

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIFERENTES PLANTAS HOSPEDEIRAS ALTERAM A
SUSCETIBILIDADE DE *Spodoptera frugiperda*
(Lepidoptera: Noctuidae) AO SfMNPV E MODULAM OS
SEUS PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO E
FISIOLÓGICOS**

Ana Letícia Zéro dos Santos

Engenheira Agrônoma

2024

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIFERENTES PLANTAS HOSPEDEIRAS ALTERAM A
SUSCETIBILIDADE DE *Spodoptera frugiperda*
(Lepidoptera: Noctuidae) AO SfMNPV E MODULAM OS
SEUS PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO E
FISIOLÓGICOS**

**Discente: Ana Letícia Zéro dos Santos
Orientador: Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Agronomia (Entomologia Agrícola).

S237d

Santos, Ana Letícia Zéro dos

Diferentes plantas hospedeiras alteram a suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) ao SfMNPV e modulam os seus parâmetros de desenvolvimento e fisiológicos / Ana Letícia Zéro dos Santos. -- Jaboticabal, 2024
68 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Guilherme Duarte Rossi

1. Inseto. 2. Baculovírus. 3. Alimentação. 4. Sistema imune.
5. Sistema digestivo. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Registro de impacto

O presente estudo apresenta soluções sustentáveis para o manejo de pragas, que por sua vez, atende aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU) na agenda 2030, com destaque para os objetivos: Fome zero; Consumo e produção sustentável; Vida na água; Vida terrestre.

Impact record

This study presents sustainable solutions for pest management, which in turn meets the Sustainable Development Goals (SDGs) of the United Nations (UN) in the 2030 agenda, with emphasis on the goals: Zero hunger; Responsible consumption and production; Life below water; Life on land.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DIFERENTES PLANTAS HOSPEDEIRAS ALTERAM A SUSCETIBILIDADE DE *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) AO SfMNPV E MODULAM OS SEUS PARÂMETROS DE DESENVOLVIMENTO E FISIOLÓGICOS

AUTORA: ANA LETÍCIA ZÉRO DOS SANTOS

ORIENTADOR: GUILHERME DUARTE ROSSI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Agronomia (Entomologia Agrícola), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. GUILHERME DUARTE ROSSI (Participação Virtual)
Departamento de Fitossanidade / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente

GUILHERME DUARTE ROSSI
Data: 02/05/2024 18:51:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. ALBERTO SOARES CORRÊA (Participação Virtual)
Departamento de Entomologia e Acarologia / ESALQ USP Piracicaba/SP

Documento assinado digitalmente

ALBERTO SOARES CORRÊA
Data: 03/05/2024 11:52:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente

ODAIR APARECIDO FERNANDES
Data: 03/05/2024 16:53:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. BRUNO HENRIQUE SARDINHA DE SOUZA (Participação Virtual)
Departamento de Entomologia / Universidade Federal de Lavras (UFLA) - Lavras

Documento assinado digitalmente

BRUNO HENRIQUE SARDINHA DE SOUZA
Data: 03/05/2024 14:16:02-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisador Dr. RAFAEL MAJOR PITTA (Participação Virtual)
Embrapa Agrosilvipastoril / Sinop/MT

Documento assinado digitalmente

RAFAEL MAJOR PITTA
Data: 02/05/2024 21:48:28-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 02 de maio de 2024

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Ana Letícia Zéro dos Santos - Natural de Pirassununga-SP, nascida no dia 19 de junho de 1991, filha de Acácio dos Santos Júnior e de Elisabete Aparecida Zero dos Santos. No ano de 2017, graduou-se em Engenharia Agrônômica na Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Durante a graduação, sob orientação do Prof. Dr. Marcus Vinícius Sampaio, desenvolveu atividade de pesquisa na área de Entomologia como bolsista de iniciação científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Em agosto de 2017, iniciou o curso de Mestrado em Agronomia (Entomologia Agrícola) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Câmpus de Jaboticabal-SP. Durante o Mestrado, sob orientação do Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi, foi bolsista do CNPq e atuou em pesquisas relacionadas à Bioquímica dos Insetos, com ênfase em aplicação biotecnológica de quitinase para o controle de *Diatraea saccharalis*. Em agosto de 2019, iniciou o curso de Doutorado em Agronomia (Entomologia Agrícola) na mesma instituição com bolsa do CNPq e desenvolveu pesquisas relacionadas ao sistema digestivo e imunológico de lepidópteros sob a orientação do Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi.

**“O que preenche, o que esvazia,
o que preenche e esvazia ao mesmo tempo.”**

Ana Suy

Dedico

Para Bete, minha amada mãe.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi pela orientação, pela oportunidade da realização desse trabalho, por todos os ensinamentos, pela confiança depositada em mim e pela amizade e palavras de incentivo quando eu precisava.

Ao Prof. Dr. Odair Fernandes e a todos do Laboratório de Ecologia Aplicada por cederem as lagartas para criação.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antonio Polanczyk e a todos do Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Pragas por disponibilizar, por um momento, o laboratório para a criação das lagartas.

À AgBiTech e em especial ao Marcelo Lima, por sempre estarem a disposição e por fornecerem o baculovírus.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola da Unesp/FCAV, pelos conhecimentos transmitidos.

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

Aos queridos amigos do Laboratório de Bioquímica de Insetos (Unesp/FCAV), em especial aos colegas Sandy Fonseca, Ciro Guidotti e Amanda Guimarães pela amizade, conselhos e ajuda para realização desse trabalho. Compartilhar os momentos de alegria e dificuldade com vocês fez deste período muito mais significativo e memorável.

Aos colegas que fiz no período de pós-graduação e em especial as amigas Jaqueline Della Vechia, Bianca de Marqui, Thais do Prado, Natalia Vieira, Carolina Veluci, Sandy Fonseca, Amanda Guimarães e Juliana Queiroz. Obrigada pelas conversas, confidências, apoio e risadas, o período de pós-graduação foi muito mais leve com vocês.

Ao Renato J. Horikoshi pela amizade e apoio durante esse período.

À minha família, por serem o meu amparo.

A todos que estiveram envolvidos nessa jornada, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO -	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Aspectos bioecológicos de <i>Spodoptera frugiperda</i>	5
2.2. Baculovírus	7
2.3. Sistema imunológico dos insetos	9
2.4. Sistema digestivo da fase larval de lepidópteros	12
2.5. Impacto da alimentação sobre os sistemas imunológico e digestivo dos insetos.....	14
2.6. Uso de sub doses para avaliação de inseticidas.....	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Insetos	18
3.2. Vírus entomopatogênico	18
3.3. Plantas	19
3.4. Estimativa da CL ₅₀ de SfMNPV sobre lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> alimentadas com as diferentes culturas	19
3.5. Parâmetros biológicos de <i>Spodoptera frugiperda</i> expostas a CL ₅₀ de SfMNPV na fase larval	20
3.6. Exposição das lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> a CL ₅₀ de SfMNPV para coleta da hemolinfa e extração do intestino das lagartas.....	21
3.7. Coleta de hemolinfa de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> expostas à CL ₅₀ de SfMNPV	22
3.8. Atividades de fenoloxidase e lisozima e quantificação das proteínas totais na hemolinfa de lagartas de <i>S. frugiperda</i> expostas a CL ₅₀ de SfMNPV	22
3.9. Análise celular	23
3.10. Extração dos intestinos de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> expostas a CL ₅₀ de SfMNPV	25
3.11. Atividades de tripsina e fosfatase alcalina e quantificação das proteínas totais do intestino de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> expostas à CL ₅₀ de SfMNPV	26
3.12. Análises estatísticas.....	27
4. RESULTADOS	28
4.1. Estimativa da CL ₅₀ de SfMNPV a lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> ...	28

4.2. Parâmetros biológicos após exposição à CL ₅₀ de SfMNPV na fase larval de <i>Spodoptera frugiperda</i>	28
4.3. Quantificação das proteínas totais e atividades de fenoloxidase e lisozima na hemolinfa de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> expostas à CL ₅₀ de SfMNPV	30
4.4. Análise celular	33
4.5. Quantificação das proteínas totais e atividades de tripsina e fosfatase alcalina no intestino médio de lagartas de <i>Spodoptera frugiperda</i> expostas à CL ₅₀ de SfMNPV	35
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	41

Diferentes plantas hospedeiras alteram a suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) ao SfMNPV e modulam os seus parâmetros de desenvolvimento e fisiológicos

RESUMO - A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma importante praga agrícola, polífaga e de ampla distribuição mundial. Em função de características biológicas de *S. frugiperda* e de particularidades do sistema de cultivo de algodão, milho e soja no Brasil, infestações de *S. frugiperda* podem causar prejuízos nas três culturas. No manejo de *S. frugiperda*, um dos métodos de controle é o uso de *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV; Baculoviridae: Alphabaculovirus), um bioinseticida à base de baculovírus. Considerando que o consumo de diferentes plantas pode impactar a suscetibilidade de herbívoros a entomopatógenos bem como o desenvolvimento e a fisiologia dos herbívoros, o presente trabalho foi realizado para investigar a influência das plantas de algodão, milho e soja sobre a suscetibilidade de *S. frugiperda* ao SfMNPV. Também foram investigados parâmetros de desenvolvimento e dos sistemas digestivo e imunológico de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com as diferentes plantas e expostas às CL₅₀'s de SfMNPV obtidas nas diferentes condições de alimentação. Em termos de suscetibilidade ao SfMNPV, observou-se que a CL₅₀ de SfMNPV foi superior para lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com milho ($6,36 \times 10^7$) em relação às CL₅₀'s observadas para lagartas alimentadas com algodão ($2,96 \times 10^7$) e soja ($2,62 \times 10^7$). O consumo de plantas de milho implicou em maior peso de lagartas em 7 dias após início da alimentação, menor período larval, maior atividade de fenoloxidase na hemolinfa e maior atividade de fosfatase alcalina no intestino médio em relação aos mesmos parâmetros observados em lagartas alimentadas com algodão ou soja. Após exposição ao SfMNPV, aumentos na atividade de lisozima e na quantidade de hemócitos totais pode ser observado apenas em lagartas alimentadas com folhas de milho. Os efeitos das modulações fisiológicas observadas tanto pelo consumo de diferentes alimentos como pela exposição ao SfMNPV são discutidos para auxiliar o entendimento da maior CL₅₀ observada para lagartas alimentadas com folhas de milho.

Palavras-chave: nucleopoliedrovírus, atividade enzimática, resposta imune, enzimas digestivas.

Different host plants change the susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to SfMNPV and modulate its developmental and physiological parameters

ABSTRACT - The fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), is an important agricultural pest, polyphagous and widely distributed worldwide. Due to the biological characteristics of *S. frugiperda* and the particularities of the cotton, maize and soybean cropping system in Brazil, infestations of *S. frugiperda* can cause damage to all three crops. In the management of *S. frugiperda*, the use of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus (SfMNPV; Baculoviridae: Alphabaculovirus), a baculovirus-based bioinsecticide, is highlighted as one of the control tactics. Considering that the consumption of different plants can alter the susceptibility of herbivores to entomopathogens as well as the development and physiology of herbivores, the present study was carried out to investigate the influence of cotton, maize and soybean plants on the susceptibility of *S. frugiperda* to SfMNPV. Moreover, developmental parameters and digestive and immune parameters of larval *S. frugiperda* fed with different plants and exposed to SfMNPV LC₅₀ obtained under different feeding conditions were also investigated. The LC₅₀ of SfMNPV was superior for *S. frugiperda* larvae fed with maize leaves (6.36×10^7) compared to the LC₅₀'s observed for larvae fed with cotton leaves (2.96×10^7) or soybean leaves (2.62×10^7). The consumption of maize leaves resulted in higher larval weight at 7 days after the beginning of feeding, shorter larval period, higher phenol oxidase activity in the hemolymph and higher alkaline phosphatase activity in the midgut when compared with the values of the same parameters observed in caterpillars fed with cotton or soybean leaves. After exposure to SfMNPV, increases in lysozyme activity and in the amount of total hemocytes was observed only in larvae fed with maize leaves. The effects of the physiological modulations observed by the consumption of different foods and by exposure to SfMNPV are discussed to help the understanding of the higher LC₅₀ observed for caterpillars fed on maize leaves.

Keywords: nucleopolyhedrovirus, enzymatic activity, immune response, digestive enzymes.

1. INTRODUÇÃO

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é um inseto polífono (Pogue et al., 2002) e uma praga agrícola de ampla distribuição mundial (Valicente e Tuelher, 2009; Stokstad, 2017; Nagoshi et al., 2018; Jing et al., 2020). Embora *S. frugiperda* tenha preferência por plantas da família Poaceae, este inseto já foi registrado em mais de 350 plantas hospedeiras, muitas delas de importância econômica (Pogue et al., 2002; Barros et al., 2010; Casmuz et al., 2010; Bernardi et al., 2014; Yang et al., 2015; Montezano et al., 2018; Volp et al., 2022).

Uma característica de *S. frugiperda* relacionada a alimentação é a sua diferenciação em duas raças geneticamente distintas, que são a raça milho (Raça C) e a raça arroz (Raça R) (Pashley, 1986). Morfologicamente, essas raças são idênticas e se diferenciam em função da preferência da planta hospedeira. A Raça C alimenta-se preferencialmente de milho (*Zea mays*), algodão (*Gossypium sp*) e sorgo (*Sorghum bicolor*), e a Raça R é geralmente encontrada em arroz (*Oryza sativa*) e grama-bermuda (*Cynodon dactylon*) (Pashley, 1986; Silva-Brandão et al., 2008). A polifagia das lagartas de *S. frugiperda* está associada a mecanismos bioquímicos, fisiológicos e/ou evolutivos que possibilitam resistir a uma variedade de compostos químicos presentes nas plantas (Roy et al., 2016; Israni et al., 2020; Xiao et al., 2020; He et al., 2023).

No Brasil, particularidades do sistema de cultivo como o clima tropical, a irrigação e a sobreposição do cultivo de plantas hospedeiras favorecem o aumento populacional de *S. frugiperda* nos cultivos de algodão, milho e soja (Martinelli et al., 2006; Martinelli et al., 2007; Barros et al., 2010; Freitas-Bueno et al., 2011; Fatoletto et al., 2017). Estas particularidades aliadas a outras características biológicas da praga como alta capacidade reprodutiva com múltiplas gerações por ano (Fitt et al., 2006; Barros et al., 2010; Farias et al., 2014; Nagoshi et al., 2015), alta capacidade de detoxificação de moléculas inseticidas (Yu et al., 2003; Nascimento et al., 2015; Boaventura et al., 2021; Amezian et al., 2023) e alta capacidade para evolução de resistência a táticas de controle (Omoto et al., 2016; Chao et al., 2019; Gui et al., 2022) tornam *S.*

frugiperda um inseto de difícil manejo (Okuma et al., 2018; Bolzan et al., 2019; Boaventura et al., 2020). Além disso, dados de análise genômica mostram que as populações *S. frugiperda* diferem geograficamente e que, para o manejo dessa praga, é necessária uma abordagem específica da região onde a mesma se encontra (Tay et al., 2023).

Para o manejo de *S. frugiperda*, diversas táticas de controle são utilizadas (Paredes-Sánchez et al., 2021). Entre elas, ressalta-se o controle biológico com o uso de *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV; Baculoviridae: Alphabaculovirus) (Bentivenha et al., 2018; Guo et al., 2020; Abbas et al., 2022), um bioinseticida a base de baculovírus. SfMNPV é reconhecido como uma importante ferramenta para o manejo de *S. frugiperda* devido sua eficácia, seletividade a organismos não alvo e por não ser tóxico aos humanos e ao meio ambiente (Cunningham, 1995; Moscardi, 1999; Beas-Catena et al., 2014; Thézé et al., 2015).

O SfMNPV é um bioinseticida com alta especificidade e potencial para o manejo de *S. frugiperda* (Bentivenha et al., 2018) e tem sido recomendado para o manejo de populações de *S. frugiperda* resistentes a inseticidas e proteínas Bt devido à ausência de resistência cruzada (Bentivenha et al., 2018; Muraro et al., 2019). Entretanto, estudos de monitoramento e suscetibilidade são necessários para manter a eficiência do bioinseticida (Muraro et al., 2018; Bentivenha et al., 2018), visto que casos de resistência de *Cydia pomonella* (L., 1758) (Lepidoptera: Tortricidae) a *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) foram relatados em campo (Fritsch et al., 2005; Sauphanor et al., 2006).

Durante o estágio de infecção de um vírus entomopatogênico, mudanças comportamentais como a hiperatividade e o hábito de subir para posições elevadas da planta são observadas nas lagartas antes das mesmas morrerem (Gasque et al., 2019). Por outro lado, insetos sobreviventes após exposição a baculovírus podem causar alterações no desenvolvimento dos lepidópteros, dentre eles, prolongamento da fase larval e pupal, redução do peso das larvas e pupas, alteração da razão sexual e redução da fertilidade das populações sobreviventes (Perelle e Harper, 1984; Patil, 1989; Sait et al., 1994; Monobrullah e Shankar, 2008; Cabodevilla et al., 2022; Führ et al., 2021).

