,30 e 17 dias, respectivamente, com aumento da ordem de 8,9% para Ponceau e 3,1% para Eosina – Nigrosina nas maiores concentrações. Por outro lado, os corantes Azul de Metileno

($F_{6,7} = 18,17$; $P < 0,001$) e Rodamina B ($F_{6,7} = 5,69$; $P = 0,02$) aumentaram o desenvolvimento larval, sendo que na dose de 1000 ppm o aumento foi de 26,3% e 19,4%, respectivamente, em relação ao observado para larvas do tratamento controle (Figura 3).

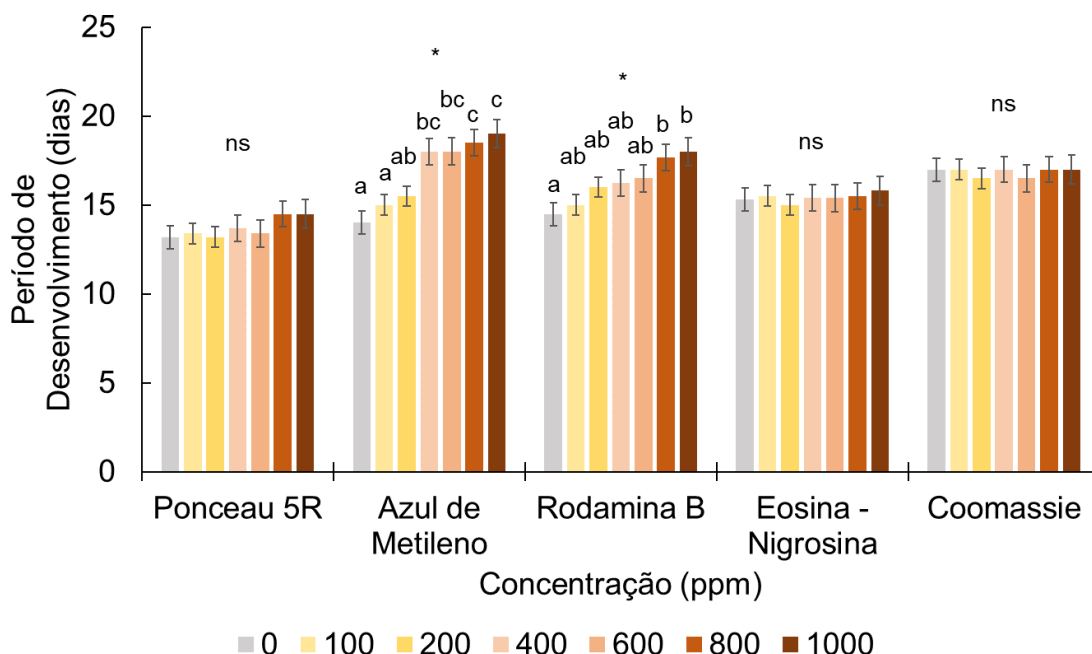


Figura 3. Desenvolvimento (dias) de larvas de *S. frugiperda* alimentadas com dieta artificial contendo os corantes Ponceau, Azul de Metileno, Rodamina B, Eosina-Nigrosina e Coomassie. (ns indica que os tratamentos não se diferiram entre si; barras seguidas de mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 0,05 de significância).

2.4 DISCUSSÃO

A mortalidade de larvas alimentadas com o corante Rodamina B pode ser relacionada à toxicidade do corante (Fondren e Heitz, 1978). A estrutura molecular de Rodamina B apresenta duas moléculas de oxigênio, que no corpo do inseto são substituídas por grupos alquilaminos. As aminas, que passam a constituir o corante, são tóxicas ao inseto (Fondren e Heitz, 1978) e, portanto, quanto maior a concentração em que o corante se encontra na dieta, maior é a toxicidade causada, sobrecarregando o sistema excretor e, conseqüentemente, aumentando tanto a mortalidade quanto o desenvolvimento do inseto.

Rodamina B é uma substância muito utilizada para a marcação de insetos, como nos estudos conduzidos por Vail et al. (1966), Sparks e Cheatham (1973), van der Reijden et al. (1997) e South et al. (2008). Porém, a via de marcação é um fator determinante para o sucesso desses estudos. A eficiência de marcação dos espermatozóides nos estudos citados foi obtida pela marcação via adulto, seja pela alimentação ou injeção no abdômen dos insetos machos. Vail et al. (1966), em ensaio fornecendo o corante via alimentação larval de *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), também não observaram a marcação dos espermatozóides, como no presente estudo. Porém, os autores observaram espermatozóides marcados quando o corante foi oferecido pela alimentação nos adultos, o que foi confirmado, anos depois, por Sparks e Cheatham (1973).

Os corantes Azul de Metileno e Eosina – Nigrosina não causaram alteração na mortalidade de larvas de *S. frugiperda*. A mortalidade do corante Azul de Metileno e Eosina, um dos componentes do corante Eosina – Nigrosina, foi estudada por Yoho et al. (1973) em *Musca domestica* (Linnaeus) (Diptera: Muscidae), em que também observaram baixa mortalidade dos corantes, de 0% e 2%, respectivamente, quando os adultos foram alimentados com os corantes. Resultado semelhante foi obtido por Robinson (1983), em relação à mortalidade de adultos de *M. domestica* em Azul de Metileno (8%). Por outro lado, observaram alta mortalidade de insetos para Eosina (49%). Os autores afirmam que a mortalidade dos corantes é dependente da concentração, que, no presente estudo, não foi evidenciado. Ainda, Barbosa e Peters (1971) apontam que o corante Azul de Metileno apresenta afinidade de se ligar a ácidos nucleicos depolimerizados, formando grânulos no citoplasma, além de possuir baixa palatabilidade, reduzindo a absorção de nutrientes e, por consequência, esse fatores interferem no metabolismo e no desenvolvimento.

O corante Ponceau não afeta o desenvolvimento do inseto, embora não tenha sido eficiente na marcação. Este é um resultado inédito, no melhor do nosso conhecimento, uma vez que há escassez de trabalhos com esse corante para a marcação de insetos. Em vertebrados, por outro lado, Tanaka (2006) observou que a adição do corante na dieta oferecida a ratos de laboratório por nove gerações consecutivas não alterou parâmetros em sua biologia, como mortalidade e tamanho de ciclo. De forma semelhante, o uso do corante Coomassie também não é relatado

para a marcação de insetos ou estruturas *in vivo*. Todavia, o fato deste não ter causado efeitos no desenvolvimento de insetos pode estar relacionado à afinidade do corante às proteínas. Isso decorre pois, Tal et al. (1980) afirmam que a afinidade de ligação do corante varia entre os tipos de proteína, sendo aquelas com maiores cargas positiva as que têm maior afinidade, podendo formar complexos de até três moléculas de corante por carga positiva. Como insetos da ordem Lepidoptera apresentam alta relação de proteínas de carga positiva em relação a negativa, como ocorre, por exemplo, em *Bombyx mori* (L.) (Lepidoptera: Bombycidae) que é de 9:1 (Foo et al., 2006), a afinidade do corante às proteínas deve ter contribuído para a redução da disponibilidade do corante, evitando a ocorrência de toxicidade.

A marcação das estruturas internas do inseto, como o intestino, pode ser observada sem a necessidade de dissecar o inseto. Isso fica evidenciado no momento em que ocorre a passagem do bolo alimentar pelo tubo digestivo (Vail et al., 1966). A alteração na cor da dieta, obtida desde as menores concentrações de corante adicionadas, tem o potencial de alterar a coloração interna dos insetos. Portanto, pode ser uma importante ferramenta para estudos de movimentação larval, bem como a indicação para a alimentação de agentes de controle biológico.

Dentre os corantes testados, apenas Eosina – Nigrosina não possibilitou a marcação de forma evidente das estruturas observadas, sendo elas o intestino, hemolinfa e discos imaginais. Destaca-se que não houve alteração na cor da dieta, que pode ser explicada pelo fato do produto comercial ter os ingredientes ativos em baixa concentração (1% Eosina Y e 5% Nigrosina). No presente estudo foram realizadas diluições com o produto formulado. Ressalta-se, todavia que o corante é utilizado para a marcação de estruturas que contenham proteínas em fixação em lâminas (Sousa et al., 2013).

A marcação das estruturas internas dos insetos em estágio larval foi obtida quando estas foram alimentadas com os corantes Rodamina B, Azul de Metileno e Coomassie. A diferença de intensidade na marcação entre esses corantes foi observada apenas na hemolinfa, sendo que a Rodamina B marcou de forma muito evidente de vermelho e os corantes Azul de Metileno e Coomassie marcaram de azul, porém de tonalidade mais clara, a hemolinfa. O sucesso na marcação dessas estruturas se deve, em parte, à reentrada constante de corantes via alimentação,

oferecida *ad libitum*, pois os corantes, como todas substâncias estranhas ao corpo dos insetos, são excretadas, tanto pelo intestino médio, quanto pelos túbulos de Malpighi (Nijhout, 1975). Dessa forma, a alimentação parcial desse estágio pode não evidenciar a marcação.

A avaliação dos discos imaginais, além de comprovar a eficiência de marcação de estruturas internas nas larvas, permite inferir sobre a capacidade de marcação de partes do sistema reprodutor, pois é a partir desse conjunto de células que se originam as genitálias em insetos adultos. Os discos imaginais são conjuntos de células, inicialmente indiferenciadas, que estão presentes em insetos imaturos e, embora existam vários discos imaginais, foram considerados nesse estudo apenas os discos imaginais genitais. No último ínstar larval, as células que compõem os discos imaginais aumentam sua atividade e multiplicação, fazendo com que o tamanho da estrutura aumente até a muda para pupa (Blair, 2009).

O corante Ponceau foi eficiente para a marcação do intestino, mas não da hemolinfa e discos imaginais. A coloração das dietas com a adição de Ponceau foi vermelho intenso em todas as concentrações, o que permitiu que, ao passar pelo intestino do inseto, o bolo alimentar evidenciasse a marcação da estrutura. Por outro lado, o fato do corante não ter alcançado a hemolinfa ou discos imaginais, pode ser explicado pela incapacidade deste corante em atravessar a membrana peritrófica que reveste internamente o intestino médio, local de maior absorção no tubo digestivo (Holtorf et al., 2019). A membrana peritrófica dos insetos apresenta poros pequenos, medindo de 7,5 a 8,0 nm (Terra, 2001), enquanto as moléculas do corante Ponceau são maiores que 30 nm. Dessa forma, não é possível que o corante atravesse a membrana, conforme relatado por Venkatesha et al. (2013) ao conseguirem reter o corante utilizando de membrana com poros de 30 nm.

A excreção dos corantes é um ponto importante para compreender a ineficiência de marcação das estruturas do inseto. Ingerir dieta artificial contendo corantes, que são compostos xenobiontes, altera a dinâmica fisiológica do inseto, o que gera respostas bioquímicas para a excreção desses compostos, que têm tendência a apresentar toxicidade (Fondren e Heitz, 1978). Nesse sentido, Nijhout (1975), estudando lepidópteros adultos, demonstrou que os corantes são degradados em diferentes locais do sistema excretor dos insetos, e que tal excreção está

relacionada com o pH dos corantes. Corantes ácidos, como o Ponceau e Rodamina B, são excretados no intestino médio e porção média dos túbulos de Malpighi, enquanto os corantes básicos, como o Azul de Metileno, são excretados nas porções média e proximal do túbulo de Malpighi (Nijhout, 1975). Porém, a excreção de alguns corantes básicos, como o Coomassie, não foi constatada, o que, segundo o autor, não descarta que este seja excretado por outras vias, ou em condições diferentes daquelas presentes no estudo. No presente estudo foi observada a marcação de partes internas, como a hemolinfa, pela alimentação larval com corantes. A reentrada constante de corante permite que este, embora seja metabolizado, se apresente em quantidades suficientes para evidenciar a marcação (Barbosa e Peters, 1971).

Em relação aos espermatóforos, a via de marcação ainda se apresenta como um desafio. A ineficiência de marcação pela alimentação larval pode ser explicada, em sua maioria, pela excreção dos corantes pelos insetos (Nijhout, 1975), somado à redução da alimentação e esvaziamento do intestino de insetos ao final do último ínstar larval, antes do estágio de pupa (Spranghers et al., 2018). Dessa forma, para que o corante esteja presente no adulto, é necessário que ele alcance a fase pupal absorvido em estruturas internas do inseto, como hemocèle e discos imaginais.

Assim, sendo o espermatóforo, a estrutura a qual se busca marcar, composto por proteínas (Heller et al., 1998), entende-se que os corantes devem, durante a fase larval, que é a fase de acúmulo de corante, se ligar a compostos proteicos. Nesse sentido, a marcação de espermatóforos pelo fornecimento de dietas lipossolúveis às larvas não permite a marcação, pois essas se ligam ao corpo gorduroso e não a proteínas (Qureshi et al., 2006; Vilarinho et al., 2011). Porém, Hendricks e Graham (1970) e Cantelo (1973) observaram a marcação do espermatóforo de lepidópteros por corantes lipossolúveis, o que pode ser justificado pela alta concentração de corante ligado ao corpo gorduroso dos insetos durante a fase de metamorfose, fazendo com que algumas moléculas do corante se ligassem ao sistema reprodutor do macho.

Com a marcação de espermatóforos de insetos, é possível, além de comprovar a ocorrência de acasalamento, determinar a origem do material genético do macho. Esse fato é de grande importância para estudos de fluxo gênico, pois permite inferir sobre a distância em que os genes alcançam e, assim, determinar o distanciamento

máximo entre áreas de refúgio. Estudando a capacidade de dispersão de *S. frugiperda*, Vilarinho et al. (2011) demonstraram que o inseto adulto pode deslocar até 800 m e que, portanto, essa distância assegura encontro de insetos resistentes e suscetíveis. Porém, não foi avaliada a presença de espermátóforos nas fêmeas coletadas, limitando a compreensão da capacidade de dispersão do material genético dos insetos.

Embora o presente estudo não tenha avaliado a longevidade dos adultos, característica importante para a condução de experimentos a campo, visto que a biologia do adulto não deve sofrer alterações pela presença do corante, diversos estudos apontam que a marcação de adultos com corantes hidrossolúveis não afeta a longevidade de adultos (Gast e Landin, 1966; Vail et al., 1966; Heron, 1968; Sparks e Cheatham, 1973; Strand et al., 1990; Garcia-Salaza e Landis, 1997).

A obtenção da marcação de insetos imaturos pelo fornecimento de dieta hidrossolúvel via alimentação no presente estudo serve de base para avaliação de movimentação larval de insetos, uma vez que permite a distinção de insetos marcados e selvagens. Para tal, todavia, é necessário determinar a duração da marcação após cessar o fornecimento de dieta artificial contendo corantes, bem como o comportamento de dispersão em relação a larvas criadas em dieta artificial sem adição de corantes.

Por fim, os ensaios realizados permitem marcar o corpo de larvas de *S. frugiperda*, sobretudo o intestino, hemolinfa e discos imaginais pela adição de corantes hidrossolúveis à dieta artificial. Ainda, a não marcação do espermátóforo aponta para a necessidade de aprofundar os estudos para determinar quais corantes e concentrações são adequados para corar a estrutura. Nesse sentido, o ineditismo do uso de Eosina – Nigrosina, Ponceau e Coomassie aponta que embora eficientes para a marcação de proteínas, não apresentam potencial para marcação da estrutura em insetos via alimentação larval. Com a determinação de corante eficiente para a marcação de espermátóforo, este deve ser empregado para estudos de fluxo gênico e determinação da distância de áreas de refúgio, apresentando o refinamento do estudo de acasalamento.