A principal porta de entrada do baculovírus nos insetos é o intestino médio (Granados, 1980). A infecção primária é iniciada pelos “occlusion-derived virus”

(ODV) que entram nas células epiteliais do intestino médio por meio da fusão direta da membrana, enquanto o “budded virus” (BV) são transmitidos célula a célula e causam infecção sistêmica (Summers, 1971; Volkman et al., 1977; Keddie et al., 1989). As infecções causadas por vírus geralmente desencadeiam uma resposta imunológica nos insetos hospedeiros, como diminuição da capacidade de melanização (Yuan et al., 2017), redução do número total de hemócitos (Scholefield et al., 2019), desligamento global da síntese proteica e a indução da apoptose (Ikeda et al., 2013). Já no sistema digestivo, a função digestiva e metabólica do epitélio intestinal pode ser consideravelmente afetada pela infecção viral, devido a uma regulação negativa da maioria dos genes relacionados a digestão, dentre eles, genes que desempenham papéis importantes na fisiologia digestiva, como os da aminopeptidases, serino proteases semelhantes à tripsina, lipases e esterases (Noland et al., 2013).

Na relação entre insetos herbívoros e vírus, um terceiro fator - o consumo de diferentes plantas hospedeiras - pode influenciar o desenvolvimento dos insetos herbívoros e entomopatógenos associados (Smilanich et al., 2018; Muchoney et al., 2022; Muchoney et al., 2023). Diferenças na suscetibilidade de insetos herbívoros a entomopatógenos podem ser relacionadas à composição das plantas hospedeiras (Wang et al., 2021a; Cory e Hoover, 2009; Aljbory e Chen, 2018). Por exemplo, foi observada uma suscetibilidade maior de lagartas de *Trichoplusia ni* (Hübner, 1803) (Lepidoptera: Noctuidae) ao vírus da poliedrose nuclear (VPN) em lagartas alimentadas com pepino (*Cucumis sativus*) em relação às que consumiram brócolis (*Brassica oleracea*) (Shikano et al., 2010). De maneira similar, a suscetibilidade de *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) ao VPN foi maior em lagartas que se alimentaram de soja (*Glycine max*) em relação àquelas que se alimentaram de batata d'água (*Ipomoea aquatica*) (Wang et al., 2019).

A fonte de alimento pode modular a resposta imunológica dos insetos herbívoros (Bukovinszky et al., 2009; Vogelweith et al., 2011; Lampert, 2012; Vogelweith et al., 2015; Wang et al., 2019), o qual é composto principalmente pela imunidade humoral e celular (Strand, 2008). Alterações na resposta imunológica celular devido à variação da planta hospedeira consumida podem ser observadas na alteração do número hemócitos totais (Vogelweith et al., 2011, Shikano et al., 2010), na capacidade de encapsulação (Carper et al., 2019) e na

composição, morfologia e apoptose dos hemócitos dos insetos herbívoros (Wang et al., 2021b). Complementarmente, diferentes plantas hospedeiras podem influenciar as defesas imunológicas humorais e alterar as defesas antimicrobianas por afetar a cadeia da fenoloxidase (PO) (Vogelweith et al., 2011; Wang et al., 2019), uma enzima chave na melanização e na formação de compostos fenólicos tóxicos aos patógenos invasores (Lemaitre e Hoffmann, 2007; Knost e Gorman, 2008; Lu et al., 2014). Em função do alimento consumido pelo herbívoro, esses podem apresentar menor atividade de fenoloxidase na hemolinfa e, conseqüentemente, serem mais permissivos a infecção por vírus (Wang et al., 2019).

Outras alterações fisiológicas que ocorrem em função do consumo de diferentes plantas é a modulação do sistema digestivo em função da presença de, por exemplo, inibidores de proteases nos diferentes tecidos vegetais (Pandey et al., 2021). Os inibidores de proteases são compostos presentes em algumas plantas que interagem com as proteases do intestino dos insetos e formam um complexo enzima-inibidor. Este complexo é prejudicial à atividade enzimática e, como consequência, a digestão de proteínas é comprometida, levando à indigestão, redução da ingestão de alimentos, malformação, anormalidades na reprodução e a morte dos insetos que consumirem os inibidores de proteases (Zhu-Salzman e Zeng 2015; Singh et al., 2020). Uma classe de proteases frequentemente inibida por esses compostos são as tripsinas, classe de enzimas em maior abundância no intestino médio de lepidópteros (Terra e Ferreira, 1994). As tripsinas do intestino médio catalisam o processo de digestão de proteínas e podem também estar envolvidas em outras funções, como na ativação de protoxinas ou desintoxicação de proteínas inseticidas Cry em lagartas de lepidópteros (Pérez-Hedo et al., 2012; Singh et al., 2020), ter efeitos antivirais (Nakazawa et al., 2004) e ativar a infectividade viral pela clivagem de proteínas do envelope (Darpel et al., 2011). Dada a sua importância para o sistema digestivo de lepidópteros, o uso de inibidores de tripsina é abordado como uma opção para o controle e manejo de lepidópteros pragas (Meriño-Cabrera et al., 2020; Hemmati et al., 2021; Fonseca et al., 2023).

Além do consumo de inibidores de proteases, outras perturbações sobre o desenvolvimento podem ser causadas pelo consumo de diferentes plantas no intestino dos insetos. Como exemplo, o consumo de diferentes plantas

hospedeiras pode resultar em alterações do perfil metabólico do intestino médio (Oliveira et al., 2022), modificação da expressão de genes relacionados à digestão (Hafeez et al., 2021a), disbiose da microbiota intestinal (Oliveira e Consoli, 2023) e a modificação da atividade de proteases digestivas (Hafeez et al., 2021a).

Apesar da importância econômica de *S. frugiperda*, pouco se sabe a respeito dos efeitos que o consumo de diferentes plantas hospedeiras pode causar sobre a suscetibilidade de *S. frugiperda* a SfMNPV, bem como sobre os efeitos do consumo de diferentes plantas sobre o desenvolvimento, o sistema imunológico e o sistema digestivo de lagartas expostas a SfMNPV. Dessa forma, o presente trabalho de pesquisa foi conduzido para investigar a influência da alimentação de lagartas de *S. frugiperda* com folhas de algodão, milho e soja sobre a suscetibilidade de lagartas de *S. frugiperda* a SfMNPV e observação de parâmetros do desenvolvimento, sistema imunológico e sistema digestivo de lagartas de *S. frugiperda* expostas a CL₅₀ de SfMNPV.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos bioecológicos de *Spodoptera frugiperda*

A lagarta-do-cartucho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), é uma espécie com alta capacidade de dispersão e geneticamente diversa (Nagoshi e Meaghernativa, 2008). Nativa do Hemisfério Ocidental, sobretudo das regiões tropical e subtropical das Américas (Sparks, 1979; Ashley et al., 1989), esta lagarta é encontrada causando danos em cultivos como os de milho, arroz, sorgo, soja, trigo e algodão (Pogue et al., 2002; Juárez et al., 2012; Montezano et al., 2018). Atualmente, *S. frugiperda* encontra-se dispersa em outros continentes, sendo o seu primeiro relato fora do continente americano feito em 2016 nos países Nigéria e Gana na África Ocidental (Goergen et al., 2016). Em 2018, foi encontrada na Ásia (Guo et al., 2018) e posteriormente foi relatada na Europa (Gilioli et al., 2023) e Oceania (Qi et al., 2021) e, desde então, existe uma necessidade global de compreender quais são os seus impactos econômicos e como manejar essa espécie (Overton et al.,

2021). O sucesso da rápida dispersão de *S. frugiperda* se deve a fatores como capacidade do adulto migrar a longas distâncias com as correntes de ar (Sparks, 1979; Nagoshi et al., 2019), a alta fecundidade (cada fêmea pode ovipositar mais de 1000 ovos) (Johnson, 1987; Montezano et al., 2019) e as rotas de transporte e comércio entre as áreas infestadas que podem transportar involuntariamente a lagarta-do-cartucho para outras regiões (Early et al., 2018).

Spodoptera frugiperda possui características altamente plásticas e a polifagia é um fator que ajudou na exploração e adaptação em novos ambientes (Hafeez et al., 2021b; Tay e al., 2023). Segundo um levantamento feito por Montezano et al. (2016), as lagartas de *S. frugiperda* tem o potencial de consumir 353 espécies diferentes de plantas pertencentes a 76 famílias botânicas de plantas cultivadas, plantas ornamentais e plantas daninhas. Uma característica de *S. frugiperda* relacionada a alimentação é a sua diferenciação em duas raças geneticamente distintas, que são a raça milho (Raça C) e a raça arroz (Raça R) (Pashley, 1986). Morfologicamente, essas raças são idênticas e se diferenciam em função da preferência da planta hospedeira, comportamento e fisiologia. A Raça C alimenta-se preferencialmente de milho (*Zea mays*), algodão (*Gossypium* sp.) e sorgo (*Sorghum bicolor*), e a Raça R é geralmente encontrada em arroz (*Oryza sativa*) e grama-bermuda (*Cynodon dactylon*) (Pashley, 1986; Silva-Brandão et al., 2008). A polifagia das lagartas de *S. frugiperda* está associada a possíveis mecanismos plásticos bioquímicos, fisiológicos e/ou evolutivos que possibilitam resistir a uma variedade de compostos químicos presentes nas plantas (Roy et al., 2016; Israni e al., 2020; Xiao et al., 2020; He et al., 2023).

No Brasil, *S. frugiperda* é uma das principais pragas do milho e pode causar prejuízos às culturas do algodão e soja, alimentando-se tanto das estruturas vegetativas quanto das estruturas reprodutivas das plantas (Martinelli et al., 2006; Martinelli et al., 2007; Barros et al., 2010; Freitas-Bueno et al., 2011; Faretto et al., 2017; Montezano et al., 2019). O cultivo sucessivo dessas plantas hospedeiras formam as “pontes verdes”, que aliado ao clima favorável, permitem a sobrevivência de *S. frugiperda* nas áreas de produção e o desenvolvimento de múltiplas gerações por ano (Martinelli et al., 2006; Martinelli et al., 2007; Barros et al., 2010; Freitas-Bueno et al., 2011; Faretto et al., 2017). Estas particularidades aliadas a outras características biológicas da praga como

a alta capacidade de detoxificação de moléculas inseticidas (Yu et al., 2003; Nascimento et al., 2015; Boaventura et al., 2021; Amezian et al., 2023) e alta capacidade para evolução de resistência a táticas de controle (Omoto et al., 2016; Chao et al., 2019; Gui et al., 2022) tornam *S. frugiperda* um inseto de difícil manejo (Okuma et al., 2018; Bolzan et al., 2019; Boaventura et al., 2020). Dessa forma, a melhor maneira de manejar *S. frugiperda* é com base em recomendações específicas da região em que a praga se encontra (Tay et al., 2023).

O controle de *S. frugiperda* é realizado principalmente pelo uso de inseticidas químicos e plantas geneticamente modificadas que expressam proteínas Bt (*Bacillus thuringiensis* Berliner). Contudo, o uso inadequado dessas tecnologias e a alta pressão de seleção favorecem o desenvolvimento da resistência de *S. frugiperda* a essas táticas de controle, resultando em baixa eficácia e falhas de controle dos inseticidas químicos e/ou plantas Bt no campo (Carvalho et al., 2013; Farias et al., 2014; Omoto et al., 2016; Horikoshi et al., 2016). Os bionseticidas, com destaque para os baculovírus, têm sido considerados uma boa opção para o controle *S. frugiperda*, principalmente para populações resistentes a inseticidas e proteínas Bt devido à ausência de resistência cruzada (Bentivenha et al., 2018; Horikoshi et al., 2019; Muraro et al., 2019).

2.2. Baculovírus

Os baculovírus (família Baculoviridae) são o maior grupo de vírus entomopatogênicos e já foram descritos infectando diversos insetos das Ordens Diptera, Hymenoptera e, principalmente, Lepidoptera (Martignoni e Iwai, 1981; Federici, 1997; Petersen et al., 2022). O seu genoma é composto por um DNA circular de fita dupla, envolto por um capsídeo proteico em forma de bastonete, o qual constitui o nucleocapsídeo (Lucas e Knipe, 2001; Williams et al., 2017). Durante o ciclo de vida, os baculovírus se replicam nas células dos insetos pela produção de dois fenótipos virais: (I) BV (*Budded Virus*) – partículas virais compostas por um único nucleocapsídeo e envelopadas por uma membrana derivada da membrana plasmática do hospedeiro e (II) ODV (*Occlusion-Derived*

Virus) – partículas virais compostas por um ou mais nucleocapsídeo e envelopadas por uma membrana derivada da membrana nuclear interna da célula hospedeira. Estas partículas estão ocluídas em uma matriz proteica cristalina de poliedrina, formando os corpos de oclusão (*Occlusion Body* - OB) (Bilimoria, 1991; O'Reilly, 1997). Os ODVs entram nas células epiteliais do intestino médio do inseto através da fusão direta da membrana das células do epitélio para iniciar a infecção primária, enquanto os BVs são transmitidos de célula para célula e causam infecção sistêmica (Summers, 1971; Volkman et al., 1977; Keddie et al., 1989).

A família Baculoviridae era dividida em dois gêneros: Granulovirus (GVs) e Nucleopoliedrovirus (NPVs), que se diferenciam principalmente pela morfologia dos corpos de oclusão (OB) e os NPVs são classificados em relação a quantidade de nucleocapsídeos contidos nos ODV, que são: SNPV- *Single Nucleopoliedrovirus* ou MNPV- *Multiple Nucleopoliedrovirus*. Atualmente, uma nova classificação para a família Baculoviridae é utilizada, a qual é classificada em quatro gêneros de acordo com os hospedeiros: Alfabaculovírus (NPV específico para lepidópteros), Betabaculovírus (granulovírus específicos de lepidópteros), Gammabaculovírus (NPV específico para himenópteros) e Deltabaculovírus (NPV específico para dípteros) (Jehle et al., 2006).

O intestino médio é a principal porta de entrada do baculovírus nos insetos e a infecção primária se inicia quando as larvas ingerem os vírus na forma de corpos de oclusão (OBs) (Granados, 1980). Os OBs são dissolvidos pelo fluido alcalino do intestino médio dos insetos e liberam os ODVs, que, para entrarem nas células epiteliais do intestino médio, dependem de uma série de proteínas codificadas pelo vírus, denominadas fatores de infectividade *per os* (PIFs) (Peng et al., 2012). Os PIFs estão presentes no envelope do ODV e, até o momento, nove proteínas PIF diferentes foram identificadas (Song et al., 2016; Boogaard et al., 2017). A maioria dos PIFs tem especificidades restritas ao hospedeiro e somente os insetos com receptores específicos para certos PIFs nas células epiteliais colunares do intestino médio permitem a entrada dos vírus nessas células (Song et al., 2016). Após a entrada dos ODVs nas células colunares do intestino médio pela fusão da membrana e reconhecimento específico, o vírus é então transportado através do citoesqueleto para o núcleo da célula, onde ocorre a replicação (Charlton e Volkman, 1993; Granados e

Lawler, 1981). Para propagar a doença e causar a infecção sistêmica, após a replicação nas células do intestino, o fenótipo BV do vírus é formado por brotamento e deixam as células do intestino médio, atravessando a membrana basal do inseto para infectar os hemócitos e as traqueias. Após isso, outros tecidos como o corpo gorduroso, células musculares, túbulos de Malpighi e as células do tegumento serão infectados (Keddie e Volkman, 1989; Washburn et al., 2000). No final da infecção, os OBVs são formados no núcleo das células infectadas. Depois de alguns dias, as larvas infectadas morrem e liberam por lise celular os OBVs no meio ambiente (Moto et al., 2003).

Durante o estágio de infecção, os baculovírus são conhecidos por causarem mudanças comportamentais no seu hospedeiro, como a hiperatividade e o hábito de subir para posições elevadas da planta antes da morte dos hospedeiros (Gasque et al., 2019). Essas características podem aumentar a distribuição dos OBVs no ambiente e, conseqüentemente, a chance de transmissão para outras lagartas (Vasconcelos et al., 1996). Além disso, as infecções causadas por vírus geralmente desencadeiam uma resposta imunológica nos insetos hospedeiros, como diminuição da capacidade de melanização (Yuan et al., 2017), redução do número total de hemócitos (Scholefield et al., 2019), desligamento global da síntese proteica e a indução da apoptose (Ikeda et al., 2013). Já no sistema digestivo, a função digestiva e metabólica do epitélio intestinal pode ser consideravelmente afetada pela infecção viral, devido a uma regulação negativa da maioria dos genes relacionados a digestão, dentre eles, genes que desempenham papéis importantes na fisiologia digestiva, como os da aminopeptidases, serino proteases semelhantes à tripsina, lipases e esterases (Noland et al., 2013).

2.3. Sistema imunológico dos insetos

Os insetos possuem o sistema imunológico do tipo inato, o qual é composto por receptores que reconhecem e se ligam a características moleculares conservadas dos invasores (Hoffmann, 1995; Lemaitre e Hoffmann, 2007) e respondem por meio de componentes humorais e celulares (Hoffmann, 1995; Kojour et al., 2020). Esses receptores são uma classe de proteínas

expressas pelas células do sistema imunológico e são chamados de receptores de reconhecimento de padrão (*pattern recognition receptors*- PRRs). Os PRRs reconhecem patógenos invasivos e conseguem distingui-los por meio de uma estrutura conservada nos patógenos, que são comumente chamadas de PAMPs (*pathogen-related molecular patterns*) (Zang et al., 2021; Zhao et al., 2023).

As repostas humorais são aquelas envolvidas na ativação da fenoloxidase (PO) e na expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos (AMPs) (González-Santoyo et al., 2012; Wang et al., 2017; Eleftherianos et al., 2021; Zang et al., 2021). A PO é uma enzima do grupo das tirosinases, cuja principal função é oxidar fenóis (Mayer et al., 2006). As PO são expressas nos insetos como zimogênios inativos (profenoloxidase - PPO) e convertidas em PO ativa quando necessário. A síntese de PPO ocorre principalmente nos hemócitos (Cerenius e Söderhäll, 2004), sendo que, nos lepidópteros, os hemócitos do tipo oenocitoides são responsáveis pela síntese de PPO (Jiang et al., 1997). A ativação da PPO acontece por meio da hidrólise proteolítica em um local próximo a sua extremidade amino terminal pela ação das serino proteases presentes na hemolinfa dos insetos (Kanost e Gorman, 2008).

Após ativação hidrolítica, a PO ativada catalisa a oxidação de fenóis ou tirosina, removendo átomos de hidrogênio dos compostos para a formação de quinonas e água. Após esse processo, as quinonas são polimerizadas para a formação de melanina, um pigmento escuro depositado sobre ferimentos no corpo do hospedeiro ou na superfície de corpos invasores que foram encapsulados ou nodulados pelos hemócitos (Kanost e Gorman, 2008; González-Santoyo e Córdoba-Aguilar, 2012). A cápsula de melanina impede o crescimento e a reprodução do patógeno no corpo de inseto hospedeiro e eventualmente leva à morte do corpo invasor (Gillespie et al., 1997).

Em infecções causadas por baculovírus, a melanização pode desempenhar um papel importante na proteção dos insetos, como demonstrado em um estudo *in vitro* em que a atividade da fenoloxidase na hemolinfa é a principal responsável pela inativação do Hz SNPV e que a produção de H₂O₂ dependente da fenoloxidase é responsável para contribuir na inativação viral em lagartas de *Chloridea virescens* (Fabricius, 1777) (Lepidoptera: Noctuidae) (Shelby et al., 2006). Em um outro caso, a melanização inibiu a infecção por baculovírus em uma população de *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera:

Noctuidae), um hospedeiro semipermissivo (Trudeau et al., 2021). Entretanto, em casos em que a infecção viral acontece, o baculovírus pode suprimir o sistema imunológico do hospedeiro inibindo as vias de melanização e induzindo a produção de serpinas que regulam negativamente a melanização ao inibir as proteases alvo ativadoras da PPO (Yuan et al., 201; Jiang, 2021).

Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são um grupo de proteínas sintetizadas pelos hemócitos e, em maior extensão, no tecido adiposo de onde são liberados na hemolinfa do inseto rapidamente após infecção microbiana (Bulet et al., 1999; Hoffmann et al., 1999). Os AMPs agem inserindo-se e rompendo as membranas microbianas de maneira a inativar os patógenos (Bulet e Stocklin, 2015). A sua ação é principalmente contra bactéria e fungos (Sheehan et al., 2020; Yi et al., 2014). Porém, a literatura tem indicado que os AMPs podem apresentar função antiviral e, ao mesmo passo, que os vírus também podem neutralizar a ação dos AMPs (Feng et al., 2020).

A lisozima é um AMP que tem a capacidade de clivar as ligações glicosídicas β -1,4 entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina em peptidoglicanos, um componente da parede celular bacteriana (Jolles e Jolles, 1984). Além de sua atividade antimicrobiana por lise, a lisozima tem outras funções, como associar-se a ácidos nucleicos (Steinrauf et al., 1999), onde ocorre mudanças conformacionais da lisozima e do DNA, sugerindo que esta interação pode interferir na replicação do DNA, modular a expressão gênica e bloquear infecções bacterianas e virais (Chapelle et al., 2009). Em lagartas de *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae), foi identificado que uma lisozima contribuiu para a imunidade e sobrevivência larval, reduzindo a proliferação do nucleopoliedrovírus (Chen et al., 2018).

A resposta celular do sistema imunológico dos insetos é conferida pela atividade dos hemócitos, células circulantes na hemolinfa envolvidas na fagocitose, encapsulamento e nodulação de corpos estranhos (Strand, 2008). A fagocitose é o processo pelo qual as partículas estranhas, como microrganismos e células apoptóticas são reconhecidas, ligadas à superfície das células e internalizadas em um 'fagossomo', que é a organela que se forma ao redor do material fagocitado (Stuart e Ezekowitz, 2008). Na nodulação, os hemócitos se agregam na superfície do corpo estranho e esses nódulos podem aderir aos tecidos ou serem encapsulados. O encapsulamento é um mecanismo em que

uma cápsula de camadas sobrepostas de hemócitos é formada em torno de protozoários, nematoides e ovos ou larvas de insetos parasitas e está associado à melanização, que contribui para a morte do invasor (Vilmos e Kurucz, 1998).

Os hemócitos são identificados por meio das suas características morfológicas, histoquímicas e funcionais (Gupta, 1985), sendo os tipos mais comuns relatados na literatura os pró-hemócitos, células granulares, células esféricas, plasmatócitos e oenocitoides. Os tipos de hemócitos diferem entre as espécies e, em Lepidoptera, os principais tipos de hemócitos encontrados são as células granulares (função de fagocitose), células esféricas (função não definida, associadas à produção de componentes cuticulares), plasmatócitos (função de encapsulamento) e oenocitoides (síntese de fenoloxidase) (Ribeiro e Brehélin, 2006). No estágio larval de Lepidoptera, as células granulares e os plasmatócitos constituem mais de 50% da população de hemócitos circulantes na hemolinfa e são responsáveis pela adesão em superfícies de corpos estranhos (Lavine e Strand, 2002).

Em infecções bem sucedidas de baculovírus, o número de hemócitos diminui fortemente com o aumento da dose, sugerindo que o baculovírus reduz a capacidade de resposta imune do hospedeiro, o que pode aumentar a susceptibilidade do hospedeiro a desafios subsequentes com agentes patogênicos ou parasitas (Scholefield, 2019). Entretanto, a capacidade de resposta do hospedeiro a essas infecções pode ser modulada, aumentando o número de hemócitos circulantes, o que torna o hospedeiro menos permissivo a infecção (Shikano et al., 2010).

2.4. Sistema digestivo da fase larval de lepidópteros

De maneira geral, o intestino das lagartas de lepidópteros é dividido em três regiões: I- intestino anterior (formado por faringe, esôfago, papo, proventrículo e válvula cardíaca, cuja função é misturar os alimentos ingeridos com fluidos secretados pelas glândulas salivares e transportá-los até o intestino médio), II- intestino médio (principal local de digestão e absorção de nutrientes) e III- intestino posterior (composto pelo íleo, cólon e reto, responsáveis pela

reabsorção de água e sais minerais do bolo alimentar que se será defecado) (Terra e Ferreira, 2009; Wu et al., 2016).

Na maioria dos insetos, na superfície interna do intestino médio existe uma estrutura acelular chamada membrana peritrófica (Bolognesi et al., 2008). Nas lagartas de lepidópteros, a membrana peritrófica é secretada pelas células epiteliais do intestino médio e são compostas de quitina e glicoproteínas reticuladas para formar a membrana em forma de rede (Bolognesi et al., 2001; Toprak et al., 2010). A membrana peritrófica funciona como uma barreira semipermeável para transportar nutrientes, água e minerais e proteger as células do intestino médio tanto da abrasão mecânica por alimentos quanto da infecção por microrganismos ingeridos com os alimentos (Bolognesi et al., 2001; Toprak et al., 2010). A membrana peritrófica dos lepidópteros também serve como uma barreira natural a vírus entomopatogênicos. Entretanto, os vírus podem romper esta barreira alterando a permeabilidade da membrana peritrófica ou danificando a sua estrutura (Toprak et al., 2012; Guo et al., 2007; Rao et al., 2004). A membrana peritrófica (MP) separa o intestino médio em dois compartimentos luminais: espaço endoperitrófico (dentro da MP) e ectoperitrófico (entre a MP e o epitélio do intestino médio). Nos lepidópteros imaturos, as enzimas que participam da digestão inicial apresentam peso molecular reduzido e atravessam a MP para o espaço endoperitrófico enquanto as enzimas que participam da digestão intermediária são retidas no espaço ectoperitrófico geralmente por apresentarem alto peso molecular e tamanho superior ao dos poros da MP. Além disso, a MP aumenta a eficiência digestiva devido aos fluxos contracorrentes no intestino médio causados pela secreção de líquido em uma região posterior e sua absorção em uma região anterior diminuindo perda de enzimas por excreção (Bolognesi et al., 2008; Terra et al., 2023).

Os insetos apresentam uma grande diversidade de hábitos alimentares e a composição da maioria das enzimas digestivas são específicas dentro das ordens. Ou seja, dentro de uma mesma ordem com hábitos alimentares semelhantes, os insetos apresentam um grupo semelhante de enzimas digestivas (Terra e Ferreira, 1994). Em lepidópteros imaturos, as tripsinas e quimotripsinas são as proteases mais abundantes no intestino médio (Terra e Ferreira, 1994). Estas são responsáveis por grande parte da digestão de proteínas, sendo que as tripsinas apresentam clivagem preferencial de proteínas

em posições que contenham aminoácidos básicos, como lisina (Lys) e arginina (Arg) e as quimotripsinas apresentam clivagem preferencial de proteínas em posições que contenham aminoácidos aromáticos, como fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) e triptofano (Trp) (Muhlía-Almazán et al., 2008; Lazarevic e Janković-Tomanić, 2015).

A composição dos alimentos também pode influenciar na regulação da atividade das enzimas que degradam proteínas. Para a tripsina, os alimentos ingeridos afetam a sua atividade através de alterações na regulação da síntese e secreção de tripsina e por alterações no pH intestinal e nas condições redox, favorecendo variantes enzimáticas que são mais eficientes na digestão dos alimentos e de genes reguladores que favorecem respostas plásticas adaptativas a diversos alimentos (Lazarevic e Janković-Tomanić, 2015).

Além da função de digestão proteica no sistema digestivo, as tripsinas digestivas podem apresentar outras funções, como atuar na detoxificação de moléculas tóxicas presentes nos alimentos, como os inibidores de proteases. O consumo de determinados inibidores de proteases pode aumentar a expressão de algumas serino proteases muitas vezes insensíveis à inibição (Oliveira-Neto et al., 2004; Srinivasan et al., 2006) ou as serino proteases podem atuar no sequestro desses inibidores de proteases (Mazumdar-Leighton et al., 2000).

2.5. Impacto da alimentação sobre os sistemas imunológico e digestivo dos insetos

Os insetos herbívoros, embora possam sintetizar alguns compostos, devem obter os nutrientes essenciais para seu desenvolvimento nas plantas hospedeiras (Chapman, 2013). O conteúdo, o tipo e a proporção dos nutrientes variam entre as plantas e os seus metabólitos secundários podem afetar a sobrevivência, o desenvolvimento e a reprodução dos insetos (Waldbauer, 1968; Scriber e Slansky, 1981; Singh e Mullick, 1997; Sarate et al., 2012).

Além da relação direta das plantas hospedeiras sobre o desenvolvimento dos insetos herbívoros, a composição das plantas hospedeiras podem ter efeito sobre a suscetibilidade dos insetos aos entomopatógenos (Cory e Hoover, 2009; Aljbory e Chen, 2018; Smilanich et al., 2018; Wang et al., 2021a; Muchoney et al., 2022; Muchoney et al., 2023). Por exemplo, foi observada uma

suscetibilidade maior de lagartas de *Trichoplusia ni* (Hübner, 1803) (Lepidoptera: Noctuidae) ao vírus da poliedrose nuclear (VPN) em lagartas alimentadas com pepino (*Cucumis sativus*) em relação às que consumiram brócolis (*Brassica oleracea*) (Shikano et al., 2010). De maneira similar, a suscetibilidade de *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) ao VPN foi maior em lagartas que se alimentaram de soja (*Glycine max*) em relação às que se alimentaram de batata d'água (*Ipomoea aquatica*) (Wang et al., 2019). Em *Chloridea virescens* (Fabricius, 1781) (Lepidoptera: Noctuidae), a suscetibilidade ao nucleopoliedrovírus *Helicoverpa zea* (Boddie) (HzSNPV) diminuiu quando as lagartas foram alimentadas com algodão (*Gossypium hirsutum* L.) em comparação com alface (*Lactuca sativa*) (Hoover et al., 1998). A menor suscetibilidade de *C. virescens* ao HzSNPV no algodão foi correlacionada com os níveis de peroxidase foliar, o qual pode ter proporcionado uma maior descamação das células do intestino médio infectadas nos insetos que se alimentaram de algodão, o que provocou o aumento da resistência ao baculovírus (Engelhard e Volkman, 1995; Hoover et al., 2000; Ali et al., 2002).

Em sistemas tritróficos entre plantas, insetos herbívoros e entomopatógenos, um fator que tem sido bastante estudado é o sistema imunológico. Nesse contexto, as alterações na suscetibilidade dos insetos aos entomopatógenos têm sido relacionadas com as alterações das funções imunológicas dos insetos causada pelo consumo de diferentes plantas hospedeiras (Karimzadeh e Wright, 2008). Algumas alterações na resposta imunológica celular dadas pela variação da planta hospedeira consumida podem ser observadas na alteração do número de hemócitos totais (Vogelweith et al., 2011; Shikano et al., 2010), na capacidade de encapsulação (Carper et al., 2019) e na composição, morfologia e apoptose dos hemócitos dos insetos herbívoros (Wang et al., 2021b). Complementarmente, diferentes plantas hospedeiras podem influenciar as defesas imunológicas humorais e alterar as defesas antimicrobianas por afetar a cadeia da fenoloxidase (PO) (Vogelweith et al., 2011; Wang et al., 2019), uma enzima chave na melanização e na formação de compostos fenólicos tóxicos aos patógenos invasores (Lemaitre e Hoffmann, 2007; Knost e Gorman, 2008; Lu et al., 2014). Em função do alimento consumido pelo herbívoro, esses podem apresentar menor atividade de fenoloxidase na

hemolinfa e, consequentemente, serem mais permissivos a infecção por vírus (Wang et al., 2019).

As proteínas e os carboidratos são as duas principais fontes nutricionais para os insetos e o funcionamento do sistema imunológico é dependente da qualidade dos alimentos ingeridos (Silvajio et al., 2021). Dessa forma, as diferenças nutricionais entre dietas podem impactar a resposta imunológica nos insetos (Constantin et al., 2022). As proteínas têm sido apontadas como o principal macronutriente regulador da imunidade nos estágios larvais dos insetos e, quando as larvas não têm acesso suficiente a proteínas, sua imunidade é geralmente afetada negativamente, bem como a sua resistência a patógenos (Ponton et al., 2023).

O acesso a proteínas não depende apenas da presença do nutriente no alimento, mas também da disponibilidade desse nutriente por meio da digestão. A fonte de alimento, como por exemplo o consumo de diferentes plantas, também pode modular o sistema digestivo dos insetos (Pandey et al., 2021). Compostos como os inibidores de proteases nos diferentes tecidos vegetais interagem com as proteases do intestino dos insetos e formam um complexo enzima-inibidor. Este complexo é prejudicial à atividade enzimática e, como consequência, a digestão de proteínas é comprometida, levando à indigestão, redução da ingestão de alimentos, malformação, anormalidades na reprodução e a morte dos insetos que consumirem os inibidores de proteases (Zhu-Salzman e Zeng 2015; Singh et al., 2020). Uma classe de proteases frequentemente inibida por esses compostos são as tripsinas (Meriño-Cabrera et al., 2020; Hemmati et al., 2021; Fonseca et al., 2023), enzimas do intestino médio que catalisam o processo de digestão de proteínas e podem também estar envolvidas em outras funções, como na ativação de protoxinas ou desintoxicação de proteínas inseticidas Cry em lagartas de lepidópteros (Pérez-Hedo et al., 2012, Singh et al., 2020), ter efeitos antivirais (Nakazawa et al., 2004) e ativar a infectividade viral pela clivagem de proteínas do envelope (Darpel et al., 2011).