2.5 REFERÊNCIAS

- Aviles EI, Rotenberry RD, Collins CM, Dotson EM, Benedict MQ (2020) Fluorescent markers rhodamine B and uranine for *Anopheles gambiae* adults and matings. **Malaria Journal** 19:1-19. doi: 10.1186/s12936-020-03306-5
- Bentivenha JP, Rodrigues JG, Lima MF, Marçon P, Popham HJ, Omoto C (2019) Baseline susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to SfMNPV and evaluation of cross-resistance to major insecticides and Bt proteins. **Journal of Economic Entomology**, 112(1), 91-98.
- Blanco CA, Sumerford D, López JD, Hernández G (2006a) Mating incidence of feral *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) males confined with laboratory-reared females. **Journal of Cotton Science** 10:105-113.
- Blanco CA, Perera O, Ray JD, Taliercio E, Williams L (2006b) Incorporation of rhodamine B into male tobacco budworm moths *Heliothis virescens* to use as a marker for mating studies. **Journal of Insect Science** 6:1-10. doi: 10.1673/1536-2442(2006)6[1:IORBIM]2.0.CO;2
- BRASIL (2005) **Parecer Técnico Prévio Conclusivo nº 513/2005**. Ministério da Ciência e Tecnologia: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio)
- Burkness EC, Dively G, Patton T, Morey AC, Hutchison WD (2010) Novel Vip3A *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize approaches high-dose efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) under field conditions: Implications for resistance management. **GM Crops** 5: 337-43. doi: 10.4161/gmcr.1.5.14765. PMID: 21844691.
- Cantelo WW (1973) Dye Markers for Moths of the Tobacco Hornworm. **Environmental Entomology** 2: 393–396.
- Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Sorgatto RJ, Fresia P, dos Santos AC, Omoto C (2014). Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop protection**, 64:150-158.
- Gangwere SK, Chavin W, Evans FC (1964) Methods of Marking Insects, with Especial Reference to Orthoptera (Sens. Lat.). **Annals of the Entomological Society of America** 57: 662–669.
- Geiger JC, Purdy WC, Tarbett RE (1918) Effective Malaria Control in Ricefield District. **Journal of the American Medical Association** 72: 844–847. doi:10.1001/jama.1919.02610120006002
- Graham HM, Mangum CL (1971) Larval Diets Containing Dyes for Tagging Pink Bollworm Moths Internally. **Journal of Economic Entomology** 64: 376–379.
- Hagler JR, Jackson CG (2001) Methods for Marking Insects : Current Techniques And Future Prospects. **Annual Review of Entomology** 46: 511–543.
- Heller KG, Faltin S, Fleischmann P, Helversen Ov (1998) The chemical composition of the spermatophore in some species of phaneropterid bushcrickets (Orthoptera: Tettigonioidae). **Journal of Insect Physiology** 44: 1001–1008.

Hendricks DE, Graham HM (1970) Oil-Soluble Dye in Larval Diet for Tagging Moths, Eggs, and Spermatophores of Tobacco Budworms. **Journal of Economic Entomology** 63: 1019–1020.

Hoekstra JA (1987) Acute bioassays with control mortality. **Water, Air, and Soil Pollution** 35: 311–317.

HU F, Luo W, Hu Y, Dai H, Peng X (2019) Insight into the kinetics and mechanism of visible-light photocatalytic degradation of dyes onto the P doped mesoporous graphitic carbon nitride. **Journal of Alloys and Compounds** 794: 594–605. doi: 10.1016/j.jallcom.2019.04.235

James C (2019) **ISAAA 2019 Accomplishment report** 40p. GM Crops.

Johnson BJ, Mitchell SN, Paton CJ, Stevenson J, Staunton KM, Snoad N, Beebe N, White BJ, Ritchie SA (2017) Use of rhodamine B to mark the body and seminal fluid of male *Aedes aegypti* for mark-release-recapture experiments and estimating efficacy of sterile male releases. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 11: e0005902. doi: doi.org/10.1371/journal.pntd.0005902

Kottarathil HA, Kappalli S (2019) Reproductive system in the male phase of a parasitic isopod (Crustacea) – Morphological, histological and ultrastructural evidence for sequential protandrous hermaphroditic changes. **Zoological Studies** 58: 1–16.

Mazaheri F, Aliabad KK, Kalantar SM, Ziya N, Khdmehr A, Anvari M (2020) Effects of phosalone plant pesticide on sperm parameters and sexual hormone levels in Wistar rats: An experimental study. **International Journal of Reproductive BioMedicine** 18: 785–794. doi:10.18502/ijrm.v13i9.7683

Nijhout HF (1975) Excretory role of the midgut in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). **Journal of Experimental Biology** 62: 221–230.

Noaman N, Coorssen JR (2018) Coomassie does it (better): A Robin Hood approach to total protein quantification. **Analytical Biochemistry** 556: 53–56, 2018. doi: 10.1016/j.ab.2018.05.012>.

Ortego F, Pons X, Albajes R, Castanera (2009) **European Commercial Genetically Modified Plants and Field Trials**. Environmental Impact of Genetically Modified Crops (ed. By N Ferry e AMR Gatehouse) CAB, London, UK, pp. 327–343.

Ostlie KR, Hutchison WD, Hellmich RL (1997). **Faculty Publications: Department of Entomology**. 597.

Qureshi JA, Buschman LL, Throne JE, Ramaswamy (2006) Dispersal of Adult *Diatraea grandiosella* (Lepidoptera: Crambidae) and Its Implications for Corn Borer Resistance Management in *Bacillus thuringiensis* Maize. **Annals of the Entomological Society of America** 99: 279–291. doi: [10.1603/0013-8746\(2006\)099\[0279:DOADGL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2006)099[0279:DOADGL]2.0.CO;2)

R Core Team (2020) **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Showers WB, Hellmich RL, Derrick-Robinson ME, Hendrix WH (2001) Aggregation and Dispersal Behavior of Marked and Released European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) Adults. **Environmental Entomology** 30: 700–710. doi: [10.1603/0046-](https://doi.org/10.1603/0046-)

[225X-30.4.700](#)

Sousa PC, Santos EAA, Souza ALP, Lima GL, Barros FFPC, Oliveira MF, Silva AR (2013) Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*). **Pesquisa Veterinária Brasileira** 33: 924–930. doi: doi.org/10.1590/S0100-736X2013000700014

South A, Sota T, Abe N, Yuma M, Lewis SM (2008) The production and transfer of spermatophores in three Asian species of *Luciola* fireflies. **Journal of Insect Physiology** 54: 861–866. doi: 10.1016/j.jinsphys.2008.03.008.

Southwood TRE (1978) **Ecological Methods with particular reference to the study of Insect Populations**. 2 nd edn. Springer Science: London, UK.

Sparks MR, Cheatham JS (1973) Tobacco hornworm: marking the spermatophore with water-soluble stains. **Journal of Economic Entomology** 66: 719–721.

Van Der Reijden ED, Monchamp JD, Lewis SM (1997) The formation, transfer, and fate of spermatophores in *Photinus* fireflies (Coleoptera: Lampyridae). **Canadian Journal of Zoology** 75: 1202–1207.

Venkatesha TG, Nayaka YA, Chethana BK (2013) Adsorption of Ponceau S from aqueous solution by MgO nanoparticles. **Applied Surface Science** 276: 620–627. doi: 10.1016/j.apsusc.2013.03.143

Vilarinho EC, Fernandes OA, Omoto C, Hunt TE (2006) Oil-Soluble Dyes for Marking *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology** 99: 2110–2115. doi: 10.1603/0022-0493-99.6.2110

Vilarinho EC, Fernandes OA, Hunt TE, Caixeta DF (2011) Movement of *Spodoptera frugiperda* Adults (Lepidoptera: Noctuidae) in Maize in Brazil. **Florida Entomologist** 94: 480–488.

Vilela M, Mendes SM, Valicente FH, Carvalho SSS, Santos AE, Santos CA, Araújo OG, Barbosa TAN, Carvalho EAR, Costa VHD (2014) **Metodologia para Criação e Manutenção de *Helicoverpa armigera* em Laboratório**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo (Circular Técnica 203), Brasil.

Wu SF, Zeng B, Zheng C, Mu XC, Zhang Y, Hu J, Zhang S, Gao CF, Shen JL (2018) The evolution of insecticide resistance in the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) of China in the period 2012–2016. **Scientific Reports** 8: 1–11. Doi: [10.1038/s41598-018-22906-5](https://doi.org/10.1038/s41598-018-22906-5)

ZETEK J (1913) Determining the flight of mosquitos. **Annals of Entomological Society of America**, 6: 5–20.

CAPÍTULO 3 – DINÂMICA ESPAÇO-TEMPORAL DE ADULTOS DE *Spodoptera frugiperda* EM ÁREA DE CULTIVO

RESUMO – A movimentação de insetos em maiores distâncias se dá na fase adulta, em que insetos alados podem alçar longos voos, como os migratórios. É também na fase adulta que os insetos se acasalam, aumentando a variabilidade genética da população e assegurando a perpetuação do seu material genético. Assim, é importante compreender como se dá a dispersão de adultos de *Spodoptera frugiperda*, importante praga de cultivos agrícolas, que tem o milho como cultura hospedeira preferencial, durante o ciclo da cultura. Nesse sentido, o experimento deve como objetivo determinar o padrão de movimentação de adultos de *S. frugiperda* em uma área de produção de milho ao longo do ciclo da cultura, determinando o status sexual das fêmeas capturadas. Em uma área de 20 ha cultivada com milho foram dispostas oito armadilhas do tipo bola funil, tendo voláteis alimentares como atrativos às mariposas, sendo quatro das armadilhas instaladas na parte interna da área de cultivo e quatro na área externa, a fim de determinar a movimentação de chegada e saída de insetos. Observou-se que os primeiros adultos chegaram à área assim que as plantas de milho emergiram, colonizando a área e dando início à primeira geração. Os insetos da primeira coorte da área emergiram durante o estágio vegetativo do milho, sendo capturadas, em grande maioria, fêmeas acasaladas quando o milho atingiu o estágio V8. Quando as plantas de milho atingiram o estágio reprodutivo não foram capturadas mais mariposas em áreas de cultivo, enquanto na área externa observou-se movimentação de saída.

Palavras-chave: Dispersão, acasalamento, estágio reprodutivo, milho, lagarta-do-cartucho

3.1 INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma praga polífaga e, dessa forma, pode completar o ciclo em diversos ambientes agrícolas ou naturais (Sparks, 1979; Carroll et al., 2006). Como o sistema de cultivo em certas regiões brasileiras envolve plantio de culturas durante todo o ano, o inseto se beneficia pela presença constante de hospedeiros. Essa sucessão de cultivos facilita a ponte verde, ou seja, a movimentação de um cultivo para outro no tempo e no espaço (Rosa et al., 2014). Nesse cenário, o manejo de resistência de *S. frugiperda* deve considerar todo o sistema de cultivo e não apenas uma safra, cultura ou propriedade.

Portanto, é necessário compreender a movimentação dos insetos entre áreas de produção e o entorno. Uma vez que o deslocamento a longas distâncias dos insetos se dá pela fase adulta, é nessa fase em que estudos de dispersão são realizados, sendo amostrados por meio de armadilhas, que podem ter vários estímulos de atratividade, como feromônio, luminosidade ou atrativos alimentares (Carroll et al., 2006). Ao comparar a quantidade de insetos capturados nas mesmas armadilhas ao longo do tempo tem-se a compreensão da movimentação, que abastecendo modelos matemáticos, permitem a previsão de surtos populacionais e, assim, o posicionamento adequado das formas de controle.

A captura de insetos também pode fornecer informações como o status sexual do inseto, que permite aplicação prática, a campo, das predições observadas em ambientes controlados, como a maior movimentação de fêmeas após o acasalamento em comparação às virgens (Sparks, 1979). O status sexual dos insetos que apresentam maior mobilidade permitem não só compreender a origem da população de insetos nos estádios iniciais da cultura, mas também o momento adequado para o emprego de táticas complementares de controle, como o comportamental, não apenas na área de interesse, mas também nas lavouras vizinhas, a fim de não permitir a chegada de insetos acasalados.

Ao compreender a dinâmica da população de adultos de *S. frugiperda* a campo, poder-se-á estimar o fluxo gênico em pequena escala, ou seja, como o material genético da população que imigra para a área é passado para as próximas gerações,

aumentando a variabilidade genética e, por consequência, como esse material genético pode se dissipar junto à população emigrante da área. Esse conhecimento é de grande importância para a realização do manejo de populações resistentes, pois caracterizará a campo como se dá a movimentação dos insetos em relação ao status de acasalamento.

Considerando o estágio fenológico das plantas em relação ao movimento dos insetos, a atratividade das plantas a *S. frugiperda* ocorre no início do período vegetativo, pela emissão de voláteis, que atraem, sobretudo, fêmeas acasaladas vindas de plantas presentes na paisagem, que buscam por hospedeiros viáveis para o desenvolvimento da prole (Carroll et al., 2006; De Lange et al., 2020). Já a manutenção tanto de machos quanto fêmeas na área depende, direta ou indiretamente, da estrutura das plantas, que devem prover alimento e abrigo para as a geração seguinte. Embora muito seja especulado, poucos são os trabalhos que apontam o comportamento dos insetos frente condições adversas ao desenvolvimento da prole, como a ocorrência de plantas em estágio reprodutivo.

Dessa forma, buscando compreender a movimentação de entrada e saída de adultos de *S. frugiperda* em área de cultivo de milho e seu entorno, em estágio vegetativo e reprodutivo de lavoura de milho, o experimento teve por objetivo descrever o comportamento de movimentação de adultos de *S. frugiperda*, virgens e acasalados, dentro e fora de sistema de cultivo de milho ao longo do desenvolvimento da cultura.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado e conduzido na cidade de Guataporã – SP, em pivô com 250 m de raio, perfazendo área de aproximadamente 20 ha, com o híbrido AG 8088 PRO 2, expressando as proteínas inseticidas Cry 1A105 + Cry2Ab2, semeado entre os dias 09/01/2021 e 12/01/2021, com espaçamento de 0,8 m entre linhas e densidade de 4,5 sementes m⁻¹. A área é cultivada em sucessão de milho e amendoim.

A coleta de adultos de *S. frugiperda* foi feita por oito armadilhas modelo bola funil (ISCA Tecnologias®), contendo um cesto coletor de insetos composto por tela de

sombreamento, sendo quatro armadilhas posicionadas na área de cultivo do milho e quatro na área externa, a 50 m da área de cultivo (Figura 1).

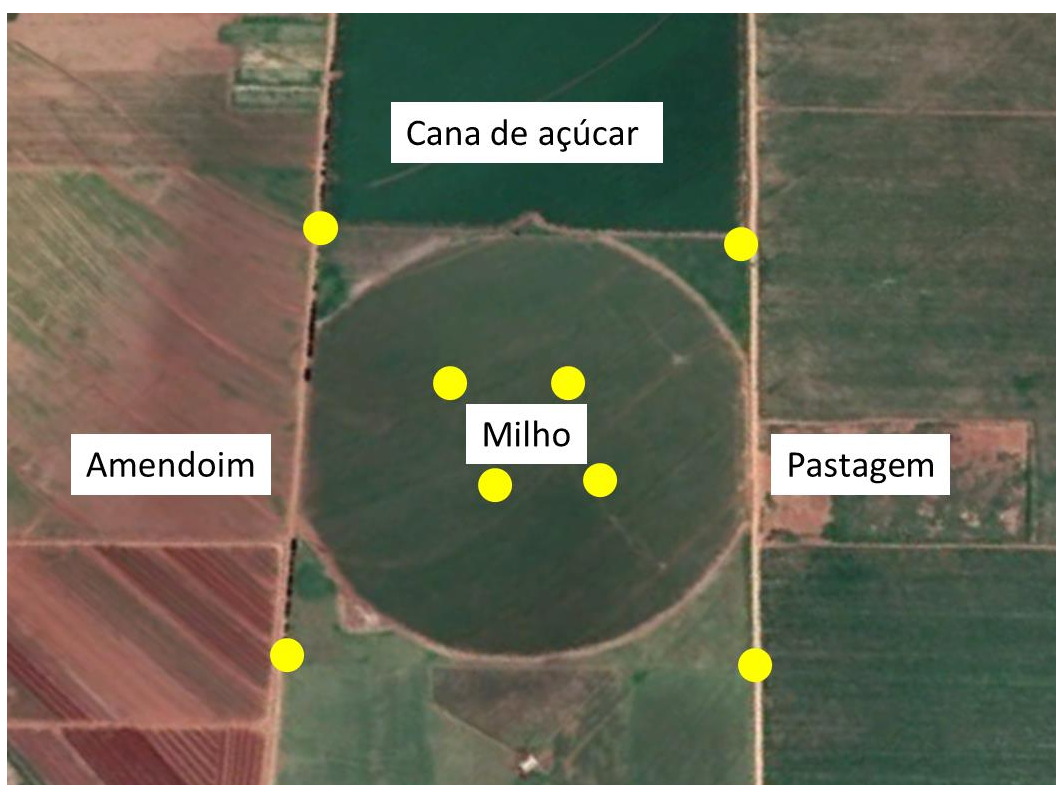


Figura 1. Área de condução do experimento. Área de produção de milho, ao centro, conduzida em pivô e áreas adjacentes com as devidas culturas representadas. Armadilhas tipo bola-funil contendo atrativo alimentar representadas por círculos amarelos.