Além da indisponibilidade de proteínas devido à presença de inibidores de proteases, o consumo de diferentes plantas hospedeiras pode resultar em alterações do perfil metabólico do intestino médio (Oliveira et al., 2022), modificação da expressão de genes relacionados à digestão (Hafeez et al.,

2021a), disbiose da microbiota intestinal (Oliveira e Consoli, 2023) e a modificação da atividade de proteases digestivas (Hafeez et al., 2021a). Dessa forma, entendemos que a relação entre inseto, planta hospedeira e patógenos é complexa e que os processos digestivos e imunológicos têm uma relação que é influenciada pela nutrição dos insetos.

2.6. Análise de modulações fisiológicas sobre insetos sobreviventes expostos a xenobióticos

Os inseticidas têm efeito nos processos fisiológicos e bioquímicos dos insetos, impactando a sobrevivência, o crescimento, o desenvolvimento e a reprodução dos mesmos (Sparks e Nauen, 2015). A avaliação dos efeitos dos inseticidas nos organismos alvos, inimigos naturais e insetos benéficos pode ser feita após a estimativa da dose letal média (DL_{50}) ou concentração letal média (CL_{50}), um método clássico de estudo em laboratório. Esta ferramenta é útil para comparar a toxicidade dos diferentes ingredientes ativos e das diferentes formulações de inseticidas que contém o mesmo ingrediente ativo (França et al., 2017). As estimativas letais também podem ser importantes na avaliação da evolução da resistência de uma população a inseticidas (Bourguet et al., 2000).

Com a definição da CL_{50} , uma concentração de inseticida pode ser definida de forma a obter insetos sobreviventes expostos ao inseticida. Alterações fisiológicas ou comportamentais podem ser observadas em insetos sobreviventes à exposição a inseticidas (Desneux et al., 2007). Um dos efeitos observados em insetos sobreviventes à exposição a inseticidas é o fenômeno conhecido como hormese. Hormese é definida como o estímulo do desempenho do organismo após exposição a baixos níveis de agentes que normalmente seriam tóxicos em níveis elevados (Calabrese e Baldwin, 2001). Este fenômeno tem sido sugerido como o principal mecanismo para a ressurgência em populações de pragas (Cordeiro et al., 2013; Qu et al., 2015), indicando que os insetos adaptam a sua fisiologia para serem capazes de lidar com a exposição não letal aos inseticidas, com consequente crescimento populacional (Bantz et al., 2018). No entanto, as exposições a concentrações não letais também podem causar efeitos negativos, como o prolongamento do ciclo de vida e diminuição da fecundidade (Xu et al., 2016; Wu et al., 2022).

Os inseticidas não atuam apenas no local de ação primário e respostas fisiológicas podem ser observadas em insetos sobreviventes à exposição a inseticidas em sistemas distintos do alvo do inseticida, como na atividade de enzimas de detoxificação, no conteúdo de proteínas totais e na resposta imunológica (James e Xu, 2012; Pinto et al., 2019; Ismail, 2020). Paralelamente, fatores externos também podem modular a fisiologia dos insetos, alterando tolerância a inseticidas e patógenos (Miller e Cotter, 2017). Por exemplo, a composição da dieta pode alterar a concentração para matar 50% dos indivíduos (Miller e Cotter, 2017). Dessa forma, o uso da estimativa da CL_{50} é uma ferramenta útil para quantificar e comparar se a variação de um determinado fator (por exemplo, plantas hospedeiras) implica em uma maior tolerância a um agente de mortalidade (por exemplo, baculovírus).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Insetos

A população de *S. frugiperda* utilizada nos ensaios foi obtida no Laboratório de Ecologia Aplicada (ApecoLab) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal-SP. A população foi coletada em milho convencional (antes da introdução do milho transgênico no Brasil) e mantida em laboratório alimentando-se de dieta artificial (Kasten Jr. et al., 1978; Truzzi et al., 2021) por aproximadamente, livre de exposição a inseticidas, plantas transgênicas ou entomopatógenos.

3.2. Vírus entomopatogênico

O bioinseticida comercial Cartugem® (AgBiTech, Brasil) foi usado como fonte do vírus *Spodoptera frugiperda multiple nucleopolyhedrovirus* (SfMNPV).

3.3. Plantas

As plantas de algodão (IMA2106GL), milho (isolinha 30A37RR, Corteva Agriscience) e soja (NS7901RR, Nidera) foram cultivadas em casa de vegetação em vasos plásticos de 5 litros que continham aproximadamente 4,5 L de substrato. O substrato para cultivo foi composto por areia grossa, terra de barranco e esterco na proporção de 3:1:1. As plantas foram irrigadas diariamente e não foi aplicado nenhum tipo de inseticida.

Todas as folhas usadas na alimentação das lagartas foram coletadas durante o estágio vegetativo das culturas e higienizadas em laboratório pela imersão das folhas em solução de hipoclorito de sódio (0,075%) por 30 segundos, seguida de três lavagens em água e uma secagem superficial com papel toalha.

3.4. Estimativa da CL₅₀ de SfMNPV sobre lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com as diferentes culturas

Os ovos de *S. frugiperda* obtidos da criação em dieta artificial (item 3.1) foram colocadas em um recipiente cilíndrico de plástico com tampa (12 cm de diâmetro x 9 cm de altura) contendo folhas de algodão, milho ou soja. As lagartas eclodidas foram mantidas nesse recipiente até o segundo ínstar (~48 horas) e, em seguida, foram usadas para os bioensaios.

Para a estimativa da CL₅₀, discos foliares de cada cultura com 2,0 cm de diâmetro foram cortados com cortador cilíndrico metálico e imersos em uma solução contendo 0,05% de Tween 20 + SfMNPV. As concentrações de SfMNPV (corpos de oclusão por mL - obs/mL) foram obtidas a partir de diluições do bioinseticida comercial ($7,5 \times 10^9$ obs/mL) para as concentrações de 1×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 e 1×10^9 . Para o tratamento controle foi usada uma solução de água deionizada + 0,05% de Tween 20. Após a imersão, os discos foram colocados sobre camada solidificada de água e ágar a 1,0% em placas de poliestireno de 12 poços (2 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura por poço). Os discos de folhas foram separados da camada de ágar por um disco de papel de filtro cortado nas mesmas dimensões do fundo do poço das placas.

Após a secagem superficial dos discos foliares, uma lagarta de segundo ínstar (~48 horas após eclosão) foi colocada em cada poço da placa usando um pincel de ponta fina. As placas foram seladas com filme plástico e incubadas em condições controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 h). Os discos foliares foram trocados a cada dois dias por discos sem tratamento e a mortalidade das lagartas foi avaliada em 7 dias após o início da alimentação. Sintomas de infecção viral como flacidez no corpo e extravasamento do conteúdo interno das lagartas foram considerados para atribuir a mortalidade observada ao efeito do bioinseticida comercial. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com um total de 96 lagartas testadas para cada concentração do bioinseticida.

3.5. Parâmetros biológicos de *Spodoptera frugiperda* expostas a CL_{50} de SfMNPV na fase larval

Para avaliar os parâmetros biológicos do desenvolvimento larval de lagartas de *S. frugiperda* expostas às diferentes fontes de alimento e à CL_{50} de SfMNPV, uma lagarta recém eclodida obtida da criação em dieta artificial (item 3.1) foi transferida para um recipiente plástico (6,5 cm de diâmetro x 3 cm de altura) usando um pincel de ponta fina. Cada recipiente plástico continha um disco foliar de algodão, milho ou soja de 2,0 cm de diâmetro colocado sobre uma fina camada sólida de água e ágar (1,0%). Um disco de papel filtro de mesmo diâmetro do fundo do recipiente separava as folhas da camada sólida de ágar. Após a transferência das lagartas, os recipientes foram fechados com tampa própria e incubados em condições controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotofase de 12 h). Após 2 dias, os discos foliares foram trocados por discos que continham SfMNPV. Para isso, os discos foram imersos em uma solução contendo 0,05% de Tween 20 + SfMNPV na CL_{50} estimada para cada cultura [algodão ($2,96 \times 10^7$), milho ($6,36 \times 10^7$) e soja ($2,96 \times 10^7$)]. Para observação do desenvolvimento de *S. frugiperda* na ausência do vírus, folhas de algodão, milho e soja foram tratadas com uma solução de água deionizada + 0,05% de Tween 20.

As lagartas foram mantidas alimentando-se dos discos tratados por dois dias. Após esse período, as lagartas sobreviventes foram alimentadas com pedaços de folhas de algodão, milho ou soja sem adição das CL_{50} 's do vírus até chegarem à fase adulta. Os parâmetros avaliados foram: peso das lagartas em

7 dias após a exposição ao vírus, período larval, peso das pupas em 24 horas após serem formadas e período pupal. O experimento foi inteiramente casualizado, com 10 repetições, sendo 10 lagartas consideradas uma repetição. Para os tratamentos que continham vírus, foram adotadas 20 repetições.

3.6. Exposição das lagartas de *Spodoptera frugiperda* a CL₅₀ de SfMNPV para coleta da hemolinfa e extração do intestino das lagartas

Para obter a hemolinfa e o intestino das lagartas de *S. frugiperda* expostas às CL₅₀'s de SfMNPV, os ovos de *S. frugiperda* obtidos da criação em dieta artificial (item 3.1) foram colocados em um recipiente cilíndrico de plástico (12 cm de diâmetro x 9 cm de altura) contendo folhas de algodão, milho ou soja. As lagartas eclodidas foram mantidas nesse recipiente até o segundo ínstar (~48 horas). Após esse período, as lagartas foram transferidas para placas de poliestireno de 12 poços (2 cm de diâmetro e 1,5 cm de altura por poço). Cada poço continha um disco foliar de 2,0 cm de diâmetro imerso em uma solução contendo 0,05% de Tween 20 + SfMNPV na CL₅₀ estimada para cada cultura [algodão ($2,96 \times 10^7$), milho ($6,36 \times 10^7$) e soja ($2,96 \times 10^7$)]. Para os tratamentos controles, uma solução de água deionizada + 0,05% de Tween 20 foi utilizada para imersão das folhas de algodão, milho e soja. As placas continham uma camada sólida de água e ágar a 1,0% e os discos foliares foram separados da camada sólida de ágar por um disco de papel de filtro cortado nas mesmas dimensões do fundo do poço das placas. As placas foram seladas com filme plástico e incubadas em condições controladas ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotofase de 12 h). Os discos foliares foram trocados a cada dois dias por discos sem tratamento. Em 7 dias após o início da exposição ao vírus, uma parte das lagartas foi destinada para coleta da hemolinfa e a outra parte para a extração do intestino. Os tratamentos foram os mesmos utilizados para a avaliação dos parâmetros biológicos (item 3.5).

3.7. Coleta de hemolinfa de lagartas de *Spodoptera frugiperda* expostas à CL₅₀ de SfMNPV

Aos sete dias após a exposição das lagartas ao SfMNPV (item 3.6), as lagartas foram esterilizadas superficialmente com etanol 70%, colocadas em gelo e o final do abdômen foi perfurado com uma agulha hipodérmica para coleta da hemolinfa. Hemolinfas coletadas de três lagartas (~10 µL por lagarta) foram mantidas em gelo, centrifugadas (1000g; 2 min; 4°C) e o plasma (sobrenadante) foi coletado e congelado para posterior avaliação das atividades de lisozima e fenoloxidase (PO). Para as análises celulares de contagem total de hemócitos (CTH), contagem de hemócitos viáveis, adesão de hemócitos e encapsulamento, as hemolinfas foram coletadas conforme descrito para a coleta de plasma sem executar a etapa de centrifugação e as análises foram realizadas imediatamente após a coleta. Um conjunto de hemolinfas coletadas de 3 lagartas foi considerado uma repetição e cada tratamento foi composto por 10 repetições.

3.8. Atividades de fenoloxidase e lisozima e quantificação das proteínas totais na hemolinfa de lagartas de *S. frugiperda* expostas a CL₅₀ de SfMNPV

A atividade da fenoloxidase (PO) foi medida pela incubação de 2 µL do plasma da hemolinfa com 198 µL de substrato (5 mM L-Dopa, 10 mM cacodilato de sódio, 5 mM CaCl₂, pH 7,0) em uma microplaca de 96 poços. A microplaca foi transferida para um espectrofotômetro Multiskan Sky Microplate (Thermofisher) mantido a 30°C e a absorbância das amostras foi medida a 490 nm em intervalos de 30 segundos durante 1 hora. A fase de aumento linear da absorbância em função do tempo (absorbância vs tempo; $R^2 \geq 0,99$) foi usada para determinar a atividade de PO. Considerou-se uma unidade de PO (U) a quantidade de enzima necessária para aumentar 0,001 unidades de absorbância a 490 nm por minuto. Foram realizados ensaios para observação da formação de produtos detectáveis a 490 nm na ausência de substrato por meio da substituição do volume de substrato na reação por tampão (10 mM cacodilato de sódio, 5 mM CaCl₂, pH 7,0).

Para a atividade de lisozima, 197 µL de substrato composto por 0,015% (p/v) de células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma Chemicals St.

Louis) suspensas em tampão fosfato de sódio (0,05 M; pH 6,4) foram homogeneizados em uma microplaca de 96 poços com 3 µL do plasma da hemolinfa. A seguir, a microplaca foi transferida para o espectrofotômetro (30°C) e a absorbância foi medida continuamente a 450 nm em intervalos de 30 segundos por 1 hora. Uma unidade de lisozima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para reduzir 0,0001 unidades de absorbância a 450 nm por minuto. Foram realizados ensaios para observação da redução da absorbância ou formação de produtos detectáveis a 450 nm na ausência de substrato por meio da substituição do volume de substrato na reação por tampão (0,05 M fosfato de sódio; pH 6,4).

A concentração de proteínas totais na hemolinfa foi estimada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando o reagente comercial Bradford Reagent (Sigma-Aldrich) e albumina de soro bovino (BSA) como padrão (1-6 µg de BSA por poço). A curva padrão de BSA foi construída pelo método de regressão linear no programa Excel e as proteínas foram quantificadas em µg/µL. As amostras foram preparadas pela adição de 250 µL do reagente de Bradford a 5 µL de amostra (composta por 1 µL de hemolinfa + 4 µL de água). A amostra de referência (branco) foi preparada pela substituição do volume de amostra por 5 µL de água. Após o preparo, as amostras foram mantidas por 10 min em temperatura ambiente e as amostras foram analisadas no espectrofotômetro Multiskan Sky Microplate (Thermofisher) regulado a 595 nm.

3.9. Análise celular

Para contagem total de hemócitos (CTH) e análise da viabilidade dos hemócitos (VH) foi utilizada a câmara de Neubauer (HBG® 9020-01) sob microscopia de contraste de fase (Zeiss® Axio Imager A2; lentes objetivas de 40x, resultando em um aumento de 400x). A hemolinfa foi retirada conforme descrito no item 3.7 e, para cada repetição, foram coletadas hemolinfas de quatro lagartas. As hemolinfas coletadas foram diluídas 10 vezes em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,05 M e corante Trypan Blue (1x), um reagente que penetra na membrana de células mortas. Cada amostra continha 5 µL de hemolinfa, 20 µL de PBS 0,05M e 25 µL de Trypan Blue. O volume total de cada reação foi de

50 μL e uma amostra ($\sim 20 \mu\text{L}$) foi analisada na câmara de Neubauer. Quatro quadrantes foram contados e as seguintes fórmulas foram utilizadas:

$$\begin{aligned}\text{CTH } \mu\text{L}^{-1} &= [(\sum \text{hemócitos} \times \text{diluição} \times 10.000) / \sum \text{quadrantes}] / 1000 \\ \text{CHM } \mu\text{L}^{-1} &= [(\sum \text{hemócitos mortos (corados)} \times \text{diluição} \times 10.000) / \sum \text{quadrantes}] / 1000 \\ \text{VH} &= 100 - [(\text{CHM } \mu\text{L}^{-1} \times 100) / \text{CTH } \mu\text{L}^{-1}]\end{aligned}$$

Em que:

$$\begin{aligned}\text{CTH } \mu\text{L}^{-1} &= \text{Contagem total de hemócitos por } \mu\text{L de hemolinfa} \\ \text{CHM } \mu\text{L}^{-1} &= \text{Contagem de hemócitos mortos (corados) por } \mu\text{L de hemolinfa} \\ \text{VH} &= \text{Viabilidade de Hemócitos (\%)}\end{aligned}$$

Para avaliar a adesão de hemócitos, uma amostra de 10 μL de hemolinfa, correspondente a hemolinfa coletada de 4 lagartas (item 3.7) foi colocada sobre lâminas de vidro e incubados em temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, a gota de hemolinfa foi lavada suavemente com PBS 0,05 M para remoção de detritos e células não aderidas, resultando em uma área de células formada sobre a lâmina de vidro. As células foram fixadas com 5% de metanol diluído em tampão anticoagulante (0,098 M NaOH; 0,15 M NaCl; 0,017 M EDTA; 0,046 M ácido cítrico) por 5 min. Em seguida, as células foram coradas com corante Giemsa a 0,6% (Laborclin) por 10 min (Coodin e Caveney, 1992, Manachini et al., 2011, Pinto et al., 2019, Pinto et al., 2021). As células coradas foram lavadas com metanol 5% em tampão anticoagulante e as lâminas de vidro contendo a monocamada de células aderidas foram cobertas com uma lamínula limpa e seladas com verniz incolor. As lâminas foram fotografadas em microscopia de luz (Zeiss® Axio Imager A2; lente objetiva de 40x) e a área coberta pelas células foi calculada em porcentagem em relação à área total da gota de hemolinfa. As áreas foram medidas usando o software ImageJ v.1.5i e 10 repetições de cada tratamento foram realizadas para estimar a adesão celular.

A capacidade de encapsulação celular *in vitro* foi avaliada por meio da incubação de 5 μL de hemolinfa (item 3.7) com 17,5 μL de meio de cultura

InsectXpress™ (Lonza®) e 10 µL de grânulos de Sephadex A-25 (0,1% p/v) em um microtubo com tampa (200 µL). A solução de cultivo foi homogeneizada em agitador orbital (temperatura ambiente, 100 rpm, 2 horas). Os grânulos foram observados em microscópio de contraste de fase (Zeiss® Axio Imager A2; lente objetiva de 40x) e foram classificados em classes (I-V) de acordo com a espessura da cápsula formada pelos hemócitos ao redor dos grânulos (Zhang et al., 2005; Wu et al., 2008; Teng et al., 2016; Li et al., 2018). Foram classificados como classe I os grânulos com no máximo dez hemócitos anexados; classe II os grânulos com 10-50 hemócitos anexados; classe III os grânulos com mais de 50 hemócitos anexados e cobertos com uma camada de principalmente três células; classe IV grânulos cobertos com mais de 3 camadas de células mais finas que o diâmetro do grânulo e classe V os grânulos cobertos por células com camada maiores do que o diâmetro do grânulo. O índice de encapsulamento (IE) foi calculado pela fórmula $IE = [(\sum \text{classes definidas} / \sum \text{número de grânulos definidos}) * 100] / 5$. Onze repetições foram realizadas para cada tratamento.

3.10. Extração dos intestinos de lagartas de *Spodoptera frugiperda* expostas a CL₅₀ de SfMNPV

Aos sete dias após a exposição das lagartas ao SfMNPV (item 3.6), as lagartas sobreviventes foram colocadas em gelo (10 min) e transferidas para solução salina (NaCl 125 mM) para a dissecação dos intestinos. Para isso, as lagartas tiveram suas cabeças e extremidades posteriores retiradas e seus intestinos foram retirados com o auxílio de uma pinça após um corte longitudinal através do tegumento na região ventral das lagartas.

Os intestinos médios contendo a membrana peritrófica foram pesados e congelados para posteriormente serem macerados em homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem na proporção de 3 intestinos para 600 µL de água. Após maceração, os homogeneizados foram centrifugados (10.000xg, 10 min, 4°C) e o sobrenadante foi utilizado como fonte de enzimas solúveis nos ensaios de atividade enzimática (tripsina e fosfatase alcalina). Cada tratamento foi composto por 10 repetições e 3 intestinos foram considerados uma repetição.

3.11. Atividades de tripsina e fosfatase alcalina e quantificação das proteínas totais do intestino de lagartas de *Spodoptera frugiperda* expostas à CL₅₀ de SfMNPV

A atividade de tripsina foi medida após incubação de 40 µL do extrato enzimático de intestino (diluído 10x em água) com 160 µL de substrato (Bapna 1,0875 mM, 0,15% de DMSO em tampão Gly-NaOH 0,1 M pH 9,0) e 40 µL de água em uma microplaca de 96 poços. A microplaca foi transferida para um espectrofotômetro Multiskan Sky Microplate (Thermofisher), incubada a 30°C e a atividade de tripsina foi determinada medindo continuamente a absorbância a 410 nm em intervalos de 30 segundos durante 20 minutos. Ensaios controles como branco de substrato (formação de produtos detectáveis a 410 nm na ausência de enzima) e branco de enzima (formação de produtos detectáveis a 410 nm na ausência de substrato) foram realizados da mesma maneira para detecção de possíveis interferências nos ensaios. Uma curva padrão de p-nitroanilina (25-125 pmol, $y = 0,019x$; $R^2 = 0,99$) foi usada como referência para o cálculo da atividade de tripsina. Uma unidade de tripsina (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1 µmol de p-nitroanilina por segundo. Os resultados foram expressos em U/intestino.

Para a atividade de fosfatase alcalina, as reações foram compostas por 50 µL de extrato enzimático, 25 µL de tampão (Gly-NaOH 100 mM pH 9,0) e 25 µL de substrato p-nitrofenil-fosfato (pNPP 20 mM). As placas de 96 poços foram incubadas a 30°C em espectrofotômetro (Multiskan Sky, ThermoScientific®) e as leituras de absorbância a 405 nm nas amostras foram realizadas de maneira contínua a cada 1 minuto por 20 minutos. Ensaios controles como branco de substrato (formação de produtos detectáveis a 405 nm na ausência de enzima) e branco de enzima (formação de produtos detectáveis a 405 nm na ausência de substrato) foram realizados da mesma maneira para detecção de possíveis interferências nos ensaios. Uma curva padrão de p-nitrofenol (8-32 nmol, $y = 0,103x$; $R^2 = 0,99$) foi usada como referência para o cálculo da atividade de fosfatase alcalina. Uma unidade de fosfatase alcalina (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a formação de 1 pmol de p-nitrofenol por segundo. Os resultados foram expressos em U/intestino.

A concentração de proteínas no extrato de intestino foi estimada pelo método de Bradford (Bradford 1976), seguindo a mesma metodologia descrita no item 3.8.

3.12. Análises estatísticas

Para a estimativa da CL_{50} , as relações concentração-resposta para mortalidade foram analisadas pela análise de regressão de Probit (Finney, 1971) e os valores de concentração letal média (CL_{50}) foram estimados utilizando o software SAS (SAS Institute, 2015).

Os dados dos parâmetros biológicos (peso larval, período larval, peso pupal e período pupal), celulares (CTH, VH, adesão e encapsulamento), humorais (atividade de fenoloxidase e lisozima e quantificação de proteínas totais na hemolinfa) e digestivos (atividades de tripsina e fosfatase alcalina e quantificação de proteínas totais do intestino) foram testados em termos de homoscedasticidade (teste de Bartlett, $\alpha = 0,05$) e normalidade (teste de Cramer-von Mises, $\alpha = 0,05$, package nortest). Quando os dados não se enquadravam nessas premissas, os dados foram transformados usando o coeficiente indicado pelo teste de Box-Cox (package Mass). Em seguida, com as premissas de distribuição normal e homogeneidade das variâncias atendidas, os dados foram analisados por Two-way ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$, packages gsheets e ExpDes.pt).

Mesmo com as transformações indicadas pelo teste de Box-Cox, os dados de período larval e período pupal não atenderam os requisitos de distribuição normal e homogeneidade das variâncias e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$) e as médias foram comparadas pelo teste de comparação múltipla de Kruskal-Wallis ($\alpha=0.05$) utilizando a correção de Bonferroni (package agricolae). As análises foram realizadas utilizando-se o software R (R Core Team, 2023).

4. RESULTADOS

4.1. Estimativa da CL₅₀ de SfMNPV a lagartas de *Spodoptera frugiperda*

As CL₅₀'s de SfMNPV estimadas para lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de algodão, milho ou soja foram, respectivamente, de $2,96 \times 10^7$, $6,36 \times 10^7$ e $2,62 \times 10^7$ obs/mL de SfMNPV (Tabela 1). As lagartas que se alimentaram de milho precisaram de uma CL₅₀ de SfMNPV aproximadamente duas vezes maior em relação às CL₅₀'s observadas para lagartas que se alimentaram de folhas de algodão ou de soja (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração letal da solução contendo o vírus SfMNPV necessária para morte de 50% da população (CL₅₀) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de algodão, milho ou soja em ensaios de imersão das folhas das plantas hospedeiras em soluções contendo diferentes concentrações de SfMNPV.

Cultura	n ^a	CL ₅₀ (IC 95%) ^b obs/mL	Coeficiente angular ± EP	χ^2 ^c	GL ^d	P
Algodão	576	$2,96 \times 10^7$ ($2,38 \times 10^7$ - $3,73 \times 10^7$)	$1,35 \pm 0,098$	5,204	4	0,2670
Milho	468	$6,36 \times 10^7$ ($3,91 \times 10^7$ - $1,19 \times 10^8$)	$0,6885 \pm 0,0758$	5,0943	3	0,1650
Soja	557	$2,62 \times 10^7$ ($2,07 \times 10^7$ - $3,35 \times 10^7$)	$1,2648 \pm 0,0927$	7,4675	4	0,1132

^an = número de indivíduos testados por população.

^bIC = intervalo de confiança.

^c χ^2 = qui-quadrado de Pearson.

^dGL = grau de liberdade.

4.2. Parâmetros biológicos após exposição à CL₅₀ de SfMNPV na fase larval de *Spodoptera frugiperda*

Após 7 dias alimentando-se dos diferentes hospedeiros vegetais, independente da presença do vírus entomopatogênico, as lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de milho atingiram maior peso larval (aproximadamente 164 mg) em relação a lagartas alimentadas com folhas de algodão (aproximadamente 59 mg), valor superior ao observado para lagartas alimentadas com folhas de soja (aproximadamente 17 mg). A exposição ao vírus

entomopatogênico reduziu o peso larval apenas na condição de alimentação com folhas de algodão (redução de 19%) (Figura 1A). O peso de pupas formadas na ausência do vírus entomopatogênico foi superior quando as lagartas foram alimentadas com folhas de algodão ($239,29 \pm 1,66$ mg) seguido dos pesos de pupas obtidos para lagartas alimentadas com folhas de milho e soja (aproximadamente 212 mg). Na presença do vírus entomopatogênico, os pesos das pupas formadas foram reduzidos nas lagartas alimentadas com os três hospedeiros vegetais (redução de 7, 2,8 e 2,5% para lagartas alimentadas com folhas de algodão, milho e soja, respectivamente), sendo o peso das pupas formadas após alimentação com folhas de algodão ($222,50 \pm 1,56$ mg) superior ao observado para pupas formadas após alimentação com folhas de milho e soja (aproximadamente 212 mg) (Figura 1B).

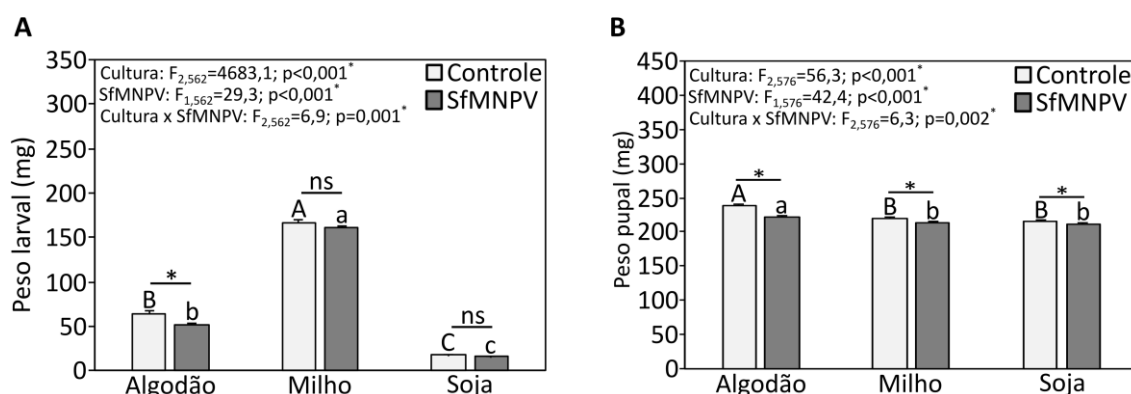


Figura 1. Peso (mg) de lagartas de *Spodoptera frugiperda* aos 7 dias após início da alimentação com folhas de algodão, milho ou soja (A) e de pupas formadas após alimentação da fase larval com folhas desses cultivos (B). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os parâmetros medidos nos diferentes hospedeiros vegetais na ausência do vírus entomopatogênico (Controle) (Teste de Tukey, $p<0.05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os parâmetros medidos nos diferentes hospedeiros vegetais na presença do vírus entomopatogênico (SfMNPV) (Teste de Tukey, $p<0.05$). “*” ou “ns” indicam, respectivamente, presença ou ausência de diferença significativa entre as médias observadas entre Controle e SfMNPV em cada hospedeiro vegetal avaliado (2way-Anova, $\alpha=0.05$).

Na ausência do vírus entomopatogênico, o período larval de *S. frugiperda* foi significativamente superior quando as lagartas foram alimentadas com folhas de soja ($23,17 \pm 0,16$ dias), intermediário quando alimentadas com folhas de algodão ($18,01 \pm 0,07$ dias) e inferior quando alimentadas com folhas de milho

(14,18 $\pm$ 0,05 dias). Na presença do vírus, os períodos observados para o período larval de *S. frugiperda* foram os mesmo quando as lagartas foram alimentadas com soja e algodão, mas foi observado um aumento de 3,1% no período larval nas lagartas alimentadas com milho expostas ao vírus entomopatogênico (Figura 2A). O período da fase de pupa de *S. frugiperda* não foi alterado pela exposição ao vírus entomopatogênico, apenas pelo hospedeiro vegetal consumido durante a fase larval. O maior período pupal foi observado em pupas formadas após o consumo de folhas de soja (aproximadamente 11,0 dias), seguido do período observado após o consumo de folhas de milho (aproximadamente 10,5 dias) e, finalmente, pelo consumo de folhas de algodão (aproximadamente 9,9 dias) (Figura 2B).

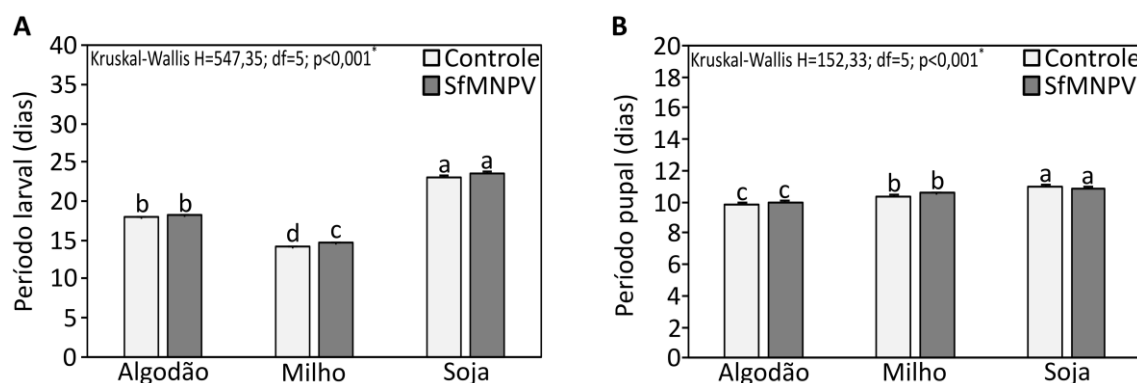


Figura 2. (A) Duração (dias) da fase larval de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com folhas de algodão, milho ou soja e (B) duração (dias) da fase de pupas de *S. frugiperda* formadas após alimentação da fase larval com folhas de algodão, milho ou soja. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os parâmetros medidos (Comparação múltipla de Kruskal-Wallis utilizando a correção de Bonferroni; $p < 0.05$).

4.3. Quantificação das proteínas totais e atividades de fenoloxidase e lisozima na hemolinfa de lagartas de *Spodoptera frugiperda* expostas à CL₅₀ de SfMNPV

Para a concentração de proteínas totais na hemolinfa foi observada interação entre cultura + SfMNPV ($F_{2,54}=3,75$; $P=0,029$). As lagartas que se alimentaram de milho e soja não tiveram a concentração de proteínas alterada na presença do SfMNPV, entretanto, a concentração de proteínas totais na hemolinfa foi maior na presença do SfMNPV nas lagartas que se alimentaram de algodão (Figura 3A).