As armadilhas foram instaladas 12 dias após o plantio do milho, fixadas em haste de madeira a 1,30 m do nível do solo. A atração dos adultos de *S. frugiperda* se deu com atrativo alimentar (Acttra, ISCA Tecnologias Ltda[®]) indicado para a atração de noctuídeos. Dentro do cesto coletor de insetos acoplado a cada armadilha havia um recipiente de 50 mL contendo chumaço de algodão embebido em solução de atrativo alimentar no qual foi diluído inseticida de ingrediente ativo metomil (2% do produto comercial Metomil 215 SL NORTOX[®]), para causar a morte instantânea dos insetos, evitando acasalamento no interior da armadilha.

A retirada dos insetos coletados pelas armadilhas e a reposição do atrativo alimentar ocorreram semanalmente a partir dos 13 DAE (estádio V4) até os 80 DAE (estádio R4), momento em que as os grãos atingiram maturidade e as plantas iniciaram o processo de senescência. Junto à coleta de dados foi realizada a avaliação

de injúria, utilizando como métrica a escala de Davis (1992). Os insetos retidos nos cestos foram transferidos para potes de 100 mL com tampa (COPAÇA[®]) identificados de acordo com a armadilha referente. Os insetos capturados foram levados a laboratório para a identificação de machos e fêmeas de *S. frugiperda* pela ornamentação das asas, quando possível, ou pela observação do aparelho reprodutor, bem como o status sexual das fêmeas, com a contagem de espermatóforos contidos em cada uma. Os insetos foram dissecados utilizando pinça de ponta reta (ESD-12), expondo a porção interna do aparelho reprodutor das fêmeas. Ao localizar a bursa copulatrix, região onde os espermatóforos são armazenados, a presença da estrutura reprodutora do macho foi observada visualmente. Comprovada a presença, a película que compõe a bursa copulatrix foi rompida e o número de espermatóforos contabilizado.

O número diário médio de adultos coletados em área de cultivo de milho e área externa foi submetido a análise de variância (ANOVA) (R Core Team, 2020). As médias de insetos capturados por dia foram comparadas pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$), enquanto a comparação da captura de insetos na área de milho e externa foi realizada pelo teste F.

3.3 RESULTADOS

Foram coletados 232 adultos de *S. frugiperda* no período de 80 dias de coleta, dos quais 128 foram coletados em área de milho e 104 foram coletados na área externa, o que representa uma coleta 23% maior na área de milho. A quantidade total de fêmeas coletadas foi de 158 (68% do total), sendo que destas, 72% estavam acasaladas.

A coleta realizada nos estádios iniciais das plantas de milho, independentemente do local das armadilhas, apontou para maior captura de machos em detrimento das fêmeas. Ainda, a abundância de fêmeas virgens foi superior à de fêmeas acasaladas, sendo que esta categoria foi a primeira a ser detectada na área de cultivo (Figura 2).

Com o desenvolvimento das plantas de milho, ao atingirem estágio V5 (20 dias após a emergência - DAE), foi observado aumento da captura de fêmeas acasaladas

na área de cultivo, seguido pelo aumento do número médio de machos e fêmeas virgens capturados no momento em que as plantas apresentavam estágio vegetativo V6 (Figura 2). O pico de coleta de fêmeas acasaladas ocorreu enquanto as plantas apresentavam estágio V8, seguido pela queda, na ordem de 65%, na amostragem seguinte. A redução no número médio de insetos capturados em área de milho ocorreu até o momento em que as plantas passaram para o estágio reprodutivo, a partir de quando não foram mais coletados insetos em área de milho. Por outro lado, a coleta de insetos na área externa se deu até o estágio reprodutivo R4, demonstrando movimentação de saída de insetos da área de milho (Figura 2).

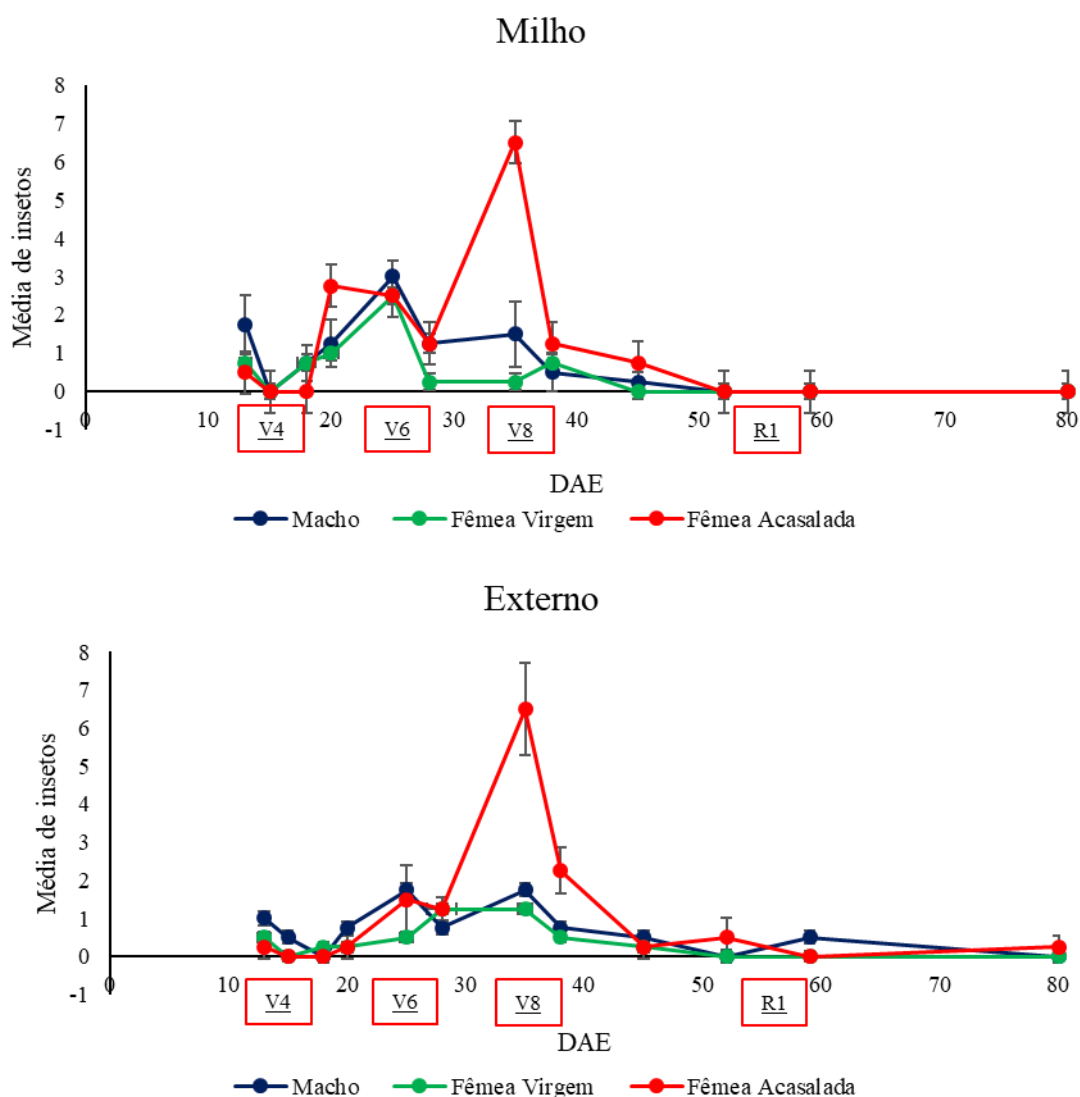


Figura 2. Número médio de adultos de *S. frugiperda* coletados, por data, em armadilhas instaladas em área de cultivo de milho e área externa.

Destaque para o estágio fenológico das plantas de milho no momento da coleta dos insetos (V4, V6, V8 e R1). Barras verticais representam o erro médio padrão.

O nível de injúria das plantas de milho foi observado de acordo com o desenvolvimento dessas, sendo avaliado semanalmente utilizando-se como padrão a escala de Davis, em que notas zero (0) representam plantas sem injúrias, notas um (1) representam plantas com algumas raspagens nas folhas do cartucho e, em ordem crescente, alcançando a nota nove (9), em que as folhas do cartucho estão totalmente destruídas. Toma-se, como nível de controle, a nota 3 e, portanto, a figura 3 apresenta a porcentagem de plantas de milho que apresentaram nota de injúria igual ou superior a 3, o que representaria o momento de aplicação de estratégias de controle da fase larval.

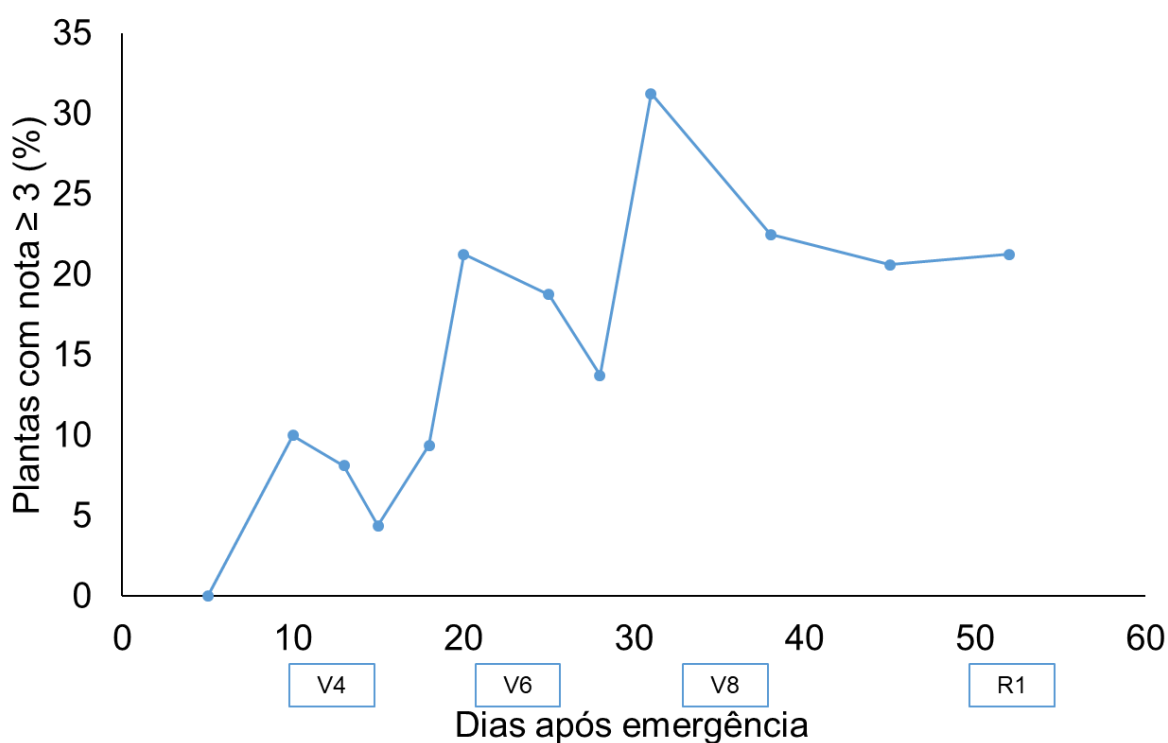


Figura 3. Porcentagem de plantas de milho com notas de injúria igual ou superior a 3, utilizada como nível de controle para lagartas de *S. frugiperda* na cultura. Indicação do estágio fenológico das plantas representado abaixo do eixo x.

O número médio de espermatóforos por fêmeas não diferiu significativamente a despeito do local ($F_{1,13} = 0,165$; $P = 0,692$) e do tempo ($F_{6,13} = 2,307$; $P = 0,149$),

conforme verificado também pela análise da interação desses fatores ($F_{4,102} = 0,119$; $P = 0,975$).

3.4 DISCUSSÃO

A captura de adultos de *S. frugiperda* foi maior em área de milho que em área externa. Isso decorre da atratividade exercida por voláteis de milho aos adultos migrantes de *S. frugiperda*, que têm as plantas de milho como principal hospedeiro, sobretudo em uma área em que a paisagem não apresenta outras plantas hospedeiras preferenciais. As fêmeas tendem a buscar área de milho para realizarem a oviposição para garantir que a prole se desenvolva em substrato adequado (Carroll et al., 2006; De Lange et al., 2020), enquanto os machos são atraídos, sobretudo, pela emissão de voláteis pelas fêmeas (Kromann et al., 2015; Cheng et al., 2016).

Nesse sentido, a maior captura de fêmeas em detrimento de machos pode representar maior resposta de fêmeas ao atrativo alimentar utilizado na armadilha, pois o investimento de machos e fêmeas quanto à alimentação na fase adulta é distinta (Sparks, 1979). Machos de *S. frugiperda* têm como principal estímulo atrativo, independentemente do status de acasalamento, o feromônio sexual, o que implica que o inseto gasta sua reserva energética, acumulada durante a primeira noite após a emergência, buscando por fêmeas para o acasalamento (Sparks, 1979; Kromann et al., 2015).

Por outro lado, as fêmeas da espécie se comportam de modo distinto, pois acumulam reserva energética durante os primeiros dias após a emergência, se alimentando e aguardando a cópula para então se movimentar (Sparks, 1979). Após a cópula, apesar de ainda estarem disponíveis para o acasalamento e liberarem feromônio, a hierarquia do comportamento passa a ter como prioridade a localização de substrato adequado para o desenvolvimento da prole e a obtenção de energia para o voo (Sparks, 1979; Thompson, 1988; Tuskes et al. 1996). Esse comportamento corrobora o observado no presente estudo, em que a coleta de fêmeas acasaladas foi maior que de fêmeas virgens, não implicando necessariamente em menor população de virgens, mas na menor movimentação destas (Cheng et al., 2016).

Já a coleta realizada na área externa não decorre da atratividade da área externa, mas sim da movimentação de insetos migrantes a partir das áreas que compõem a paisagem para a área de produção de milho. Esse comportamento, somado ao observado na coleta realizada no cultivo, comprova que a detecção de insetos nessa área não ocorre pela emergência local de adultos, e sim pela chegada de insetos pelo voo.

A movimentação de entrada de adultos migrantes de *S. frugiperda* na área de milho se deu nos estádios iniciais do desenvolvimento das plantas. Conforme observado, a população de insetos coletados até o estágio V4 das plantas de milho foi maior na área de produção que na área externa, demonstrando que os insetos foram atraídos para as plantas de milho e permaneceram na área. Essa movimentação se deve muito provavelmente aos voláteis liberados pelas plantas de milho, que demonstram a presença do hospedeiro e, portanto, um local propício ao desenvolvimento larval e à presença de demais adultos da espécie, aumentando a possibilidade de haver cópula (Sparks, 1979; Koffi et al., 2021).