Para a atividade de lisozima, foi observada interação entre cultura e SfMNPV ($F_{2,57}=4,23$; $P=0,01$). Sem a presença do SfMNPV, não houve diferença na atividade de lisozima entre as lagartas que se alimentaram de algodão ($2,93 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$), milho ($1,39 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) ou soja ($3,07 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) ($F_{2,57}=0,80$; $P=0,45$). Porém, na presença do SfMNPV, a atividade de lisozima foi superior nas lagartas que se alimentaram de milho ($9,10 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) em relação à atividade de lisozima observada nas lagartas que se alimentaram de soja ($3,64 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$). Em destaque, a atividade de lisozima nas lagartas que se alimentaram de milho foi 2,5 vezes maior na presença do SfMNPV ($F_{1,57}=13,14$; $P<0,001$) (Figura 3B).

Não houve interação entre os fatores cultura e SfMNPV para a atividade de fenoloxidase ($F_{2,59}=2,16$; $P=0,12$) e a presença do SfMNPV não alterou a atividade de fenoloxidase ($F_{1,59}=1,14$; $P=0,28$). O único fator que apresentou influência sobre a atividade de fenoloxidase foi o alimento consumido ($F_{2,59}=5,8$; $P=0,005$). As lagartas que se alimentaram de milho apresentaram atividade de fenoloxidase de aproximadamente $3,08 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$, valor aproximadamente 30% superior aos valores de atividade observados nas lagartas que se alimentaram de algodão ($2,31 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) ou soja ($2,43 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) (Figura 3C).

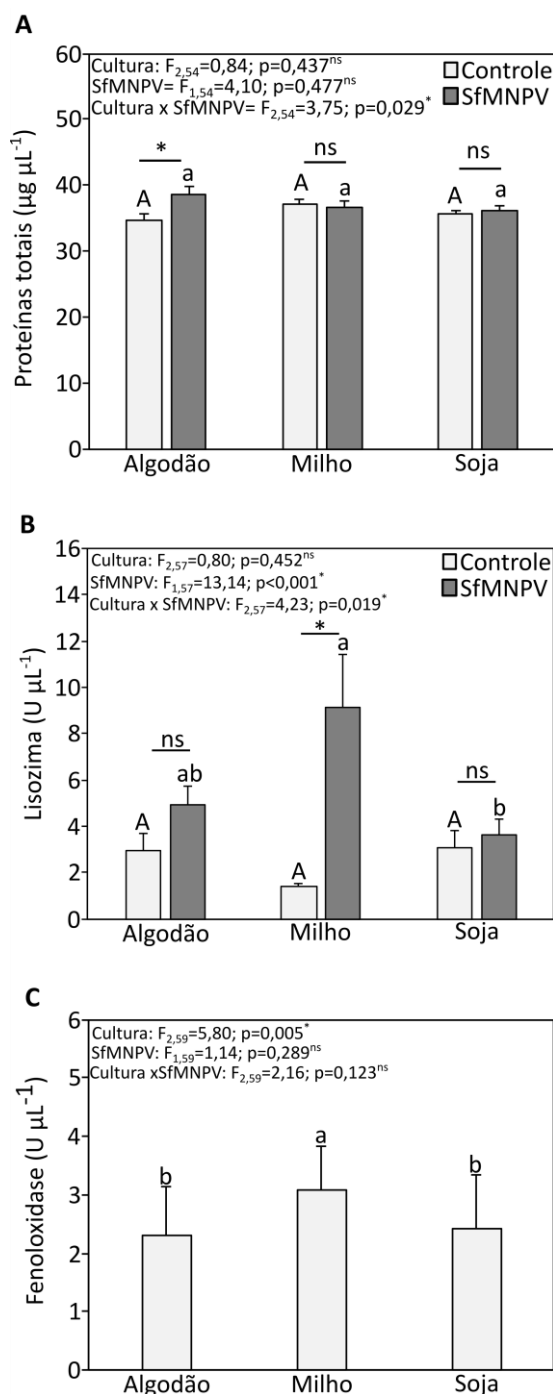


Figura 3. Parâmetros analisados na hemolinfa de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em 7 dias após início da alimentação com folhas de algodão, milho ou soja. (A) Concentração de proteínas totais ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$), (B) Atividade de lisozima ($\text{U } \mu\text{L}^{-1}$) e (C) Atividade de Fenoloxidase ($\text{U } \mu\text{L}^{-1}$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os parâmetros medidos nos diferentes hospedeiros vegetais na ausência do vírus entomopatogênico (Controle) (Teste de Tukey, $p<0.05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os parâmetros medidos nos diferentes hospedeiros vegetais na presença do vírus entomopatogênico (SfMNPV) (Teste de Tukey, $p<0.05$). “*” ou “ns” indicam, respectivamente, presença ou ausência de diferença significativa entre as médias observadas entre Controle e SfMNPV em cada hospedeiro vegetal avaliado (2way-Anova, $\alpha=0.05$).

4.4. Análise celular

Para a contagem de hemócitos foi observada interação entre cultura e SfMNPV ($F_{2,58}=9,85$; $P<0,001$). A contagem de hemócitos na hemolinfa das lagartas que se alimentaram de algodão foi aproximadamente 2 vezes maior ($18.546,67 \text{ cel } \mu\text{L}^{-1}$) do que nas lagartas que se alimentaram de milho ($9.326,66 \text{ cel } \mu\text{L}^{-1}$) ou soja ($9.863,63 \text{ cel } \mu\text{L}^{-1}$) ($F_{2,58}=25,49$; $P<0,001$). Já na presença do SfMNPV a contagem de hemócitos nas lagartas que se alimentaram de algodão foi maior ($14.457,58 \text{ cel } \mu\text{L}^{-1}$) apenas do que na hemolinfa das lagartas que se alimentaram de soja ($10.716,67 \text{ cel } \mu\text{L}^{-1}$). A presença do SfMNPV não alterou a contagem de hemócitos na hemolinfa das lagartas que se alimentaram de soja. Para as lagartas que se alimentaram de milho a contagem de hemócitos foi 1,4 vezes maior na presença do SfMNPV ($13.321,21 \text{ cel } \mu\text{L}^{-1}$). Já para as lagartas que se alimentaram de algodão a contagem de hemócitos foi 1,2 vezes menor na presença do SfMNPV ($14.457,58 \text{ cel } \mu\text{L}^{-1}$) ($F_{1,58}=0,12$; $P<0,72$) (Figura 4A). Em relação a viabilidade dos hemócitos, não foi observada alteração na viabilidade dos hemócitos (viabilidade média= 95%) em função da alimentação com diferentes culturas ($F_{2,59}=1,00$; $P=0,37$), da presença do SfMNPV ($F_{1,59}=0,31$; $P=0,73$) ou da interação entre os fatores ($F_{1,59}=0,67$; $P=0,41$).

Para o encapsulamento, uma interação significativa foi observada entre cultura e SfMNPV ($F_{2,60}=3,48$; $P=0,03$). O encapsulamento nas lagartas que se alimentaram de soja (24,35 %) foi aproximadamente 1,5 vezes menor do que o encapsulamento nas lagartas que se alimentaram de milho (34,56 %) ou algodão (39,58%). Na presença do SfMNPV, o encapsulamento foi similar entre as culturas ($F_{2,60}=7,99$; $P<0,001$). Dentro da mesma cultura, o encapsulamento foi menor apenas para as lagartas que se alimentaram de algodão na presença do SfMNPV (28,72 %). Para as demais culturas, o encapsulamento não foi alterado na presença do SfMNPV (Figura 4B).

Para a aderência celular, não foi observada interação entre cultura e SfMNPV ($F_{2,40}=0,44$; $P=0,64$) e a presença do SfMNPV não alterou a aderência celular ($F_{1,40}=0,57$; $P=0,45$). Para as lagartas que se alimentaram de algodão, a aderência celular foi duas vezes maior (23,92% de área) em relação às lagartas que se alimentaram de milho (10,44% de área) ou soja (9,71% de área) ($F_{2,40}=37,06$; $P<0,001$) (Figura 4C).

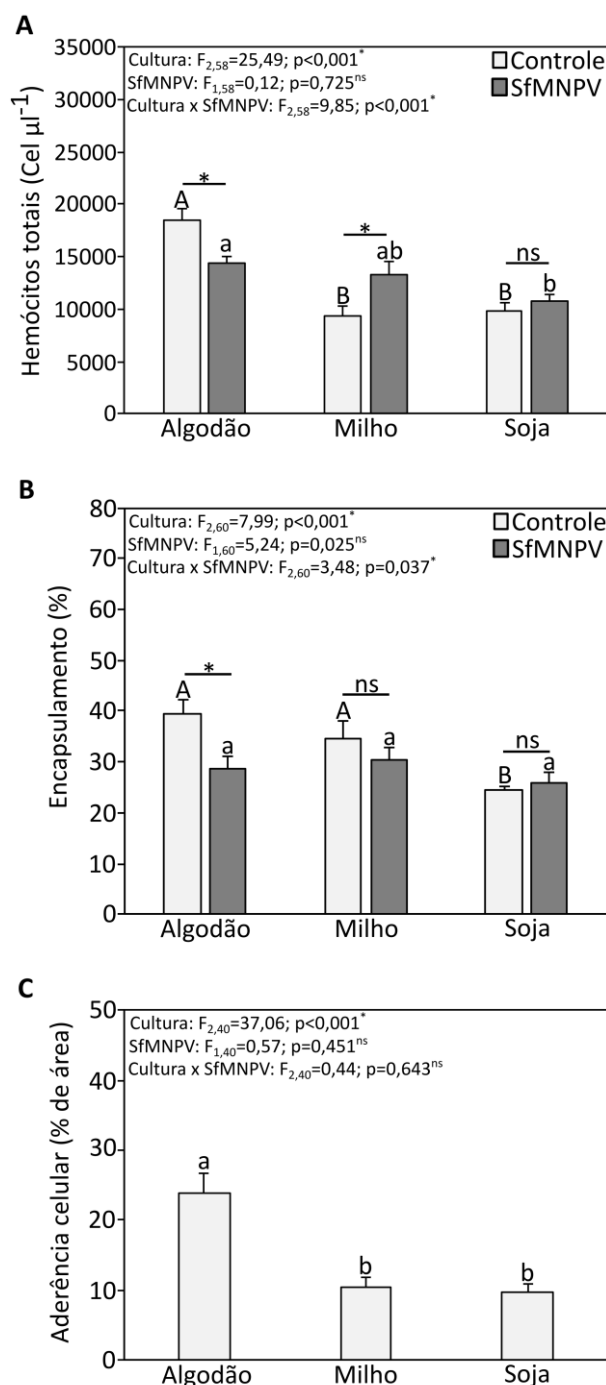


Figura 4. Parâmetros celulares analisados na hemolinfa de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em 7 dias após início da alimentação com folhas de algodão, milho ou soja. (A) Contagem de hemócitos totais (Cel μL^{-1}), (B) Encapsulamento (%) e (C) Aderência celular (% de área). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os parâmetros medidos nos diferentes hospedeiros vegetais na ausência do vírus entomopatogênico (Controle) (Teste de Tukey, $p<0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os parâmetros medidos nos diferentes hospedeiros vegetais na presença do vírus entomopatogênico (SfMNPV) (Teste de Tukey, $p<0,05$). “*” ou “ns” indicam, respectivamente, presença ou ausência de diferença significativa entre as médias observadas entre Controle e SfMNPV em cada hospedeiro vegetal avaliado (2way-Anova, $\alpha=0,05$).

4.5. Quantificação das proteínas totais e atividades de tripsina e fosfatase alcalina no intestino médio de lagartas de *Spodoptera frugiperda* expostas à CL₅₀ de SfMNPV

Não foi observada interação significativa entre os fatores cultura e SfMNPV ($F_{2,54}=2,08$; $P=0,13$) para os valores de concentração de proteínas totais no intestino de *S. frugiperda*. Independente da exposição a SfMNPV ($F_{1,54}=2,36$; $P=0,13$), lagartas que se alimentaram de algodão apresentaram maior quantidade de proteínas totais no intestino (17,72 µg/µL) em relação a lagartas que se alimentaram de milho (16,48 µg/µL) e as lagartas alimentadas com folhas de soja (17,44 µg/µL) apresentaram valores intermediários de proteínas totais no intestino que não diferiram dos valores observados em lagartas alimentadas com as outras duas culturas ($F_{2,54}=3,97$; $P=0,02$) (Figura 5A).

Para a atividade de tripsina, não foi observada interação entre cultura e SfMNPV ($F_{2,54}=2,49$; $P=0,09$) e não foi observado efeito da presença do SfMNPV sobre a atividade de tripsina ($F_{1,54}=0,46$; $P=0,49$). A atividade de tripsina digestiva foi influenciada apenas pela cultura consumida ($F_{2,54}=23,99$; $P<0,001$). As lagartas que se alimentaram de algodão apresentaram atividade de tripsina aproximadamente reduzida (55,72 U/intestino) em relação à atividade de tripsina observada em lagartas que se alimentaram de milho (120,52 U/intestino) ou soja (93,91 U/intestino) (Figura 5B).

Foi observada interação entre os fatores cultura e SfMNPV ($F_{2,52}=8,33$; $P<0,001$) para os valores de atividade de fosfatase alcalina no intestino de *S. frugiperda*. Na ausência de SfMNPV, as lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de milho tiveram atividade de fosfatase alcalina superior (16,81 U/intestino) à atividade de fosfatase alcalina observada nas lagartas alimentadas com folhas de algodão (10,45 U/intestino) ou soja (10,65 U/intestino). Na presença de SfMNPV, a atividade de fosfatase alcalina foi similar entre as lagartas alimentadas com as diferentes culturas ($F_{1,52}=3,53$; $P=0,065$). Apenas as lagartas alimentadas com milho apresentaram redução de 1,5 x em relação à atividade observada em lagartas que se alimentaram de milho e foram expostas a SfMNPV (11,40 U/intestino) (Figura 5C).

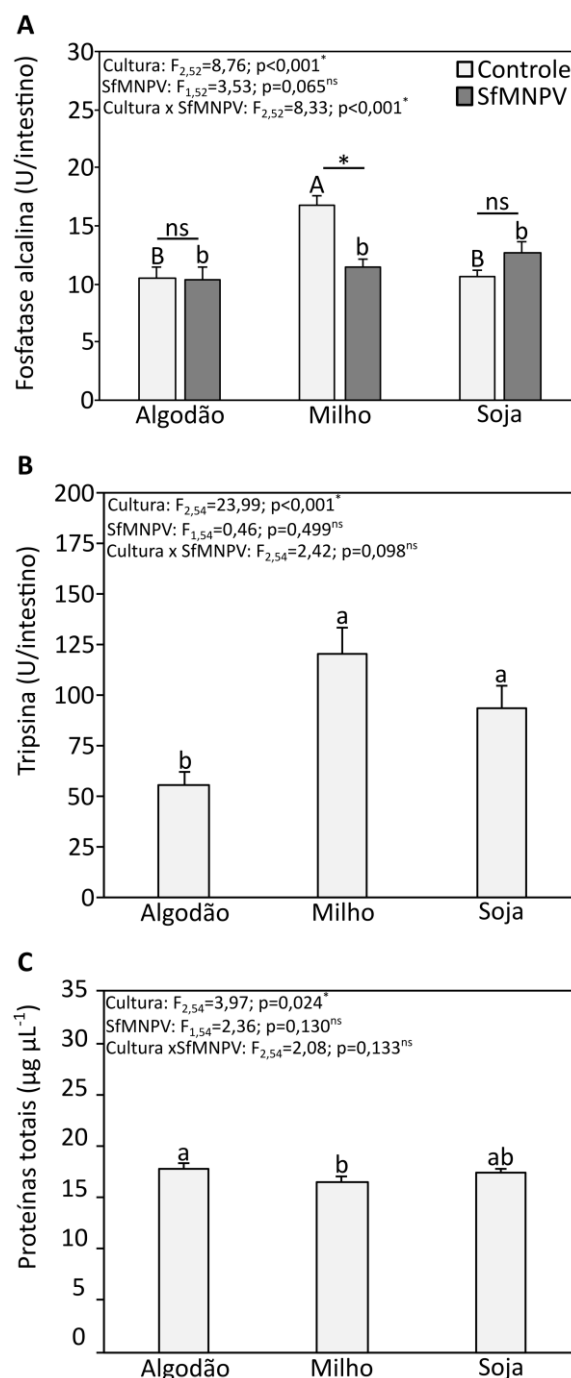


Figura 5. Parâmetros analisados no extrato enzimático do intestino de lagartas de *Spodoptera frugiperda* em 7 dias após início da alimentação com folhas de algodão, milho ou soja. (A) Atividade de fosfatase alcalina (U/intestino), (B) Atividade de tripsina (U/intestino) e (C) Teor de proteínas totais ($\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os parâmetros medidos nos diferentes hospedeiros vegetais na ausência do vírus entomopatogênico (Controle) (Teste de Tukey, $p<0,05$). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os parâmetros medidos nos diferentes hospedeiros vegetais na presença do vírus entomopatogênico (SfMNPV) (Teste de Tukey, $p<0,05$). “*” ou “ns” indicam, respectivamente, presença ou ausência de diferença significativa entre as médias observadas entre Controle e SfMNPV em cada hospedeiro vegetal avaliado (2way-Anova, $\alpha=0,05$).