Essa movimentação permaneceu até o estágio V6 das plantas de milho, em que a atratividade de plantas se manteve elevada. Isso decorreu, pois, plantas apresentando poucas injúrias, notas entre 0 (zero) e 2 (dois) são mais adequadas ao desenvolvimento larval que aquelas com muitas injúrias, ou seja, notas de injúria maiores que 3 de acordo com a escala de Davis. Isso não ocorre a partir do estágio V6, em que a porcentagem de plantas com nota igual ou maior a 3 aumenta, fazendo com que as plantas passem a liberar voláteis menos atrativos às mariposas e, portanto, reduzindo a movimentação de entrada de insetos na área (Téllez-Rodríguez et al., 2014).

Uma vez que as plantas de milho deixam de ser altamente atrativas às mariposas de *S. frugiperda*, o aumento populacional durante o restante do período vegetativo se deve à emergência de insetos residentes, desenvolvidos na área. A chegada de adultos de *S. frugiperda* não representa apenas a movimentação de insetos, mas infere também na oviposição de fêmeas nas plantas, o que reflete na eclosão e desenvolvimento das larvas nessas plantas selecionadas pela fêmea. Com o desenvolvimento larval, a planta é utilizada como fonte de abrigo e alimento, sendo total ou parcialmente destruída e, assim, liberando voláteis específicos para a atração

de inimigos naturais, que ao mesmo tempo são repelentes às pragas (Davis et al., 1999; Meagher e Nagoshi, 2004).

Como o ciclo de vida de *S. frugiperda* pode variar entre 22 e 30 dias de ovo a adultos (Subedi e Ma, 2005; Du Plessis et al., 2020), os ovos depositados em plantas de milho no início de seu desenvolvimento, deram origem aos adultos residentes a partir do estágio V6. Para sustentar essa afirmação, as injúrias às plantas de milho (Figura 3) permitiram observar o aumento da porcentagem de plantas com notas igual ou superior a 3 até o estágio V8. Vale destacar que a ocorrência de lagartas de instares avançados em plantas no início do cultivo corresponde a lagartas presentes na área que sobreviveram em restos culturais e que, portanto, podem ter ocasionado as notas de injúria observadas nas primeiras avaliações. Nesse momento observou-se a sobreposição de gerações, as primeiras são descendentes das primeiras posturas realizadas nas áreas e, portanto, estavam emergindo. Porém, as demais gerações (residentes), iniciadas por posturas realizadas durante o ciclo da planta, cessavam a alimentação para passarem ao estágio pupa, que emergiram ao final do período vegetativo.

Assim como observado durante a movimentação de chegada de insetos à área, a coleta de fêmeas acasaladas foi maior que a coleta de fêmeas virgens ou machos, comprovando não apenas a alta mobilidade de fêmeas após o acasalamento, mas também a atratividade destas aos voláteis do atrativo alimentar utilizado nas armadilhas. A coleta de insetos referente ao 40º dia após a emergência das plantas de milho demonstra o início da movimentação de saída dos insetos migrantes da área de milho, sendo coletado maior número de fêmeas acasaladas na área externa em comparação com a área de milho. Insetos, em geral, não tem grande necessidade de busca por recursos alimentares na fase adulta, que é considerada a fase de reprodução, sendo que a alimentação é fundamental durante a fase imatura, principalmente larval ou ninfa (Tisdale e Sappington, 2001).

Interessante destacar, todavia, que diversos trabalhos que se utilizaram de armadilhas luminosas para captura de lepidópteros capturaram maior número de machos do que de fêmeas (Vilarinho et al., 2011; Cheng et al., 2016; Qureshi et al., 2006). Portanto, a fonte de atração (feromônio sexual, atrativo alimentar ou luz) deve

ser considerada na experimentação e mesmo no manejo desses insetos em sistemas agrícolas.

A maior atração de machos a armadilhas luminosas se deve ao momento de atividade de voo, que ocorre no crepúsculo, sendo que ao responderem ao feromônio sexual liberado pelas fêmeas, os machos iniciam o voo. Porém, a presença de armadilhas luminosas faz com que estes busquem pela luz, aumentando a coleta de machos, o que não ocorre com armadilhas de atrativo alimentar, que usam o mesmo órgão do sentido para a detecção do ambiente externo (estímulos), preferindo assim pela detecção do feromônio (Cheng et al., 2016).

Após as plantas de milho atingirem o estágio reprodutivo, observou-se redução na coleta de adultos na área de cultivo, em virtude da emissão da flor masculina das plantas, o pendão. Essa estrutura ocorre no lugar onde anteriormente existia o cartucho, local de preferência para o desenvolvimento larval e, portanto, reduz a oferta de abrigo aos insetos em desenvolvimento nas plantas (Davis et al., 1999; Meagher e Nagoshi, 2004). A alteração morfológica das plantas aumenta a movimentação dos insetos, o que é comprovado pela ausência de insetos coletados em área de produção de milho somado à coleta de insetos, durante todo o estágio reprodutivo, na área externa ao milho.

A presença de plantas de milho ou seu estágio de desenvolvimento não interferiram no número de espermatóforos observadas nas fêmeas acasaladas. Em condições de campo, na qual o experimento foi realizado, fêmeas de *S. frugiperda* podem armazenar até 7 espermatóforos, sendo normalmente observados 2 ou 3 por fêmea (Murúa et al., 2008; He et al., 2021). Esse resultado demonstra que, embora as plantas de milho sejam atrativas a *S. frugiperda*, elas não afetaram o número de acasalamentos para essa espécie.

De acordo com os dados obtidos no cenário experimental, compreende-se a dinâmica de movimentação de *S. frugiperda*, identificando os momentos de entrada e de saída da área de produção de milho, bem como a implicação do desenvolvimento da cultura e do ciclo do inseto sobre a flutuação populacional. O momento de chegada de insetos, sobretudo fêmeas acasaladas, logo após a emergência do milho deve ser considerado no estabelecimento das estratégias de controle, não apenas na área de cultivo, mas também nas áreas adjacentes, de onde os insetos estão migrando. Isso

decorre, pois, esses insetos são responsáveis pela primeira geração de *S. frugiperda* que podem causar injúria ao milho e, conseqüentemente, comprometer a produção.

A emergência de insetos na área de milho entre os estádios V6 e V8 permite o controle com técnicas alternativas, como o controle comportamental, uma vez que machos e fêmeas virgens podem estar presentes. Nesse caso, a disrupção do acasalamento por meio da aplicação de feromônio pode contribuir para impedir a ocorrência de uma segunda geração na área, que aumentaria os danos às plantas e geraria população migrante ao final do ciclo. Com o desenvolvimento da cultura, observa-se algo pouco explorado em estudos de movimentação, que é a população de adultos de *S. frugiperda* em milho em estágio reprodutivo. Isso nos permite compreender o padrão de dispersão do inseto em ambiente inadequado para o desenvolvimento da fase larval, em que se observa movimentação de saída dos insetos, confirmando que eventuais ataques de larvas de *S. frugiperda* nesse período não se refere a novas populações.

Por fim, deve-se compreender melhor a movimentação inicial de entrada de insetos na área de milho. Amostragens antes da emergência das plantas permitem entender o momento em que as plantas iniciam a atratividade de comprovar o status sexual desses insetos ao adentrarem a área. Ainda, o uso de diferentes estratégias de amostragem, utilizando armadilhas contendo atrativo alimentar associada a armadilhas com feromônio ou armadilhas luminosas, aumentando a amostragem de diferentes sexos. Visando a amostragem da área externa, o posicionamento das armadilhas em distâncias maiores permitirá diferenciar, de forma mais precisa, a movimentação dos insetos entre as áreas de cultivo e entorno.

3.5 REFERÊNCIAS

- Carroll MJ, Schmelz EA, Meagher RL, Teal PE (2006) Attraction of *Spodoptera frugiperda* larvae to volatiles from herbivore-damaged maize seedlings. **Journal of chemical ecology** 32:1911-1924.
- Cheng WJ, Zheng XL, Wang P, Zhou LL, Si SY, Wang XP (2016) Male-biased capture in light traps in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae): results from the studies of reproductive activities. **Journal of insect behavior** 29:368-378.
- Davis FM, Ng SS, Williams WP (1992) **Visual rating scales for screening whorl stage corn for resistance to fall armyworm** (No. 30875 Caja (346)). Mississippi State University.
- Davis FM, Williams WP, Chang YM, Baker GT, Hedin PA (1999) Differential growth of fall armyworm larvae (Lepidoptera: Noctuidae) reared on three phenotypic regions of whorl leaves from a resistant and a susceptible maize hybrid. **Florida Entomologist** 82:248– 254.
- De Lange ES, Laplanche D, Guo H, Xu W, Vlimant M, Erb M, Turlings TC (2020) *Spodoptera frugiperda* caterpillars suppress herbivore-induced volatile emissions in maize. **Journal of Chemical Ecology** 46:344-360.
- Du Plessis H, Schlemmer ML, Van den Berg J (2020) The effect of temperature on the development of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Insects** 11:228.
- He W, Zhao X, Ge S, Wu K (2021) Food attractants for field population monitoring of *Spodoptera exigua* (Hübner). **Crop Protection** 145:105616.
- Koffi D, Agboka K, Adjevi AKM, Assogba K, Fening KO, Osae M, Nagoshi R N (2021) Trapping *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Moths in Different Crop Habitats in Togo and Ghana. **Journal of Economic Entomology** 114:1138-1144.
- Kromann SH, Saveer AM, Binyameen M, Bengtsson M, Birgersson G, Hansson BS, Schlyter F, Witzgall P, Ignell R, Becher PG (2015) Concurrent modulation of neuronal and behavioural olfactory responses to sex and host plant cues in a male moth. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 282:20141884.
- Meagher RL, Nagoshi RN (2004) Population dynamics and occurrence of *Spodoptera frugiperda* host strains in southern Florida. **Ecological Entomology** 29:614 – 620.
- Murúa MG, Vera MT, Abraham S, Juarçz ML, Prieto S, Head GP, Willink E (2008) Fitness and mating compatibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from different host plant species and regions in Argentina. **Annals of the Entomological Society of America** 101:639-649.

Qureshi JA, Buschman LL, Throne JE, Ramaswamy, SB (2006) Dispersal of adult *Diatraea grandiosella* (Lepidoptera: Crambidae) and its implications for corn borer resistance management in *Bacillus thuringiensis* maize. **Annals of the Entomological Society of America** 99:279-291.

R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Rosa APSA, Teixeira HB, Medina LB, Hellwig L, Fipke MV (2014) Ponte Verde para *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em Terras Baixas. Embrapa Clima Temperado-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).

Sparks AN (1979) Fall Armyworm Symposium: A review of the biology of the fall armyworm. **Florida Entomologist** 62:82-87.

Subedi KD, Ma BL (2005) Nitrogen uptake and partitioning in stay-green and leafy maize hybrids. **Crop Science** 45:740-747.

Téllez-Rodríguez P, Raymond B, Morán-Bertot I, Rodríguez-Cabrera L, Wright DJ, Borroto CG, Ayra-Pardo C (2014) Strong oviposition preference for Bt over non-Bt maize in *Spodoptera frugiperda* and its implications for the evolution of resistance. **BMC biology**, 12:1-11.

Thompson JN (1988) Evolutionary ecology of the relationship between oviposition preference and performance of offspring in phytophagous insects. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 47:3 –14.

Tisdale RA, Sappington TW (2001) Realized and potential fecundity, egg fertility, and longevity of laboratory-reared female beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) under different adult diet regimes. **Annals of the Entomological Society of America** 94:415-419.

Tuskes PM, Tuttle JP, Collins M (1996) **The wild silk moths of north America: a natural history of the Sauriidae of the United States and Canada**. Cornell University Press, Ithaca. 250p.

Vilarinho EC, Fernandes OA, Hunt TE, Caixeta DF (2011) Movement of *Spodoptera frugiperda* adults (Lepidoptera: Noctuidae) in Maize in Brazil. **Florida Entomologist**, 94:480-488.

CAPÍTULO 4 – CAPACIDADE DE VOO DE ADULTOS DE *Spodoptera frugiperda*

RESUMO – O deslocamento de insetos é uma área de estudo em que a observação direta do deslocamento a campo é um limitante, por necessitar de ferramentas que determinem o posicionamento do inseto durante o voo. Apesar do surgimento de tecnologias incipientes nesse sentido, a estimativa de capacidade de voo de voo, comparando cenários, é possível através do uso de equipamentos de voo tutorado, em que o voo do inseto é livre, não havendo possibilidade de pouso. Visando extrapolar os resultados obtidos no estudo de deslocamento dos insetos a campo, esse capítulo tem por objetivo comparar a capacidade de voo de machos e fêmeas de *S. frugiperda*, virgens e acasalados, na presença de voláteis de planta hospedeira e atrativo sexual. Para isso, machos e fêmeas foram submetidos aos tratamentos de insetos virgens e acasalados, ausência de presença de voláteis de plantas de milho e, para os machos, ausência ou presença de feromônio e a junção dos fatores feromônio e voláteis de plantas. O status sexual não afetou a capacidade de voo de machos e fêmeas. Na presença de feromônio, o tempo de voo de machos foi maior que na ausência de voláteis ou na presença de voláteis de milho, mesmo que juntamente ao feromônio. A velocidade ou distância de voo de fêmeas não alterou com a presença de voláteis de milho. Esses resultados sugerem que, mesmo com iguais capacidades de voo, as fêmeas virgens não priorizam a movimentação por fatores comportamentais.

Palavras-chave: flight mill, distância de voo, tempo de voo, velocidade média

4.1 INTRODUÇÃO

A movimentação de insetos a longas distâncias ocorre principalmente na fase adulta, em que insetos alados alçam voos buscando alimento, indivíduos do sexo oposto para cópula ou por ambientes propícios ao desenvolvimento de sua prole (Sparks, 1979; Ge et al., 2021). O padrão de dispersão desses insetos tem impactos diretos na distribuição espacial da população do inseto, influenciando a dinâmica espaço-temporal, fator que é considerado na tomada de decisão para o controle de pragas.

Sabe-se que o caminho percorrido pelos adultos é guiado principalmente por estímulos visuais, como a presença de luz, e olfativos, como a presença de voláteis de plantas e feromônios (Robinet, David e Jactel, 2019). Porém, os estímulos podem afetar de forma distintas os insetos de uma mesma espécie, como os feromônios, substâncias atrativas aos machos da espécie, que buscam por acasalamento, mas que não atraem as fêmeas (Robinet, David e Jactel, 2019). Por outro lado, os voláteis de plantas são mais atrativos às fêmeas que machos, pois estas buscam por ambiente adequado para ovipositar os ovos que darão início à população seguinte (Yactayo-Chang et al., 2021).

A determinação da movimentação dos insetos a campo, sobretudo isolando os fatores de atratividade, é um limitante. Para isso, equipamentos de voo tutorado, denominados flight mill, são utilizados para comparar a capacidade de voo de insetos, determinando distância percorrida, tempo de voo e velocidade média (Naranjo, 2019). Os dados obtidos por esse equipamento não correspondem necessariamente ao descrito pelos insetos em condições de campo, onde os estímulos de deslocamento são seguidos pelo pouso do inseto ao alcançar a fonte do atrativo, o que não é possível no voo tutorado. Dessa forma, a capacidade de voo em diversos cenários é comparada.

Além determinar a capacidade de voo dos diferentes sexos, também é importante compreender a dinâmica de voo entre os insetos com diferente status sexual, que tem grande importância em estudos ecológicos, como o realizado no capítulo 3. Embora a capacidade de voo tenha sido estudada entre machos e fêmeas virgens e acasalados, a interação com os estímulos externos não foi determinada (Ge

et al., 2021). Em estudos de resposta sensorial da antena dos insetos, esses estímulos foram hierarquizados, sem ter sido estimada a resposta dos insetos em relação à capacidade de voo (Saveer, 2012; Kromann et al., 2015).