5. DISCUSSÃO

A qualidade das plantas hospedeiras pode afetar diretamente o crescimento e o desenvolvimento dos insetos herbívoros (Saeed et al., 2010). Independente da exposição ao SfMNPV, as lagartas que se alimentaram com folhas de milho apresentaram maior peso aos 7 dias em relação às lagartas que consumiram folhas algodão ou soja. Além disso, as lagartas que se alimentaram de folhas de milho apresentaram menor período larval em relação as lagartas que consumiram folhas de algodão ou soja. Esses resultados indicam que a alimentação com folhas de milho proporciona condições mais favoráveis para o desenvolvimento larval de *S. frugiperda* em relação a lagartas que consumiram folhas de algodão ou soja. Devido ao período larval mais curto em lagartas alimentadas com folhas de milho, possivelmente, a diferença no peso larval aos sete dias se deve ao fato de que as lagartas que se alimentaram de milho estavam em ínstares mais avançados em relação às lagartas que consumiram folhas de algodão ou soja.

Porém, apesar das lagartas que se alimentaram de algodão e soja apresentarem o desenvolvimento mais lento em relação ao observado ao consumirem folhas de milho, o peso pupal de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de soja equiparou-se com o peso pupal de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de milho. Adicionalmente, o peso pupal de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de algodão foi aproximadamente 10% superior ao peso pupal obtido quando as lagartas se alimentaram de folhas de milho e soja. Essa equiparação dos pesos de pupas indica que os três hospedeiros vegetais avaliados resultam na formação de pupas similares.

Ao serem expostas ao SfMNPV, as lagartas de *S. frugiperda* apresentaram uma redução do peso larval apenas quando estavam consumindo algodão e redução do peso de pupas ao serem alimentadas com qualquer uma das culturas. Esses resultados sugerem que as lagartas sobreviventes à CL₅₀ do SfMNPV apresentaram um custo para superar a exposição ao entomopatógeno que resultou em uma diminuição no peso das pupas. Alterações de desenvolvimento foram observadas em lepidópteros imaturos expostos a concentrações não letais de inseticidas à base de baculovírus (Monobrullah e Shankar, 2008; Cabodevilla et al., 2011; Führ et al., 2021).

A alimentação com diferentes culturas isoladamente não alterou a atividade de lisozima nas lagartas de *S. frugiperda*, porém, ao serem expostas ao SfMNPV, as lagartas que se alimentaram de milho tiveram sua atividade de lisozima aumentada 2,5 vezes. A lisozima é uma importante enzima de defesa no sistema imunológico dos insetos, além da sua propriedade antibacteriana, estudos anteriores indicam que a lisozima pode atuar também como composto antiviral, bloqueando a replicação dos vírus (Mai e Wang, 2010; Takahashi et al., 2017; Chen et al., 2018). Dessa forma, os resultados indicam uma influência da planta na atividade de lisozima, indicando que as lagartas que se alimentaram de milho tiveram uma maior resposta na atividade de lisozima e, conseqüentemente, a sua CL_{50} foi maior do que nas lagartas que se alimentaram de algodão e soja.

A alimentação com folhas de milho influenciou a atividade da fenoloxidase de forma que as lagartas que se alimentaram de milho apresentaram a maior atividade de fenoloxidase. Os padrões de atividade de lisozima e fenoloxidase observados sugerem que lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de milho apresentam resposta imunológica humoral superior às respostas observadas por lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de algodão e soja. Essas atividades superiores desses dois fatores humorais em lagartas de *S. frugiperda* alimentadas com folhas de milho estão provavelmente associadas com a necessidade de uma maior concentração de SfMNPV para obtenção da CL_{50} de SfMNPV nessas lagartas em relação às lagartas alimentadas com folhas de algodão e soja.

A resposta imunológica celular foi influenciada tanto pelo consumo das diferentes plantas hospedeiras, como pela presença do SfMNPV. As lagartas que se alimentaram de folhas de algodão na ausência de SfMNPV apresentaram maior contagem de hemócitos na hemolinfa em relação às lagartas que se alimentaram de outras culturas. Na presença do SfMNPV, uma redução na contagem de hemócitos foi observada apenas em lagartas que se alimentaram de folhas de algodão. Esse fato pode ter ocorrido devido à presença de compostos secundários nas plantas de algodão, como o gossipol. O gossipol é um fenol produzido pelas plantas de algodão cuja função pode estar relacionada à defesa da planta contra estresses bióticos, como o ataque de pragas (Tian et al., 2019). Dessa forma, a relativa inadequação das folhas de algodão observada

para o desenvolvimento das lagartas pode ter resultado em aumento dos hemócitos na hemolinfa.

Porém, apesar do aumento do número de hemócitos em lagartas que se alimentaram de folhas de algodão, não foi observado aumento na capacidade de encapsulamento mesmo com aumento da aderência celular. Dessa forma, ressalta-se que o aumento do número de hemócitos observado em lagartas que se alimentaram de folhas de algodão não refletiu um aumento da capacidade de resposta imunológica celular. Tal sugestão é reforçada pelo fato que, na presença do SfMNPV, o número de total de hemócitos e a capacidade de encapsulamento foram reduzidos apenas em lagartas que se alimentaram de folhas de algodão. O resultado de aumento da aderência celular pelos hemócitos de lagartas alimentadas com folhas de algodão reforça a necessidade de atenção na interpretação desses resultados. Nem sempre resultados de aumento da aderência celular à superfície de vidro podem ser interpretados como aumento da capacidade dos hemócitos em responderem a infecções. Por exemplo, o mesmo padrão de resposta (aumento da aderência dos hemócitos e redução da capacidade de encapsulação) foi observado ao testar a atividade de um peptídeo derivado do veneno de um parasitoide (Cf4) sobre os hemócitos do seu hospedeiro (Pinto et al., 2021).

A redução do número de hemócitos era esperada após a infecção, visto que em infecções causadas por baculovírus, o número de hemócitos diminui fortemente com o aumento da dose, reduzindo a capacidade de resposta imunológica e aumentando a susceptibilidade do hospedeiro (Scholefield, 2019). Porém, nas lagartas que se alimentaram de folhas de milho, o número de hemócitos aumentou após exposição das lagartas ao SfMNPV. A capacidade de resposta do hospedeiro ao baculovírus pode ser modulada, aumentando o número de hemócitos circulantes de forma a tornar o hospedeiro menos permissivo a infecção (Shikano et al., 2010). Uma explicação para esse fato é que, em função do milho ser o hospedeiro preferencial de *S. frugiperda*, a alimentação com essa cultura não altera a contagem de hemócitos, mas, na presença do vírus, um agente estressor, o inseto responde, aumentando as defesas celulares.

Em relação ao sistema digestivo, verificamos que as lagartas que se alimentaram de algodão apresentaram menor atividade de tripsina. A tripsina é

a protease em maior abundância e a principal responsável pela digestão de proteínas em larvas de lepidópteros (Muhlia-Almazán et al., 2008). A sua presença ocorre em função da presença do alimento (Lazarević e Janković-Tomanić, 2015) e o fato das lagartas consumirem menos folhas de algodão em relação a folhas de milho e soja (observações pessoais) pode explicar a menor atividade de tripsina em lagartas que se alimentaram de algodão.

No presente estudo, insetos alimentados com plantas de milho apresentaram maior atividade de fosfatase alcalina em relação aos insetos alimentados com plantas de algodão e soja, mas esta atividade foi reduzida quando as plantas foram tratadas com a CL₅₀ de SfMNPV. Resultado similar foi verificado em *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) infectada por *Spodoptera exigua nucleopolyhedrovirus* (SeNPV), em que houve a redução da expressão dos genes de fosfatase alcalina no intestino médio do inseto (Chen et al., 2020).

A maior atividade de tripsinas e fosfatases alcalinas em lagartas alimentadas com folhas de milho é um indicativo de que os insetos estão se alimentando mais e possivelmente estariam melhor nutridos do que os insetos que se alimentaram de folhas de algodão e soja, visto que o acesso a proteínas não depende apenas da presença do nutriente no alimento, mas também da disponibilidade desse nutriente por meio da digestão. As proteínas e os carboidratos são fontes de nutrientes para os insetos e o funcionamento do sistema imunológico é dependente da qualidade dos alimentos ingeridos (Silvajio et al., 2021). Dessa forma, as diferenças nutricionais entre dietas podem impactar a resposta imunológica nos insetos (Constantin et al., 2022). As proteínas têm sido apontadas como o principal macronutriente regulador da imunidade nos estágios larvais dos insetos e, quando as larvas não têm acesso suficiente a proteínas, a sua imunidade é geralmente afetada negativamente, bem como pode ser reduzida a sua resistência a patógenos (Ponton et al., 2023). Dessa forma, as atividades das enzimas digestivas medidas nas lagartas que se alimentaram de folhas de milho podem ter implicado em uma melhor resposta imunológica nessas lagartas e, conseqüentemente, aumentado tolerância dessas lagartas ao SfMNPV, representada pela maior CL₅₀.

Este estudo reforça que a relação entre inseto, planta hospedeira e patógenos é complexa e que os processos digestivos e imunológicos têm uma

relação que é influenciada pela nutrição dos insetos. Extrapolando para dentro de um contexto agrícola, entendemos que as plantas que estão sendo cultivadas na região podem influenciar nas respostas da população das pragas que estão se alimentando delas. Dessa forma, esse estudo também reforça a importância do manejo regional das pragas.

6. CONCLUSÕES

As plantas hospedeiras alteram a suscetibilidade e a resposta imunológica e digestiva de lagartas de *S. frugiperda* expostas ao SfMNPV.

A alimentação com folhas de milho, hospedeiro preferencial de *S. frugiperda*, resultou em melhores desempenhos de desenvolvimento e fisiológicos e, conseqüentemente, em maior CL₅₀ de SfMNPV.

REFERÊNCIAS

Abbas A, Ullah F, Hafeez M, Han X, Dara MZN, Gul H, Zhao CR (2022) Biological control of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* **Agronomy** 12:2704.

Ali MI, Young SY, Felton GW, McNew RW (2002) Influence of the host plant on occluded virus production and lethal infectivity of a baculovirus. **Journal of Invertebrate Pathology** 81:158-165.

Aljibory Z, Chen MS (2018) Indirect plant defense against insect herbivores: a review. **Insect Science** 25:2-23.

Amezian D, Fricaux T, de Sousa G, Maiwald F, Huditz HI, Nauen R, Le Goff G (2023) Investigating the role of the ROS/CncC signaling pathway in the response to xenobiotics in *Spodoptera frugiperda* using Sf9 cells. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 195:105563.

Ashley TR, Wiseman BR, Davis FM, Andrews KL (1989) The fall armyworm: a bibliography. **Florida Entomologist** 152-202.

Bantz A, Camon J, Froger JA, Goven D, Raymond V (2018) Exposure to sublethal doses of insecticide and their effects on insects at cellular and physiological levels. **Current Opinion in Insect Science** 30:73-78.

Barrera G, Simón O, Villamizar L, Williams T, Caballero P (2011) *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus as a potential biological insecticide: genetic and phenotypic comparison of field isolates from Colombia. **Biological Control** 58:113-120.

Barreto MR, Guimaraes CT, Teixeira FF, Paiva E, Valicente FH (2005) Effect of Baculovirus *spodoptera* isolates in *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae and their characterization by RAPD. **Neotropical Entomology** 34:67-75.

Barros EM, Torres JB, Ruberson JR, Oliveira MD (2010) Development of *Spodoptera frugiperda* on different hosts and damage to reproductive structures in cotton. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 137:237-245.

Beas-Catena A, Sánchez-Mirón A, García-Camacho F, Contreras-Gómez A, Molina-Grima E (2014) Baculovirus biopesticides: an overview. **The Journal of Animal & Plant Sciences** 24:362-373.

Bentivenha JP, Rodrigues JG, Lima MF, Marçon P, Popham HJ, Omoto C (2018) Baseline susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to SfMNPV and evaluation of cross-resistance to major insecticides and Bt proteins. **Journal of Economic Entomology** 112:91-98.

Bernardi O, Sorgatto RJ, Barbosa AD, Domingues FA, Dourado PM, Carvalho RA, Omoto C (2014) Low susceptibility of *Spodoptera cosmioides*, *Spodoptera eridania* and *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to genetically modified soybean expressing Cry1Ac protein. **Crop Protection** 58:33-40.

Bilimoria SL (1991) The biology of nuclear polyhedrosis viruses. **Virus of Invertebrates** New York: Routledge p. 1-72.

Birch LC (1948) The intrinsic rate of natural increase of on insect population. **Journal of Animal Ecology** 17:15-26.

Boaventura D, Ulrich J, Lueke B, Bolzan A, Okuma D, Gutbrod O, Nauen, R (2020). Molecular characterization of Cry1F resistance in fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* from Brazil. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 116:103280.

Boaventura D, Buer B, Hamaekers N, Maiwald F, Nauen R (2021) Toxicological and molecular profiling of insecticide resistance in a Brazilian strain of fall armyworm resistant to Bt Cry1 proteins. **Pest Management Science** 77:3713-3726.

Bolzan A, Padovez FE, Nascimento AR, Kaiser IS, Lira EC, Amaral FS, Omoto C (2019) Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest Management Science** 75:2682-2689.

Boogaard B, Van Lent JW, Theilmann DA, Erlandson MA, van Oers MM (2017) Baculoviruses require an intact ODV entry-complex to resist proteolytic degradation of per os infectivity factors by co-occluded proteases from the larval host. **Journal of General Virology** 98:3101-3110.

Bolognesi R, Ribeiro AF, Terra WR, Ferreira C (2001) The peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda*: secretion of peritrophins and role in immobilization and recycling digestive enzymes. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 43:62-75.

Bolognesi R, Terra WR, Ferreira C (2008) Peritrophic membrane role in enhancing digestive efficiency: Theoretical and experimental models. **Journal of Insect Physiology** 54:1413-1422.

Bourguet D, Genissel A, Raymond M (2000) Insecticide resistance and dominance levels. **Journal of Economic Entomology** 93:1588-1595.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry** 72:248-254.

Bulet P, Hetru C, Dimarcq JL, Hoffmann D (1999) Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental & Comparative Immunology** 23:329-344.

Bulet P, Stocklin R (2005) Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. **Protein and Peptide Letters** 12:3-11.

Cabodevilla O, Villar E, Virto C, Murillo R, Williams T, Caballero P (2011) Intra- and intergenerational persistence of an insect nucleopolyhedrovirus: adverse effects of sublethal disease on host development, reproduction, and susceptibility to superinfection. **Applied and Environmental Microbiology** 77:2954-2960.

Calabrese EJ, Baldwin LA (2001) Hormesis: a generalizable and unifying hypothesis. **Critical Reviews in Toxicology** 31:353-424.

Carper AL, Enger M, Bowers MD (2019) Host plant effects on immune response across development of a specialist caterpillar. **Frontiers in Ecology and Evolution** 7:208.

Carvalho RA, Omoto C, Field LM, Williamson MS, Bass C (2013) Investigating the molecular mechanisms of organophosphate and pyrethroid resistance in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **PLoS One** 8:e62268.

Casmuz A, Juárez ML, Socías MG, Murúa MG, Prieto S, Medina S, Gastaminza G (2010) Revisión de los hospederos del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina** 69:209-231.

Chao W, Lei Z, Chongyu L, Kongming W, Yutao X (2019) Research progress of resistance mechanism and management techniques of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* to insecticides and Bt crops. **Plant Diseases and Pests** 10:10-17.

Chapman RF (1998) **The insects: structure and function**. Cambridge university press.

Charlton CA, Volkman LE (1993) **Parasites and Pathogens of Insects** San Diego: Academic Press p. 103–125.

Chen TT, Tan LR, Hu N, Dong ZQ, Hu ZG, Jiang YM, Chen P, Pan M, Lu C (2018) C-lysozyme contributes to antiviral immunity in *Bombyx mori* against nucleopolyhedrovirus infection. **Journal of Insect Physiology** 108:54-60.

Chen Y, Guo L, Wan N, Ji X, Zhang H, Jiang J (2020) Transcriptomic analysis of the interactions between the *Spodoptera exigua* midgut and nucleopolyhedrovirus. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 163:241-253.