A compreensão desses fatores permitirá o refinamento dos estudos de manejo de resistência de insetos, uma vez que a interação dos insetos com a paisagem é um fator fundamental para sua dispersão. Uma vez que o fluxo gênico é diretamente afetado pela movimentação dos insetos, determinar como o entorno afeta o voo de adultos é fundamental.

Frente à necessidade de determinar a resposta de adultos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) aos estímulos sensoriais presentes em área de produção de milho, o presente estudo objetivou comparar a capacidade de voo de machos e fêmeas de *S. frugiperda*, virgens e acasalados, tendo como variáveis a presença ou não de voláteis de milho ou feromônio liberado por fêmeas virgens e sua associação.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Insetos

Os insetos utilizados no experimento foram obtidos de posturas de *S. frugiperda* retiradas de criação mantida em laboratório por período superior a dez anos. As posturas foram lavadas em soluções de formaldeído (10%), água destilada e sulfato de cobre (1%), por três segundos em cada solução. Após secarem, as posturas foram colocadas em pote plástico de 100 mL com tampa, contendo 4 cm³ de dieta artificial (Vilela et al., 2014). Após a eclosão, as larvas foram mantidas no mesmo recipiente até o quinto dia.

Posteriormente, as larvas foram individualizadas em placas de Petri (6,0 cm diâmetro x 2,0 cm altura) contendo aproximadamente 2 cm³ de dieta artificial, em condições controladas (25 ± 2°C; UR 70 ± 10%; Fotofase 12h) até o final do período larval. Após a formação das pupas, estas foram separadas por sexo pela observação de caracteres morfológicos ao final do abdômen, conforme Butt e Cantu (1962), sendo

as pupas armazenadas em gaiolas separadas de acordo o sexo, gerando adultos virgens.

Os adultos, anteriormente à instalação dos ensaios, foram mantidos em gaiola de policloreto de vinila (PVC) de 20 cm de altura e 10 cm de diâmetro, forrado internamente por papel sulfite, utilizado como substrato de oviposição, e fechado por tecido do tipo *voile*, sobre o qual foi oferecida solução de mel (10%) embebida em chumaço de algodão. Após a emergência dos adultos, foi instalada uma terceira gaiola da mesma coorte, na qual 8 casais foram formados, para fornecer insetos acasalados ao experimento.

4.2.2 Preparação dos insetos

Adultos de *S. frugiperda*, entre 3 e 6 dias após a emergência, por apresentarem mesma capacidade de voo (Jiang, Luo e Sappington, 2010), foram retirados da gaiola de criação de adultos e imobilizados por sucção em mangueira ligada a uma máquina de vácuo à pressão de aproximadamente 130 mm Hg. A pressão negativa exercida pelo vácuo manteve os insetos parados, embora ainda movimentassem as asas. Inicialmente retirou-se as escamas presentes no mesonoto com o auxílio de um pincel nº 2 de cerdas finas. Após a limpeza, foi espalhado sobre o mesonoto uma fina camada de cola instantânea a base de etilcianoacrilato (Tekbond® adesivo instantâneo nº 3).

Imediatamente após a aplicação da cola instantânea, uma agulha (Milward Darning nº 8) era fixada ao mesonoto por uma gota, de aproximadamente 3 mm de diâmetro, de cola termocola a base de silicone e resinas plásticas (Tilibra®). Nesse momento, a bomba de vácuo era desligada e, após 5 segundos da fixação da agulha, o inseto era retirado da mangueira de vácuo e levado ao flight mill, em que a agulha era acoplada à extremidade da haste que compõe o equipamento.

4.2.3 Coleta de dados

O voo tutorado de *S. frugiperda* foi conduzido em flight mills. O equipamento consiste de uma haste metálica de 30 cm fixada, no ponto central, a um eixo vertical

estático, sobre o qual a haste se move livremente no eixo horizontal impulsionada pelo movimento dos insetos. Uma segunda haste, de 4 cm, fixada logo abaixo da haste maior e, portanto, descrevendo o mesmo movimento, contém um ímã, que a cada volta responde ao impulso elétrico emitido por um sensor ligado a um módulo e, assim, cada passagem do ímã (360°) corresponde à distância percorrida de 0,942 m.

O módulo de coleta de dados utilizado permitiu a obtenção da distância percorrida (m), velocidade (m s^{-1}) e tempo (s), total e por voo. Os dados foram transmitidos a um software instalado em computador posicionado na parte externa da sala de condução dos experimentos, para que os dados fossem armazenados em software.

Uma vez que o voo de *S. frugiperda* ocorre preferencialmente no período noturno, iniciando no crepúsculo (Sparks, 1979), os ensaios foram realizados durante a escotofase. A coleta de dados se iniciou às 17:00 h e foi encerrada às 07:00 h, compreendendo o período noturno (18:00 às 06:00), acrescido de uma hora antes e uma hora após o período noturno (Caixeta, 2014).

4.2.4 Delineamento

Para determinar a capacidade de voo de insetos de diferentes sexos e status sexuais na presença ou ausência de plantas de milho, foram conduzidos ensaios em sistema fatorial $2 \times 2 \times 4$, sendo os fatores compostos pelo sexo (macho e fêmea), status sexual (virgem e acasalado) e os cenários (1. ausência de voláteis, 2. voláteis de milho, 3. feromônio sexual e 4. voláteis de plantas e feromônio sexual). Como cada cenário somente poderia ser avaliado individualmente por conta da quantidade limitada de equipamentos (flight mills), os quais estavam instalados numa mesma sala, vários ensaios foram realizados e agrupados, conforme proposto por Schumacher et al., (1997) e El-Shafie, Mohammed e Alqahtani (2022). Para cada sexo e status de acasalamento foram adotados 30 insetos, sendo que cada inseto representou uma repetição.

4.2.5 Análise estatística

Os dados de velocidade média de voo, distância percorrida e tempo de voo para machos e fêmeas, virgens e acasalados, foram analisados usando modelos mistos (PROC MIXED, SAS Institute). Foram feitas correções sempre que não houve homocedasticidade das variâncias.

4.3 RESULTADOS

Machos virgens e acasalados de *S. frugiperda* não apresentaram diferenças quanto ao tempo de voo ($F_{1,159} = 1,92$; $P = 0,170$), distância percorrida num período de 14 h ($F_{1,159} = 1,46$; $P = 0,231$) ou velocidade média de voo ($F_{1,159} = 0,03$; $P = 0,860$). Por outro lado, verificou-se diferença significativa para o tempo de voo ($F_{3,159} = 2,70$; $P = 0,049$) e velocidade média ($F_{3,159} = 4,08$; $P = 0,008$) de machos, independente do status sexual, sendo que a presença do feromônio sexual no ambiente causou incremento de 146,74% do tempo de voo e redução de 18,91% na velocidade (Tabela 1 e Figura 1). Para os insetos virgens na ausência de estímulos olfativos o tempo de voo médio foi de 1032,39 s, distância percorrida de 527,27 m e velocidade média de $0,70 \text{ m s}^{-1}$.

As fêmeas, de forma semelhante, não apresentaram diferença em relação ao tempo de voo ($F_{1,159} = 0,47$; $P = 0,494$), distância percorrida ($F_{1,159} = 0,64$; $P = 0,452$) ou velocidade média de voo ($F_{1,159} = 3,54$; $P = 0,064$). Ainda, diferentemente dos machos, a presença de milho não causou alteração significativa no tempo de voo ($F_{1,159} = 0,04$; $P = 0,840$), distância percorrida ($F_{1,159} = 0,79$; $P = 0,378$) ou velocidade média de voo ($F_{1,159} = 0,53$; $P = 0,469$) das fêmeas a despeito do status sexual (Tabela 2, Figura 1). Para as fêmeas virgens na ausência de voláteis de milho o tempo de voo médio foi de 6548,79 s, distância percorrida de 4105,96 m e velocidade média de $0,62 \text{ m s}^{-1}$.

Tabela 1. Aspectos do voo de machos virgens e acasalados de *Spodoptera frugiperda* em diferentes cenários contendo estímulos olfativos. Tempo total de voo (s), distância total percorrida (m) e Velocidade média (m s^{-1}).

Status sexual/estímulo		Tempo	Distância	Velocidade
Status sexual	Virgem	2248,16 $\pm$ 374,99 a	1208,50 $\pm$ 268,16 a	0,64 $\pm$ 0,02 a
	Acasalado	2918,28 $\pm$ 507,16 a	1605,58 $\pm$ 299,93 a	0,67 $\pm$ 0,03 a
Estímulo olfativo	Ausência de voláteis	1493,80 $\pm$ 368,70 b	907,71 $\pm$ 228,52 a	0,74 $\pm$ 0,04 a

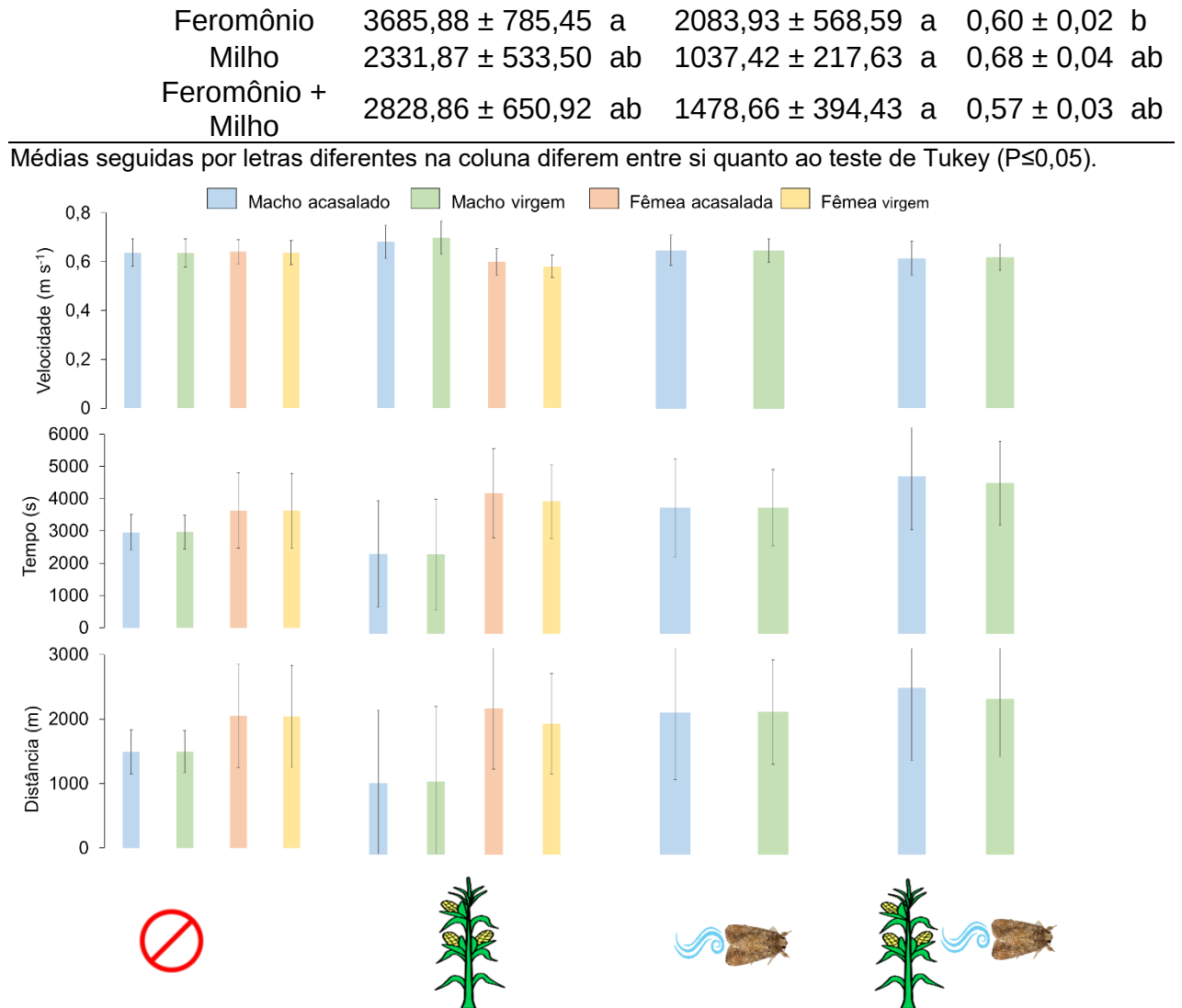


Figura 1. Resposta de fêmeas e machos de *Spodoptera frugiperda* à ausência de estímulos olfativos; voláteis de milho; feromônio sexual e voláteis de milho + feromônio sexual, em função do tempo de voo, distância percorrida e velocidade média.

Tabela 2. Aspectos do voo de fêmeas virgens e acasaladas de *Spodoptera frugiperda* em diferentes cenários contendo estímulos olfativos. Tempo total de voo (s), Distância total (m) e Velocidade média ($m s^{-1}$).

Status sexual /Estímulo		Tempo		Distância		Velocidade	
Status sexual	Virgem	5888,76 ± 1088,77	a	3478,87 ± 716,16	a	0,65 ± 0,02	a
	Acasalado	4785,69 ± 1089,46	a	2658,65 ± 822,32	a	0,57 ± 0,03	a
	Milho Ausente	5547,46 ± 1079,38	a	3552,23 ± 887,92	a	0,62 ± 0,03	a
	Milho Presente	5243,11 ± 1115,18	a	2671,62 ± 615,16	a	0,61 ± 0,03	a

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente entre si pelo teste F ($P \leq 0,05$).

4.4 DISCUSSÃO

O status sexual de machos e fêmeas de *S. frugiperda* não afeta a capacidade de voo a despeito da presença ou não de voláteis ambientais (plantas de milho) ou sociais (feromônio sexual). Embora espera-se que machos virgens apresentem maior sensibilidade à presença de feromônios que os acasalados, isso não ocorre a partir de 24 h após o acasalamento, mesmo havendo alterações fisiológicas no sistema sensorial (Saveer, 2012; Kromann et al., 2015).

Isso se deve à possibilidade de múltiplas cópulas na espécie e, portanto, independentemente do status sexual, os machos devem estar aptos a localizar as fêmeas para realizarem a cópula (Schmidt-Büsser, 2009). Nesse sentido, também não houve interferência do status sexual de machos para a capacidade de voo quando na presença de voláteis de milho. É possível que esse comportamento se deva à necessidade de localização do milho pelo macho, com o objetivo de identificar área com maior probabilidade de localização de fêmeas. Assim, a resposta dos machos aos voláteis ambientais e sociais em relação ao status sexual, seguem o mesmo padrão (Jiang, Luo e Sappington, 2010; Ge et al., 2021).

A presença de semioquímicos pode afetar a capacidade de voo de machos de *S. frugiperda*. O incremento do tempo de voo de machos na presença de feromônio sexual está diretamente ligada à redução da velocidade de voo nesse cenário, o que é possivelmente o tipo de resposta exibida por machos de *S. frugiperda* sobrevoando locais com a presença de fêmeas. Nossa hipótese é que, contrariando o observado com voláteis de milho, ao detectarem a presença de feromônio, os machos passam a buscar diretamente o inseto que está liberando o odor, visto que é a localização do inseto que permite a cópula. Estima-se que os voos relacionados ao forrageamento estão ligados a dois fatores, um deles é a redução da velocidade e o outro o aumento do ângulo de voo, fazendo com que o inseto durante o voo tenha menor deslocamento espacial, cobrindo de forma mais eficiente a área sobrevoada. Por outro lado, voos com maior velocidade e menor ângulo de voo descrevem voos migratórios.

Esse comportamento foi demonstrado em estudos visando compreender a resposta de machos de *S. frugiperda* à presença de feromônio, em que observaram que dois comportamentos podem ser desencadeados, a excitação sexual e a anemotaxia, comportamento em que os insetos se orientam utilizando correntes de ar como pistas direcionais (Miller e Roelofs, 1978; Pontes, 2010). Em estudos de voo tutorado a anemotaxia não só estimula o início do voo, mas também a manutenção do voo, que faz com que quanto maior o estímulo, maior o tempo de voo (Miller e Roelofs, 1978).

Por outro lado, a associação do feromônio aos voláteis de milho reduziu o estímulo observado com o oferecimento isolado do feromônio, o que é justificado pelo tipo de comportamento que a detecção do estímulo pode gerar aos insetos. Os insetos possuem dois subsistemas olfativos, o principal, que processa informações dos voláteis ambientais, como os emitidos pelas plantas hospedeiras, e o subsistema acessório, voltado para detectar informações sociais, como feromônios sexuais (Christensen e Hildebrand, 2002).

Independentemente do subsistema utilizado, a detecção dos estímulos é feita pela degradação dos voláteis por enzimas específicas presentes nas antenas e essas enzimas são produzidas por genes específicos. Assim, a resposta aos voláteis é reduzida na presença de voláteis ambientais pois os genes que são mais expressos na presença de feromônio são inibidos na presença de voláteis de plantas (Dickens et al. 1993; Loughrin et al. 1994; Dunkelblum et al. 1987; Durand et al. 2011; Party et al., 2013; He et al., 2014; Wan, Qian e Du, 2015).

A presença de voláteis liberados por plantas de milho não alterou a capacidade de voo de fêmeas de *S. frugiperda*. Assim como observado para os machos, a detecção de voláteis por insetos, mesmo que gere respostas fisiológicas, pode não refletir diretamente na capacidade de dispersão dos insetos. Nesse sentido, a hipótese de que fêmeas apresentassem alterações na capacidade de voo frente a presença de voláteis de milho foi refutada, o que é justificado pela elevada presença de sensilas específicas nas antenas desses insetos (Ramachandran et al. 1990, Rojas 1999, Fraser et al. 2003; Malo et al., 2004; Durand et al., 2011), pela necessidade de encontrarem local adequado para o desenvolvimento da prole e, então, realizarem a oviposição (Sparks, 1979).

Porém, além do tipo de resposta no inseto, a composição dos voláteis também é um fator de grande importância, pois a presença de compostos repelentes, como os compostos decorrentes do ataque de herbívoros, pode inibir a ativação das sensilas para a detecção dos voláteis ambientais (Zakir et al., 2013; Beyaert e Hilker 2014; Borrero-Echeverry et al., 2015; Hatano et al. 2015; Yactayo-Chang et al., 2021). Nesse sentido, foi demonstrada a atratividade de fêmeas de *S. frugiperda* para oviposição em plantas intactas sobre plantas injuriadas (Téllez-Rodríguez et al., 2014). Esses resultados ressaltam a necessidade de compreender as respostas relacionadas à capacidade de voo de fêmeas de *S. frugiperda* expostas a voláteis de plantas intactas ou injuriadas por larvas de herbívoros.

Este trabalho permite inferir que machos e fêmeas, virgens ou acasalados, de *S. frugiperda*, têm o potencial de identificar a presença de áreas de milho e, assim, migrarem para essas áreas, respondendo aos estímulos ambientais (vide capítulo 3). Ao colonizarem a área de milho, os machos passam a responder mais ativamente ao feromônio sexual emitido pelas fêmeas, embora a resposta seja maior em ambientes sem a presença de voláteis de milho, facilitando o encontro entre machos e fêmeas.

4.5 REFERÊNCIAS

- Beyaert I, Hilker M (2014) Plant odour plumes as mediators of plant-insect interactions. **Biological Review Cambridge Philosophical Society** 89:68–81. <https://doi.org/10.1111/brv.12043>
- Borrero-Echeverry F, Becher PG, Birgersson G, Bengtsson M, Witzgall P, Saveer AM (2015) Flight attraction of *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae) to cotton headspace and synthetic volatile blends. **Frontiers in Ecology and Evolution**, 3:1-7.
- Butt BA, Cantu E (1962) **Sex determination of lepidopterous pupae**. USDA. RS. 33-75, 7p
- Caixeta DF (2014) **Marcação, voo tutorado e dispersão de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Erebidae) e *Chrysodeixis includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 83 f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) – Unesp, Jaboticabal.
- Christensen TA, Hildebrand JG (2002) Pheromonal and host-odor processing in the insect antennal lobe: how different? **Current Opinion in Neurobiology** 12:393 – 399. (doi:10.1016/S0959-4388(02)00336-7)
- Dickens JC, Visser JH, Van Der Pers JNC (1993) Detection and deactivation of pheromone and plant odor components by the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Physiology** 39:503–516. doi:10.1016/0022-1910(93)90083-4.
- Dunkelblum E, Kehat M, Harel M, Gordon D (1987) Sexual behaviour and pheromone titre of the *Spodoptera littoralis* female moth. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 44:241–247. doi:10.1111/j.1570-7458.1987.tb00551.x.
- Durand N, Carot-Sans G, Bozzolan F, Rosell G, Siaussat D, Debernard S, Cheretemps T, Maïbèche-Coisne M (2011) Degradation of pheromone and plant volatile components by a same odorant-degrading enzyme in the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. **PLoS ONE**, 6:e29147. doi:10.1371/journal.pone.0029147. PMID:22216190.
- El-Shafie H, Mohammed M, Alqahtani N (2022) A Preliminary Study on Flight Characteristics of the Longhorn Date Palm Stem Borer *Jebusaea hamerschmidtii* (Reiche 1878)(Coleoptera: Cerambycidae) Using a Computerized Flight Mill. **Agriculture**, 12:120.
- Fraser AM, Mechaber WL, Hildebrand JG (2003). Electroantennographic and behavioral responses of the sphinx moth *Manduca sexta* to host plant headspace volatiles. **Journal of Chemical Ecology** 29:1813–1833.
- Ge S, Sun X, He W, Wyckhuys KA, He L, Zhao S, Zhang H, Wu K (2021) Potential trade-offs between reproduction and migratory flight in *Spodoptera frugiperda*. **Journal of insect physiology**, 132, 104248.

Hatano E, Saveer AM, Borrero-Echeverry F, Strauch M, Zakir A, Bengtsson M, Ignell R, Anderson P, Becher PG, Witzgall P, Dekker T (2015) A herbivore-induced plant volatile interferes with host plant and mate location in moths through suppression of olfactory signalling pathways. **BMC Biology** 13:1-15

He P, Li ZQ, Liu CC, Liu SJ, Dong SL (2014) Two esterases from the genus *Spodoptera* degrade sex pheromones and plant volatiles. **Genome**, 57:201-208.

Jiang XF, Luo LZ, Sappington TW (2010) Relationship of flight and reproduction in beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), a migrant lacking the oogenesis-flight syndrome. **Journal of Insect Physiology**, 56:1631-1637.

Kromann SH, Saveer AM, Binyameen M, Bengtsson M, Birgersson G, Hansson BS, Schlyter F, Witzgall P, Ignell R, Becher PG (2015) Concurrent modulation of neuronal and behavioural olfactory responses to sex and host plant cues in a male moth. **Proceedings of the Royal Society B** 282:20141884. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2014.1884>

Loughrin JH, Manukian A, Heath RR, Turlings TC, Tumlinson JH (1994) Diurnal cycle of emission of induced volatile terpenoids by herbivoreinjured cotton plant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 91:11836–11840. doi:10.1073/pnas.91.25.11836. PMID:11607499.

Malo EA, Castrejón-Gómez VR, Cruz-López L, Rojas JC (2004) Antennal sensilla and electrophysiological response of male and female *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to conspecific sex pheromone and plant odors. **Annals of the Entomological Society of America**, 97:1273-1284.

Miller JR, Roelofs WL (1978) Sustained-flight tunnel for measuring insect responses to wind-borne sex pheromones. **Journal of Chemical Ecology**, 4: 187-198.

Naranjo SE (2019) Assessing insect flight behavior in the laboratory: a primer on flight mill methodology and what can be learned. **Annals of the Entomological Society of America**, 112:182-199.

Party V, Hanot C, Busser DS, Rochat D, Renou M (2013) Changes in odor background affect the locomotory response to pheromone in moths. **PLoS One** 8:e52897; doi: 10.1371/journal.pone.0052897.

Pontes GB (2010) **Comportamento sexual de *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae)**. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências – Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte.

Ramachandran R, Khan ZR, Caballero P, Juliano BO (1990) Olfactory sensitivity of two sympatric species of rice leaf folders (Lepidoptera: Pyralidae) to plant volatiles. **Journal of Chemical Ecology** 16:2647Ð2666.

Robinet C, David G, Jactel H (2019) Modeling the distances traveled by flying insects based on the combination of flight mill and mark-release-recapture experiments. **Ecological Modelling**, 402:85-92.

Rojas JC (1999) Electrophysiological and behavioral responses of the cabbage moth to plant volatiles. **Journal of Chemical Ecology**. 25:1867Ð1883.

Saveer AM (2012) **Recognition and modulation of olfactory signals in the noctuid moth *Spodoptera littoralis*** f. Tese (Doutorado em Biologia - Plant Protection) – Swedish University of Agricultural Sciences, Sueciae.

Schmidt-Büsser D, Von Arx M, Guerin PM (2009) Host plant volatiles serve to increase the response of male European grape berry moths, *Eupoecilia ambiguella*, to their sex pheromone. **Journal of Comparative Physiology A**, 195:853-864.

Schumacher P, Weyeneth A, Weber DC, Dorn S (1997) Long flights in *Cydia pomonella* L.(Lepidoptera: Tortricidae) measured by a flight mill: influence of sex, mated status and age. **Physiological Entomology**. 22:149-160.

Sparks AN (1979) Fall Armyworm Symposium: A review of the biology of the fall armyworm. **Florida Entomologist**, 62:82-87.

Vilela M, Mendes SM, Valicente FH, CARVALHO SDS, dos Santos AE, dos Santos CA, Araújo OG, Barbosa TAN, Carvalho EAR, da COSTA VHD (2014) Metodologia para criação e manutenção de *Helicoverpa armigera* em laboratório. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica** (INFOTECA-E).

Wan X, Qian K, Du Y (2015) Synthetic pheromones and plant volatiles alter the expression of chemosensory genes in *Spodoptera exigua*. **Scientific Reports**, 5:1-11.

Yactayo-Chang JP, Mendoza J, Willms SD, Rering CC, Beck JJ, Block AK (2021) *Zea mays* Volatiles that Influence Oviposition and Feeding Behaviors of *Spodoptera frugiperda*. **Journal of chemical ecology**, 47:799-809.

Zakir A, Sadek MM, Bengtsson M, Hansson BS, Witzgall P, Anderson P (2013) Herbivore-induced plant volatiles provide associational resistance against an ovipositing herbivore. **Journal of Ecology** 101:410–417.

CAPÍTULO 5 – DETERMINAÇÃO DO STATUS SEXUAL DE MACHOS DE *Spodoptera frugiperda* COMO BASE PARA O MANEJO DE RESISTÊNCIA DE INSETOS

RESUMO – A dinâmica de acasalamento é um fator importante para o manejo de resistência de insetos, pois determinar o status sexual de insetos em deslocamento e a fertilidade que apresentam pode permitir o cruzamento entre insetos resistentes e acasalados e, assim, reduzir o avanço da resistência de populações de insetos. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de determinar ferramenta para a detecção do status do acasalamento de machos de *S. frugiperda* e a implicação do status sexual prévio ao acasalamento na fertilidade das fêmeas. Para isso, dois ensaios foram conduzidos, sendo que o primeiro constou de dois tratamentos, um com insetos machos isolados das fêmeas e outro em que os machos foram acondicionados juntos de fêmeas, para que copulassem. O segundo constou da formação de casais em sequência, utilizando o mesmo macho, para determinar a fertilidade de fêmeas acasaladas com machos de status sexual prévio diferentes (virgem e acasalados). O primeiro ensaio comprovou a possibilidade de detecção do status de acasalamento dos machos por dissecação destes. O segundo ensaio comprovou que não há diferença de fertilidade de fêmeas acasaladas com machos previamente virgens ou acasalados. Ainda, foi possível determinar, pela coloração do espermatóforo, o status sexual do macho previamente à cópula.

Palavras-chave: espermatóforo, ducto ejaculatório, espermatozoide

5.1 INTRODUÇÃO

A compreensão de aspectos ecológicos de insetos se baseiam, entre outros fatores, nos comportamentos de dispersão e acasalamento (Southwood e Henderson, 2000). Conhecer a interação desses fatores permite inferir a respeito do fluxo genético dos insetos, fornecendo bases fundamentais para a elaboração de estratégias de manejo de resistência de insetos às táticas de controle.

O conhecimento da dispersão de insetos-praga tem sido constituído por meio de estudos de marcação-liberação-captura. Esses estudos se baseiam na liberação de insetos marcados externa ou internamente em um local conhecido na paisagem, sendo as armadilhas para captura distribuídas em locais determinados, de forma que permitam capturar o maior número de insetos, estimando sua capacidade de deslocamento em condições naturais. Muitos estudos nesse sentido foram realizados com lepidópteros, sobretudo as espécies que causam prejuízo aos cultivos. Dentre esses, destacam-se *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Ostrinia nubilalis* (Hubner) (Lepidoptera: Crambidae), pragas importantes no cultivo do milho no Brasil e Estados Unidos, respectivamente (Hunt et al., 2001; Vilarinho et al., 2011).

Embora esses estudos tenham sido fundamentais para determinar o deslocamento dos insetos, e até mesmo para a construção de bases para a determinação do status sexual de fêmeas (Hunt et al., 2001), os estudos não tiveram por objetivo avaliar o status sexual dos machos capturados. Portanto, os resultados desses estudos apontam de forma parcial a forma em que ocorre o fluxo gênico.

Por outro lado, o status sexual dos insetos, especialmente de fêmeas, foi explorado em condições laboratoriais, baseando-se na presença ou ausência de espermatóforos no interior do sistema reprodutor de fêmeas. Esses estudos apontam se a fêmea havia ou não acasalado até o momento da avaliação, podendo até mesmo inferir sobre a quantidade de acasalamento realizados (Snow e Carlysle, 1967). Embora o status sexual de fêmea tenha sido explorado e o conhecimento tenha sido largamente difundido, o mesmo não aconteceu com insetos machos, que possuem apenas algumas descrições acerca das diferenças morfológicas internas existentes

entre insetos virgens e acasalados (Snow e Carlysle, 1967; LaMunyon e Huffman, 2001; Seth et al., 2002).

A avaliação do acasalamento também apresenta importante característica a respeito da ecologia desses insetos, uma vez que os espermatóforos transferidos por machos no primeiro acasalamento apresentam coloração distinta daqueles transferidos por machos anteriormente acasalados (Snow e Carlysle, 1967). Essa possibilidade de distinção permite identificar padrões na preferência de acasalamento, somando aos demais fatores no estudo ecológico.

Esses conhecimentos técnicos permitem a elaboração de estimativas de movimentação do material genético dentro da população. A detecção do status sexual de machos determina, inicialmente, a hierarquia de estímulos, determinando se o inseto acasala antes ou após o voo. Ao relacionar esses resultados ao comportamento de fêmeas, pode-se prever a movimentação de insetos na área em relação ao status de acasalamento e, assim, refinar a tática de manejo de resistência por uso de áreas de refúgio.

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo identificar e ilustrar a diferença na morfologia interna de machos de *S. frugiperda* virgens e acasalados, bem como caracterizar, com vistas à fertilidade, o potencial de espermatóforos produzidos por machos virgens ou previamente acasalados em situação simulada de campo, visando construir ferramenta para a compreensão do fluxo gênico da espécie.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Ensaio 1

Para a obtenção da população utilizada no experimento, foram coletadas cinco posturas de *S. frugiperda* de criação mantida em laboratório por período superior a dez anos. As posturas foram lavadas em soluções de formaldeído (10%), água destilada e sulfato de cobre (1%), por três segundos em cada solução. Após secarem, cada postura foi colocada em um pote plástico de 100 mL com tampa, contendo 2 cm³ de dieta artificial (Vilela et al., 2014). Após a eclosão, as larvas foram mantidas no mesmo recipiente até o quinto dia.

Posteriormente, as larvas foram individualizadas em placas de Petri (6,0 cm diâmetro x 2,0 cm altura) contendo 4 cm³ de dieta artificial, em condições controladas (25 ± 2°C; UR 70 ± 10%; Fotofase 12h) até o final do período larval. Após a empupação, estas foram separadas por sexo pela observação de caracteres morfológicos ao final do abdômen, conforme Butt e Cantu (1962), sendo as pupas armazenadas em gaiolas separadas de acordo o sexo.

Após a emergência dos adultos, os tratamentos foram instalados, sendo que para o tratamento 1, três insetos (um macho e duas fêmeas) foram acondicionados em uma gaiola formada por um copo plástico de 770 mL (10 cm diâmetro superior x 6,5 cm diâmetro inferior x 15,5 cm altura) (Copaza®), fechados por *voile*, sobre o qual foi ofertada solução de mel (10%) embebida em chumaço de algodão. Para o tratamento 2, foram colocados 10 machos em uma gaiola, visando otimizar espaço, sem comprometer o comportamento dos insetos (Figura 1). O tratamento 1 contou com 15 repetições, representadas por 15 gaiolas contendo três insetos cada, para cada data de avaliação, enquanto o tratamento 2 contou com 10 repetições representadas por uma gaiola contendo 10 machos para cada data de avaliação.



Figura 1. Esquema dos tratamentos utilizados para a determinação do status sexual de machos de *S. frugiperda*.

Para compreender a diferença morfológica entre machos virgens e acasalados durante o ciclo de vida do macho, as avaliações foram realizadas durante 12 dias,

compreendendo a idade média de vida dos adultos de *S. frugiperda*. Assim, em intervalos de 24 h todos os insetos contidos nas gaiolas correspondentes a cada data, tanto do tratamento 1 quanto do tratamento 2 foram avaliados. Para os machos, a retirada do aparelho reprodutor se deu com o auxílio de pinça de ponta reta (ESD-12). A exposição dos ductos ejacutórios permitiu avaliar as estruturas que armazenam os espermatozoides, com a observação da coloração realizada seguindo o diagrama de Munsell (Munsell Soil Color Company, 1950). As observações da estrutura se deram a olho nu, com confirmação em estereomicroscópio. As fêmeas foram avaliadas quanto à presença de espermatóforo para a confirmação do acasalamento por meio da retirada da bursa copulatrix, com o auxílio de pinça de ponta reta (ESD-12), observando a eventual presença de espermatóforo.

5.2.2 Ensaio 2

Para o segundo ensaio, a obtenção da população se deu de forma semelhante ao realizado para o ensaio 1. As pupas também foram separadas por sexo pela observação de caracteres morfológicos ao final do abdômen, conforme Butt e Cantu (1962) e armazenadas em gaiolas de acordo com o sexo. Após a emergência dos adultos, os tratamentos foram instalados. O primeiro tratamento, contendo machos virgens, se baseou em um macho e uma fêmea alocados em uma única gaiola. Utilizou-se, portanto, copo plástico de 770 mL (10 cm diâmetro superior x 6,5 cm diâmetro inferior x 15,5 cm altura) (Copaza®), fechados por *voile*, sobre o qual foi ofertada solução de mel (10%) embebida em chumaço de algodão. Internamente, os copos foram forrados com papel sulfite, utilizados pelas fêmeas como substrato para oviposição,

Após um período de 48 h da montagem do tratamento 1, as fêmeas foram transferidas para outra gaiola, onde foi mantida até o momento em que realizou a segunda postura de ovos. O período de 48 h foi adotado para o tratamento 1 por ter sido o tempo necessário para cópula, conforme observado no ensaio 1. Então, junto ao macho que compunha o tratamento 1 foi adicionada uma nova fêmea, formando o tratamento 2, no qual um macho previamente acasalado formou um casal com uma fêmea virgem. Após 24 h da instalação desse tratamento, a fêmea foi acondicionada

em outra gaiola até o momento em que realizou a segunda postura de ovos, de modo semelhante ao tratamento 1 (Figura 2). Nesse momento os machos foram avaliados quanto ao status sexual. As fêmeas, após realizarem a segunda postura também foram avaliadas quanto ao status sexual.

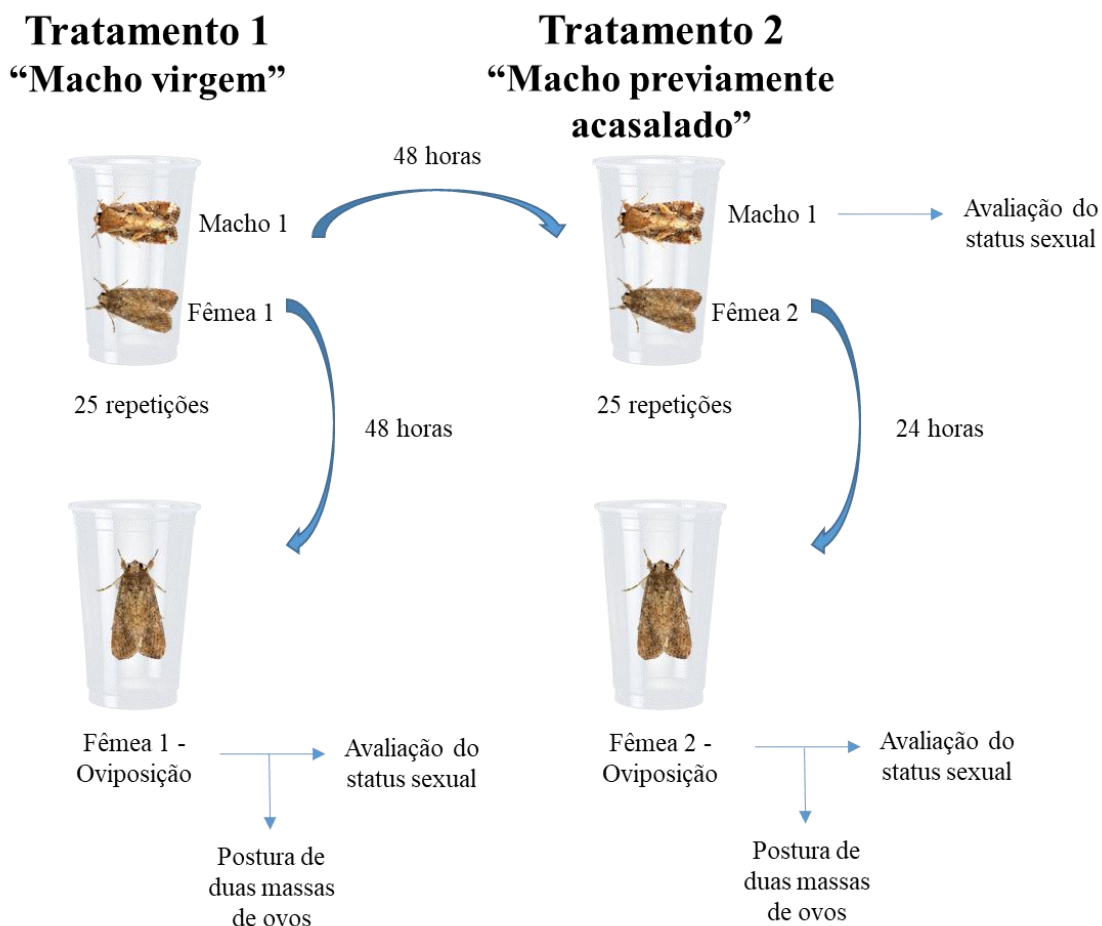


Figura 2. Esquema dos tratamentos utilizados para a fertilidade de fêmeas de *S. frugiperda* acasaladas com machos previamente virgens ou acasalados.

Para a avaliação do status sexual dos machos, a retirada do aparelho reprodutor se deu com o auxílio de pinça de ponta reta (ESD-12), sendo a avaliação realizada conforme o ensaio 1. As fêmeas, após a segunda postura, foram avaliadas quanto à presença de espermátóforo para a confirmação do acasalamento por meio da retirada da bursa copulatrix e observação da presença de espermátóforo. Para determinar a fertilidade das fêmeas após o período com os machos, as duas primeiras posturas de cada fêmea foram coletadas e colocadas individualmente em potes de 100 mL com tampa (Copaza®), sendo a quantidade de ovos inferida via contagem

direta com o auxílio de estereomicroscópio e as larvas, 24 h após a eclosão, contabilizadas.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Ensaio 1

A coloração dos ductos ejacutórios dissecados de machos de *S. frugiperda* variou de amarelo/marrom a vermelho/marrom (Figura 3), 24 h após a emergência do adulto, tanto no tratamento sem a presença de fêmeas (Figura 3A) quanto na presença de fêmeas (Figura 3B). Para o tratamento na presença de fêmeas, essas foram dissecadas e confirmaram que durante as primeiras 24 h não houve acasalamento. Nas avaliações seguintes, em que os machos haviam acasalado, foi possível constatar a diferença de coloração entre o ducto ejacutório de machos virgens e acasalados, sendo que os machos acasalados apresentam ducto ejacutório com ausência de coloração, ou seja, transparentes (Figura 3C).

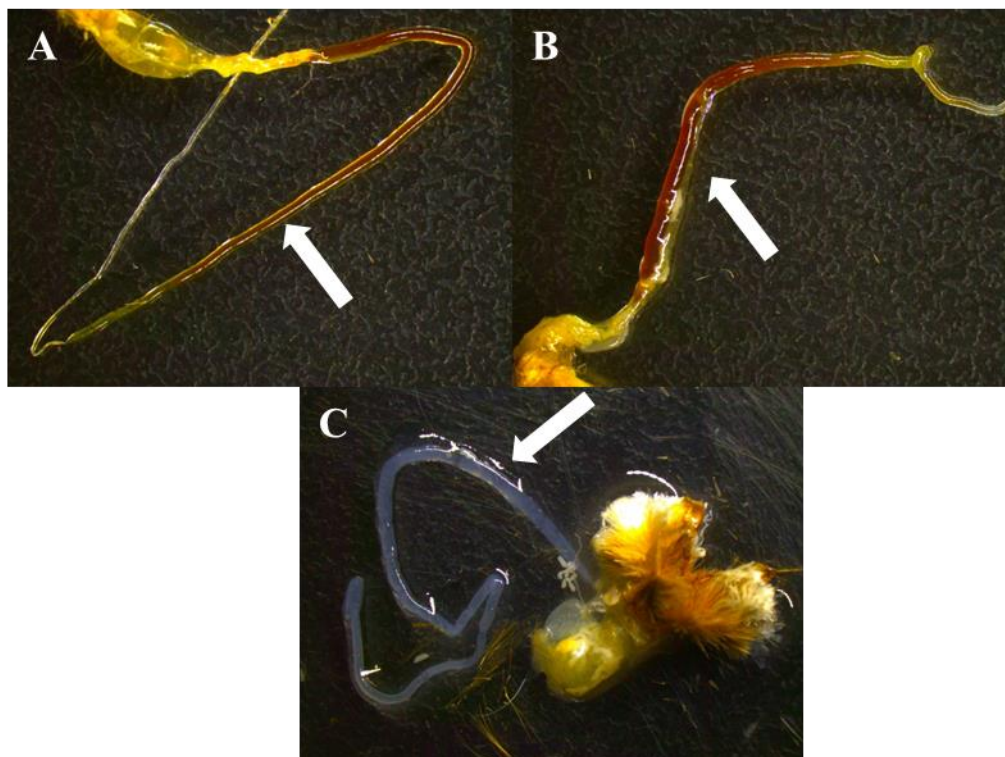


Figura 3. Parte do aparelho reprodutor de machos de *S. frugiperda*. Virgens na ausência de fêmeas (A), virgens na presença de fêmeas (B) e acasalados (C), com destaque para coloração do ducto ejaculatório (seta).

Para constatar o acasalamento entre machos e fêmeas que compunham o tratamento com presença de fêmea, foi observada a presença de espermatóforo no sistema reprodutor de fêmeas de *S. frugiperda*, especificamente na bursa copulatrix, estrutura na qual os espermatóforos são armazenados. Ainda, observou-se que essas estruturas apresentavam dois principais padrões de cores, sendo que aqueles de coloração amarela mais intensa (Figura 4A) (2,5Y 8/8 do diagrama de cores de Munsell) foram provenientes de machos virgens e os espermatóforos transparentes (Figura 4B) (2,5Y 8/1 do diagrama de cores de Munsell) foram provenientes de machos previamente acasalados.

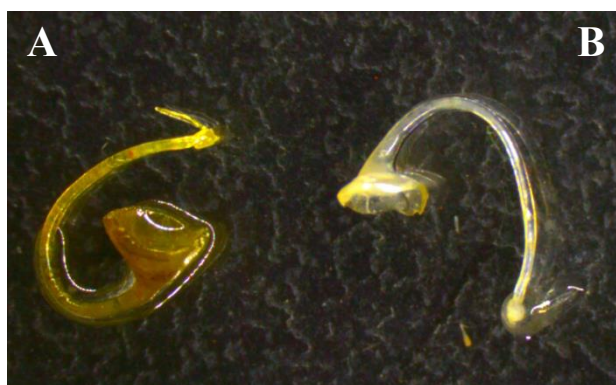


Figura 4. Espermatóforos de *S. frugiperda*. (A) Espermatóforo retirado de fêmea acasalada com macho virgem. (B) Espermatóforo retirado de fêmea acasalada com macho anteriormente acasalado.

O acasalamento de adultos de *S. frugiperda* se iniciou no segundo dia após a emergência dos machos (Figura 5). Observou-se nessa avaliação que 69,23% das fêmeas receberam apenas um espermatóforo, sendo este de coloração amarelo intensa, o que permite afirmar que o primeiro espermatóforo transmitido pelos machos apresenta este padrão de coloração. As fêmeas avaliadas entre 2 e 12 dias após a emergência (DAE) dos machos, continham, em média, um espermatóforo de coloração amarelo escura, sendo observado no máximo dois destes espermatóforos. A segunda cópula, observada pela transmissão do segundo espermatóforo, teve a

primeira ocorrência no segundo DAE, alcançando estabilidade a partir do terceiro DAE, mantendo-se próxima a 50% até o 12º. DAE (Figura 5).

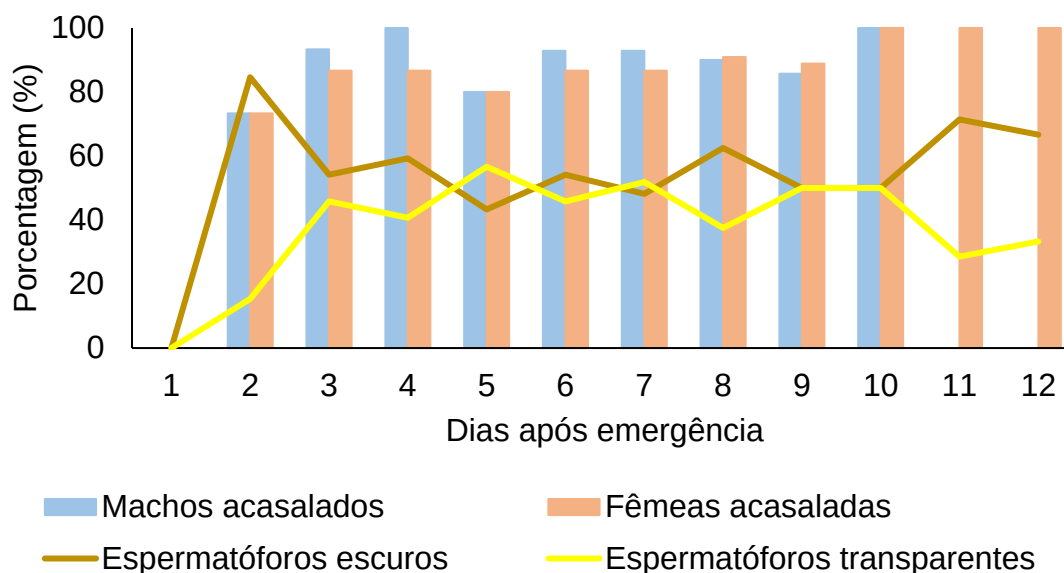


Figura 5. Status sexual de machos e fêmeas durante o ciclo de vida do macho. Descrição do padrão de espermatozoides de coloração amarelo intensa (escuros) e transparentes coletados das fêmeas que compunham o tratamento “presença de fêmeas”.

Porém, independentemente das avaliações realizadas diariamente durante toda a longevidade dos machos de *S. frugiperda*, foi possível observar, nos machos do tratamento ausência de fêmeas, a coloração amarela intensa do ducto ejaculatório. Dessa forma, a presença da coloração confirma a possibilidade de identificar machos acasalado.

5.3.2 Ensaio 2

Durante a avaliação para confirmação do acasalamento das fêmeas que formaram o primeiro casal com cada macho, foi observado que 10 das 25 fêmeas foram confirmadas como virgens, mesmo tendo permanecido com os machos por 48 h. Dessas virgens, duas fêmeas ovipositaram uma massa de ovos cada ($\bar{x} = 239,50$),

embora esses ovos não tenham sido viáveis, confirmados pela não eclosão de larvas (Tabela 2).

Tabela 2. Número médio de ovos por fêmea e viabilidade, em função de fatores morfológicos e do comportamento. N amostral refere-se ao número de posturas analisadas por tratamento.

		N amostral (posturas)	Média de ovos	Viabilidade de ovos (%)
Ordem de oferta das fêmeas	Primeira	32	248,64±24,10 ^{ns}	49,09±3,17 ^{ns}
	Segunda	16	295,86±47,75 ^{ns}	56,14±7,98 ^{ns}
Coloração dos espermatóforos	Escuro	27	249,35±28,30 ^{ns}	52,86±3,17 ^{ns}
	Transparente	15	295,86±50,74 ^{ns}	56,14±7,98 ^{ns}
Ordem das posturas	Primeira	25	303,22±30,82 ^a	48,17±4,35 ^{ns}
	Segunda	19	194,47±21,16 ^b	57,32±5,26 ^{ns}

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem entre si a 5% de significância para o teste de F.

A ordem de posturas depositadas pelas fêmeas de *S. frugiperda* afetou a média de ovos ($F_{1,40} = 5,994$; $P = 0,018$), sendo que a primeira postura apresentou 55,92% mais ovos que a segunda, embora a quantidade não tenha alterado a viabilidade destes ($F_{1,40} = 0,508$; $P = 0,480$).

5.4 DISCUSSÃO

5.4.1 Ensaio 1

O ducto ejaculatório de machos virgens de *S. frugiperda* apresentam coloração amarela a marrom escuro (2,5Y 6/8 a 3/8 do diagrama de cores de Munsell) em consequência ao acúmulo de substâncias que apresentam papel importante no momento da cópula. Essa substância, de acordo com Callahan e Cascio (1963), tem o papel de alterar o pH do sistema reprodutor das fêmeas durante e após o acasalamento. A ligeira alteração de pH, na ordem de 0,1, exercida pelo fluido presente nos ductos ejaculatórios, tem a capacidade de alterar o estado físico do espermatóforo, que passa de líquido, no sistema reprodutor do macho, a sólido, quando transmitido à bursa copulatrix, consequente da coagulação resultante da alteração do pH do ambiente. O mesmo mecanismo foi observado por Snow e Carlyle

(1967) em *S. frugiperda* e por Prosholdi (1991) em *Chloridea virescens* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Por outro lado, Mu e Sun (1980), ao trabalharem com *Mythimna separata* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), sugeriram que o fluido tem a função de estimular o sistema reprodutivo das fêmeas a iniciarem pulsações, o que faria com que os oócitos sigam em direção à espermateca, sejam fertilizados e, conseqüentemente, ocorra a oviposição.

Portanto, após a cópula, os machos passam a apresentar ducto ejaculatório transparente, ou seja, sem a presença do fluido de coloração amarelo a marrom escuro, o que se deve à baixa capacidade de produção do fluido pelos machos, não o repondo logo após a cópula. Dessa forma, o ducto ejaculatório dos machos que foram mantidos em gaiolas na presença de fêmeas se manteve incolor, independentemente da data de avaliação, uma vez que foi permitido ao macho acasalar repetidamente, não permitindo o acúmulo do fluido. Embora a coloração do ducto ejaculatório não foi vista novamente no presente estudo, foi descrita por Snow e Carlisle (1967), que ao constatarem o acasalamento de *S. frugiperda*, observaram que machos mantidos isolados após a cópula apresentaram coloração amarelo a marrom escuro seis dias após a cópula.

Em consequência à transferência do fluido presente no ducto ejaculatório durante a primeira cópula, a coloração do espermatóforo transferido também altera a depender da ordem de cópulas do macho. O primeiro espermatóforo transferido pelo macho, apresenta coloração amarelo a marrom escuro, assim como a coloração dos ductos ejaculatórios de machos virgens, corroborando o observado por Snow e Carlisle (1967) e Marti e Carpenter (2007). Isso também ocorre com o segundo espermatóforo transferido, porém mais raramente. A alteração na coloração dos espermatóforos permite especular o status sexual do macho no momento da cópula, sendo que espermatóforos escuros são oriundos de machos virgens ou que se acasalaram, no máximo, uma vez.

Ainda, confirma-se a capacidade de adultos de *S. frugiperda* se acasalarem até 48 h após a emergência dos machos, conforme observado por Etman e Hooper (1979) em *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). Os autores comprovaram que o acasalamento ocorre na noite subsequente à emergência dos adultos, tendo maior pico no terceiro dia e apresentando queda na frequência de cópulas a partir do

quinto dia. No presente estudo foi observada ainda a transferência de até dois espermatóforos no período de 48 h. Isso é possível, pois o tempo médio de cópula para insetos do gênero *Spodoptera* é de 80,8 minutos (Etman e Hooper, 1979), permitindo que os insetos acasalem duas vezes durante o período de 48 h.

Embora seja um conhecimento morfo/fisiológico, esses resultados têm elevada aplicabilidade prática. A possibilidade de distinguir entre machos virgens e acasalados, bem como a inferência a respeito do status sexual dos machos ao se acasalarem com a fêmea pela avaliação do espermatóforo coletado na bursa copulatrix, permitem compreender, entre outros aspectos, a dispersão de insetos virgens e acasalados em estudos de marcação-liberação-recaptura.

5.4.2 Ensaio 2

Embora tenha sido comprovado no ensaio 1 que adultos de *S. frugiperda* acasalam no período de 48 h após a emergência do macho, 20% (n= 5) das fêmeas que compuseram o tratamento com machos virgens não acasalaram durante esse período, sendo que duas dessas ovipositaram. Etman e Hooper (1979) explicam que a oviposição de fêmeas de *S. litura*, embora seja estimulada pelo acasalamento, não depende necessariamente desse acontecimento. Dessa forma, como confirmado no presente estudo, os ovos depositados pelas fêmeas virgens são inférteis e, portanto, não dão origem a larvas.

Para as fêmeas acasaladas, o fato de não ser observada diferença no número de ovos por postura ou viabilidade, tanto para a ordem de oferecimento das fêmeas aos machos, quanto a coloração dos espermatóforos, permite afirmar que os espermatóforos produzidos por machos de *S. frugiperda* até 72 h após a emergência apresentam capacidade de fertilizar os ovos que compõem as duas primeiras posturas depositadas pelas fêmeas. Esse fato é explicado pela elevada capacidade de produção e transferência de espermatozoides que a espécie apresenta. Machos de *S. frugiperda* recém-emergidos apresentam até 850.000 espermatozoides eupirenes, ou seja, espermatozoides nucleados e, portanto, capazes de fertilizar até 2000 ovos (Seth et al., 2002), além de apresentarem capacidade de produzirem espermatozoides

durante sua longevidade, o que pode gerar até 14 espermatóforos (Etman e Hooper, 1979).

Uma vez que durante a primeira cópula os machos transfiram aproximadamente 10% dos espermatozoides eupirenes, a quantidade de espermatozoides produzida pelos machos permite que estes permaneçam viáveis a acasalar e transferir seu material genético a fêmeas mesmo após acasalamento prévio, sem afetar a fertilidade (Cook, 1999; Seth et al., 2002). Por outro lado, LaMunyon e Heffman (2001) demonstraram que machos virgens e acasalados de *H. virescens* apresentam diferença na quantidade de espermatozoides eupirenes transmitidos para as fêmeas. Ainda, Muller et al. (2016) observaram, ao trabalharem com *Lobesia botrana* (Den. e Schiff.) (Lepidoptera: Tortricidae), que machos virgens transferiam espermatóforos de maior volume em comparação com machos previamente acasalados, o que refletiu em maior fecundidade na segunda metade das posturas realizadas pelas fêmeas.

Dessa forma, pode-se compreender que a determinação do status sexual é uma técnica de fácil utilização e que produz importante informação a respeito do fluxo gênico de *S. frugiperda*. Ainda, a capacidade de determinar o status sexual dos machos previamente ao acasalamento fornece importante ferramenta para compreender a população inicial da área em estudo, bem como a população no entorno da área.

5.5 REFERÊNCIAS

- Butt B, Cantu E, (1962). **Sex determination of lepidopterous pupae**. USDA, Agriculture Research Service Repository, 33:1-7.
- Callahan PS, Cascio T (1963) Histology of the Reproductive Tracts and Transmission of Sperm in the Corn Earworm, *Heliothis zea*. **Annals of the Entomological Society of America**, 56:535–556. doi:10.1093/aesa/56.4.535
- Cook PA (1999) Sperm numbers and female fertility in the moth *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera; Pyralidae). **Journal of Insect Behavior**, 12:767-779.
- Etman AA, Hooper GHS (1980) Developmental and reproductive biology of *Spodoptera litura* (F.)(Lepidoptera: Noctuidae). **Australian Journal of Entomology**, 18:363-372.
- Hunt TE, Higley LG, Witkowski JF, Young LJ, Hellmich RL (2001) Dispersal of adult European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) within and proximal to irrigated and non-irrigated corn. **Journal of Economic Entomology**, 94:1369-1377.
- LaMunyon CW, Huffman TS (2001) Determinants of sperm transfer by males of the noctuid moth *Heliothis virescens*. **Journal of Insect Behavior**, 14:187-199.
- Marti OG, Carpenter JE (2007) A character demonstrating the occurrence of mating in male *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae). **Florida Entomologist**, 90:278-281.
- Mu CY, Sun SS (1980) Study on the copulation and spermatophore formation in *Leucania separata* (Walker). **Acta entomologica Sinica**.
- Muller K, Arenas L, Thiéry D, Moreau J (2016) Direct benefits from choosing a virgin male in the European grapevine moth, *Lobesia botrana*. **Animal Behaviour**, 114:165-172.
- Munsell Color Company (1950, revised 1975), Munsell Soil Color Charts, Munsell color, Macbeth Division of Kollmorgen Corporation, Baltimore, MD.
- Prosholdi F (1991) Mating status of tobacco bud worm (Lepidoptera: Noctuidae) males captured in pheromone traps compared with males and females collected at night by hand. **Journal of economic entomology**, 84:1492-1498.
- Seth RK, Rao DK, Reynolds SE (2002) Movement of spermatozoa in the reproductive tract of adult male *Spodoptera litura*: daily rhythm of sperm descent and the effect of light regime on male reproduction. **Journal of insect physiology**, 48:119-131.
- Snow JW, Carlysle TC (1967) A characteristic indicating the mating status of male fall armyworm moths. **Annals of the Entomological Society of America**, 60:1071-1074.
- Southwood TER, Henderson PA (2000) **Ecological methods**, 3rd edn. Wiley, New York, p 593.

Vilarinho EC, Fernandes OA, Hunt TE, Caixeta DF (2011) Movement Of" *Spodoptera Frugiperda*" Adults (Lepidoptera: Noctuidae) In Maize In Brazil. **Florida Entomologist**, 480-488.

Vilela M, Mendes SM, Valicente FH, Carvalho SSS, Santos AE et al. (2014) Metodologia para Criação e Manutenção de *Helicoverpa armigera* em Laboratório. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo (Circular Técnica 203), Brasil.

CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Afim de determinar a capacidade de dispersão do material genético de *S. frugiperda*, o presente estudo utilizou como alternativa preferencial a marcação do material genético do macho. Durante a cópula, ao ser transferido às fêmeas, a presença do espermatóforo marcado permite a identificação da origem do macho com o qual a fêmea se acasalou. Essa técnica, quando aplicada em estudo de Marcação-Liberação-Captura a campo, permite determinar a distância em que, seguramente, o material genético do macho é distribuído. Essa informação permite o refinamento da distância atualmente adotada para o posicionamento das áreas de refúgio junto a cultivos em que são utilizados materiais Bt.

Porém, a marcação dos espermatóforos por meio do fornecimento de corante hidrossolúvel à fase larval não foi possível, exigindo o desenvolvimento de novas rotas que permitissem responder a pergunta inicial. Assim, foi realizado estudo de campo em que a população de *S. frugiperda* foi monitorada durante todo o ciclo da cultura do milho, o que permitiu compreender a dinâmica de movimentação dos insetos, distinguindo-os quanto ao sexo e, para as fêmeas, quanto ao status sexual. Dessa forma, foi possível demonstrar os movimentos de chegada e saída dos adultos de *S. frugiperda* durante a safra. Ainda, ficou evidenciado o estágio reprodutivo das plantas de milho marca o início do movimento de saída dos adultos.

Para compreender quais os fatores que afetam a movimentação dos insetos a campo, tanto para entrarem quanto para deixarem a área, foi desenvolvido teste de capacidade de voo tutorado. Esse estudo permitiu comparar a resposta de machos e fêmeas, virgens e acasalados, quanto a presença de voláteis emitidos por plantas de milho e feromônio, emitido por fêmeas. Observou-se que os insetos, embora respondam à presença dos voláteis de milho, eles não alteraram a capacidade de voo, embora os machos voem por maior período quando na presença de feromônio. Assim, demonstrou-se que a movimentação observada no teste a campo pode, muito provavelmente, estar relacionada à presença de voláteis.

Apesar disso, embora os testes de voo tutorado tenham permitido a observação do comportamento de machos virgens e acasalados de forma separada, a campo essa informação é escassa, devido à falta de informação quanto às técnicas para distinção entre machos virgens e acasalados. Para isso, foi aprimorada técnica

para a detecção do status sexual de machos de *S. frugiperda*, bem como determinada a influência na fertilidade da fêmea. Além disso, o estudo permitiu, via avaliação do espermatóforo transmitido à fêmea, determinar o status do acasalamento de machos de *S. frugiperda* previamente ao acasalamento.

As informações contidas nessa tese representam bases muito importantes para o desenvolvimento de estudos que permitam precisar a capacidade de dispersão do material genético de *S. frugiperda*. Ainda, abre novas áreas de estudo, como o comportamento de voo de fêmeas frente os estímulos sexuais e ambientais e o fluxo de populações de adultos de *S. frugiperda* em áreas produtivas. Certamente, os desdobramentos desses estudos darão maior robustez à escolha das técnicas de controle de insetos e permitirá o aumento da vida útil das tecnologias presentes em plantas Bt.