Cerenius L, Söderhäll K (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews** 198:116-126.

Costantin EC, Viol DL, Del Puppo NP, Elliot SL (2022) Realism in Immune Ecology Studies: Artificial diet enhances a caterpillar's immune defense but does not mask the effects of a plastic immune strategy. **Frontiers in Insect Science** 1:754571.

Coodin S, Caveney S (1992) Lipophorin inhibits the adhesion of cockroach (*Periplaneta americana*) haemocytes in vitro. **Journal of Insect Physiology** 38:853-862.

Cordeiro EMG, De Moura ILT, Fadini MAM, Guedes RNC (2013) Beyond selectivity: are behavioral avoidance and hormesis likely causes of pyrethroid-induced outbreaks of the southern red mite *Oligonychus ilicis*? **Chemosphere** 93:1111-1116.

Cory JS, Hoover K (2006) Plant-mediated effects in insect–pathogen interactions. **Trends in Ecology & Evolution** 21:278-286.

Cunningham JC (1995) Baculoviruses as microbial insecticides. In R Reuveni ed., **Novel Approaches to Integrated Pest Management**. Lewis, Boca Raton, FL 261–292.

Darpel KE, Langner KF, Nimtz M, Anthony SJ, Brownlie J, Takamatsu HH, Mellor PS, Mertens PP. (2011) Saliva proteins of vector *Culicoides* modify structure and infectivity of bluetongue virus particles. **PLoS One** 6:e17545.

Desneux N, Decourtye A, Delpuech JM (2007) The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. **Annual Review of Entomology** 52:81-106.

Doucet D., Cusson M. (1996) Role of calyx fluid in alterations of immunity in *Choristoneura fumiferana* larvae parasitized by *Tranosema rostrale*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology** 114:311-317.

Early R, González-Moreno P, Murphy ST, Day R (2018) Forecasting the global extent of invasion of the cereal pest *Spodoptera frugiperda*, the fall armyworm. **NeoBiota** 40:25-50.

Eleftherianos I, Heryanto C, Bassal T, Zhang W, Tettamanti G, Mohamed A (2021) Haemocyte-mediated immunity in insects: Cells, processes and associated components in the fight against pathogens and parasites. **Immunology** 164:401-432.

Engelhard EK, Volkman LE (1995) Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. **Virology** 209:384-389.

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.

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 Integrate Pest Management** 8:1-10.

Federici BA (1997) Baculovirus pathogenesis. In: **The baculoviruses** Boston: Springer US p. 33-59.

Feng M, Fei S, Xia J, Labropoulou V, Swevers L, Sun J (2020) Antimicrobial peptides as potential antiviral factors in insect antiviral immune response. **Frontiers in Immunology** 11:2030.

Finney DJ (Eds.) (1971) **Probit analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 333p.

Fitt GP, Omoto C, Maia AH, Waquil JM, Caprio M, Dennehy T, Andow DA (2006) Resistance risks of Bt cotton and their management in Brazil. **Environmental risk assessment of genetically modified organisms: Methodologies for Assessing Bt Cotton in Brazil**. Wallingford: CABI Publishing, p. 300-345.

Fonseca SS, Santos ALZ, Pinto CPG, Marques L, Santos AC, Bing J, Rossi GD (2023) A soybean trypsin inhibitor reduces the resistance to transgenic maize in a population of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Economic Entomology** 116:2146-2153.

França SM, Breda MO, Barbosa DR, Araujo AM, Guedes CA (2017) The sublethal effects of insecticides in insects. **Biological Control of Pest and Vector Insects** 23-39.

Freitas Bueno RCO, Freitas Bueno A, Moscardi F, Postali Parra JR, Hoffmann-Campo, CB (2011) Lepidopteran larva consumption of soybean foliage: basis for developing multiple-species economic thresholds for pest management decisions. **Pest Management Science** 67:170-174.

Fritsch E, Undorf-Spahn K, Kienzle J, Zebitz CP, Huber J (2005) Apfelwickler-granulovirus: erste Hinweise auf Unterschiede in der Empfindlichkeit lokaler Apfelwickler-populationen. **Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes**, 57:29-34.

Führ FM, Pretto VE, Godoy DN, Garlet CG, Hettwer BL, Marçon P, Bernardi O (2021) Lethal and sublethal effects of *Chrysodeixis includens* nucleopolyhedrovirus (ChinNPV)-based biopesticide infecting different larval ages of soybean looper. **Biocontrol Science and Technology** 31:619-631.

Fuxa JR, Mitchell FL, Richter AR (1988) Resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lep.: Noctuidae) to a nuclear polyhedrosis virus in the field and laboratory. **Entomophaga** 33:55-63.

Gasque SN, van Oers MM, Ros VI (2019) Where the baculoviruses lead, the caterpillars follow: Baculovirus-induced alterations in caterpillar behaviour. **Current Opinion in Insect Science** 33:30-36.

Gilioli G, Sperandio G, Simonetto A, Ciampitti M, Gervasio P (2023) Assessing the risk of establishment and transient populations of *Spodoptera frugiperda* in Europe. **Journal of Pest Science** 96:1523-1537.

Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T (1997) Biological mediators of insect immunity. **Annual Review of Entomology** 42:611-643.

Goergen 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.

González-Santoyo I, Córdoba-Aguilar A (2012) Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 142:1-16.

González-Cabrera J, García M, Hernández-Crespo P, Farinós GP, Ortego F, Castañera P. Resistance to Bt maize in *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) is mediated by alteration in Cry1Ab protein activation (2013) **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 43:635-43.

Gordy JW, Leonard BR, Blouin D, Davis JA, Stout MJ (2015) Comparative effectiveness of potential elicitors of plant resistance against *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) in four crop plants. **PloS One** 10:e0136689.

Granados RR (1980) Infectivity and mode of action of baculoviruses. **Biotechnology and Bioengineering** 22:1377-1405.

Granados RR, Lawler KA (1981) In vivo pathway of *Autographa californica* baculovirus invasion and infection. **Virology** 108:297-308.

Gui F, Lan T, Zhao Y, Guo W, Dong Y, Fang D, Kang, L (2022) Genomic and transcriptomic analysis unveils population evolution and development of pesticide resistance in fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **Protein & Cell** 13:513-531.

Guo HF, Fang JC, Wang JP, Zhong WF, Liu BS (2007) Interaction of *Xestia c-nigrum* granulovirus with peritrophic matrix and *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus in *Spodoptera litura*. **Journal of Economic Entomology**, 100:20-25.

Guo J, Zhao J, He K, Zhang F, Wang Z (2018) Potential invasion of the crop-devastating insect pest fall armyworm *Spodoptera frugiperda* to China. **Plant Protection** 44:1-10.

Guo J, Wu S, Zhang F, Huang C, He K, Babendreier D, Wang Z (2020) Prospects for microbial control of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*: a review. **BioControl** 65:647-662.

Gupta AP (1985) Cellular elements in the hemolymph. **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology** 3:402-451.

Hafeez M, Li XW, Zhang JM, Zhang ZJ, Huang J, Wang LK, Lu YB (2021) Role of digestive protease enzymes and related genes in host plant adaptation of a polyphagous pest, *Spodoptera frugiperda*. **Insect Science** 28:611-626. (a)

Hafeez M, Li X, Ullah F, et al. (2021) Behavioral and physiological plasticity provides insights into molecular based adaptation mechanism to strain shift in *Spodoptera frugiperda*. **International Journal of Molecular Sciences** 22:10284. (b)

Harrison RL, Puttler, Popham HJ (2008) Genomic sequence analysis of a fast-killing isolate of *Spodoptera frugiperda* multiple nucleopolyhedrovirus. **Journal of General Virology** 89:775-790.

He L, Shi Y, Ding W, Huang H, He H, Xue J, Qiu L (2023) Cytochrome P450s genes CYP321A9 and CYP9A58 contribute to host plant adaptation in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. **Pest Management Science** 79:1783-1790.

Hemmati SA, Takalloo Z, Taghdir M, Mehrabadi M, Balalaei S, Moharramipour S, Sajedi RH (2021) The trypsin inhibitor pro-peptide induces toxic effects in Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 171:104730.

Hoffmann JA (1995) Innate immunity of insects. **Current Opinion in Immunology** 7:4-10.

Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway Jr CA, Ezekowitz RAB (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science** 284:1313-1318.

Hoover K, Yee JL, Schultz CM, Rocke DM, Hammock BD, Duffey SS (1998) Effects of plant identity and chemical constituents on the efficacy of a baculovirus against *Heliothis virescens*. **Journal of Chemical Ecology** 24:221-252.

Hoover K, Washburn JO, Volkman LE (2000) Midgut-based resistance of *Heliothis virescens* to baculovirus infection mediated by phytochemicals in cotton. **Journal of Insect Physiology** 46:999-1007.

Horikoshi RJ, Bernardi D, Bernardi O, Malaquias JB, Okuma DM, Miraldo LL, Amaral FSA, Omoto C (2016) Effective dominance of resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt maize and cotton varieties: implications for resistance management. **Scientific Reports** 6:34864.

Horikoshi RJ, Bernardi O, Amaral FSDA, Miraldo LL, Durigan MR, Bernardi D, Silva SS, Omoto C (2019) Lack of relevant cross-resistance to Bt insecticide XenTari in strains of *Spodoptera frugiperda* (JE Smith) resistant to Bt maize. **Journal of Invertebrate Pathology** 161:1-6.

Ikeda M, Yamada H, Hamajima R, Kobayashi M (2013) Baculovirus genes modulating intracellular innate antiviral immunity of lepidopteran insect cells. **Virology** 435:1-13.

Ismail SM (2020) Effect of sublethal doses of some insecticides and their role on detoxication enzymes and protein-content of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae). **Bulletin of the National Research Centre** 44:1-6.

Israni B, Wouters FC, Luck K, Seibel E, Ahn SJ, Paetz C, Vassão, DG (2020) The fall armyworm *Spodoptera frugiperda* utilizes specific UDP-glycosyltransferases to inactivate maize defensive benzoxazinoids. **Frontiers in Physiology** 11:604754.

James RR, Xu J (2012) Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. **Journal of Invertebrate Pathology** 109:175-182.

Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA, Rohrmann GF, Theilmann DA, Thiem SM, Vlak JM (2006) On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. **Archives of Virology** 151:1257-1266.

Jiang H, Wang Y, Ma C, Kanost MR (1997) Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit ProPO-P1. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 27:835-850.

Jiang L (2021) Insights into the antiviral pathways of the silkworm *Bombyx mori*. **Frontiers in Immunology** 12:639092.

Jing DP, Guo JF, Jiang YY, Zhao JZ, Sethi A, He KL, Wang ZY (2020) Initial detections and spread of invasive *Spodoptera frugiperda* in China and comparisons with other noctuid larvae in maizefields using molecular techniques. **Insect Science** 27:780-790.

Johnson SJ (1987) Migration and the life history strategy of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in the western hemisphere. **International Journal of Tropical Insect Science** 8(4-5-6):543-549.

Jolles P, Jolles J (1984) What's new in lysozyme research? Always a model system, today as yesterday. **Molecular and Cellular Biochemistry** 63:165-189.

Juárez ML, Murúa MG, García MG, Ontivero M, Vera MT, Vilardi JC, Groot AT, Castagnaro AP, Gastaminza G, Willink E (2012) Host association of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) maize and rice strains in Argentina, Brazil, and Paraguay. **Journal of Economic Entomology** 105:573-582.

Kanost MR, Gorman MJ (2008) Phenoloxidases in insect immunity. In: Beckage NE (Ed.) **Insect Immunology**. Amsterdam: Academic Press p. 69-96.

Karimzadeh J, Wright DJ (2008) Bottom-up cascading effects in a tritrophic system: interactions between plant quality and host-parasitoid immune responses. **Ecological Entomology** 33:45-52.

Kasten Jr. P, Precetti AACM, Parra JRP (1978) Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura** 53:68-78.

Keddie BA, Aponte GW, Volkman LE (1989) The pathway of infection of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus in an insect host. **Science** 243:1728-1730.

Kojour MAM, Han YS, Jo YH (2020) An overview of insect innate immunity. **Entomological Research** 50:282-291.

Lampert E (2012) Influences of plant traits on immune responses of specialist and generalist herbivores. **Insects** 3:573-592.

Lavine MD, Strand MR (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 32:1295-1309.

Lazarević J, Janković-Tomanić M (2015) Dietary and phylogenetic correlates of digestive trypsin activity in insect pests. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 157:123-151.

Lemaitre B, Hoffmann J (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annual Reviews Immunology** 25:697-743.

Li LF, Xu ZW, Liu NY, Wu GX, Ren XM, Zhu JY (2018) Parasitism and venom of ectoparasitoid *Scleroderma guani* impairs host cellular immunity. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 98:e21451.

Liu Y, Sui YP, Wang JX, Zhao XF (2009) Characterization of the trypsin-like protease (Ha-TLP2) constitutively expressed in the integument of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 72:74-87.

Lu A, Zhang Q, Zhang J, Yang B, Wu K, Xie W, Ling E (2014) Insect prophenoloxidase: the view beyond immunity. **Frontiers in Physiology** 5:252.

Lucas W, Knipe DM (2001) Viral capsids and envelopes: structure and function. **Encyclopedia of Life Science** 7.

Manachini B, Arizza V, Parrinello D, Parrinello N (2011) Hemocytes of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) and their response to *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology** 106:360-365.

Martinelli S, Barata RM, Zucchi MI, Silva-Filho MC, Omoto C (2006) Molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations associated to maize and cotton crops in Brazil. **Journal of Economic Entomology** 99:519-526.

Martinelli S, Clark PL, Zucchi MI, Silva-Filho MC, Foster JE, Omoto, C (2007). Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. **Bulletin of Entomological Research** 97:225-231.

Martignoni ME (1986) **A catalog of viral diseases of insects, mites, and ticks.** US Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station.

Mayer AM (2006) Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. **Phytochemistry** 67:2318-2331.

Meriño-Cabrera Y, Castro JGS, Diez JDR, Macedo MLR, de Oliveira Mendes T A, de Almeida Oliveira MG (2020) Rational design of mimetic peptides based on the interaction between *Inga laurina* inhibitor and trypsins for *Spodoptera cosmioides* pest control. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 122:103390.

Miller CV, Cotter SC (2018) Resistance and tolerance: The role of nutrients on pathogen dynamics and infection outcomes in an insect host. **Journal of Animal Ecology** 87:500-510.

Montezano DG, Specht A, Sosa-Gómez DR, Roque-Specht VF, Sousa-Silva JC, Paula-Moraes SD, Hunt TE (2018) Host plants of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas. **African Entomology** 26:286-300.

Montezano DG, Specht A, Sosa-Gómez DR, Roque-Specht VF, de Paula-Moraes SV, Peterson JA, Hunt TE (2019) Developmental parameters of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) immature stages under controlled and standardized conditions. **Journal of Agricultural Science** 11:76-89.

Monobrullah M, Shankar U (2008) Sub-lethal effects of Splt MNPV infection on developmental stages of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biocontrol Science and Technology** 18:431-437.

Moscardi F (1999) Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. **Annual Review of Entomology** 44:257-289.

Moto KI, Kojima H, Kurihara M, Iwami M, Matsumoto S (2003) Cell-specific expression of enhanced green fluorescence protein under the control of neuropeptide gene promoters in the brain of the silkworm, *Bombyx mori*, using *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus-derived vectors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 33:7-12.

Muchoney ND, Bowers MD, Carper AL, Mason PA, Teglas MB, Smilanich AM (2022) Use of an exotic host plant shifts immunity, chemical defense, and viral burden in wild populations of a specialist insect herbivore. **Ecology and Evolution** 12: e8723.

Muchoney ND, Bowers MD, Carper AL, Teglas MB, Smilanich AM (2023) Use of an exotic host plant reduces viral burden in a native insect herbivore. **Ecology Letters** 26:425-436.

Muhlía-Almazán A, Sánchez-Paz A, García-Carreño FL (2008) Invertebrate trypsins: a review. **Journal of Comparative Physiology B** 178:655-672.

Muraro DS, Giacomelli T, Stacke RF, Godoy DN, Marçon P, Popham HJ, Bernardi O (2018) Baseline susceptibility of Brazilian populations of *Chrysodeixis includens* (Lepidoptera: Noctuidae) to *C. includens* nucleopolyhedrovirus and diagnostic concentration for resistance monitoring. **Journal of Economic Entomology** 112:349-354.

Muraro DS, Garlet CG, Godoy DN, Cossa GE, Rodrigues Junior GLDS, Stacke RF, Bernardi O (2019) Laboratory and field survival of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on Bt and non-Bt maize and its susceptibility to insecticides. **Pest Management Science** 75:2202-2210.

Nagoshi RN, Meagher RL (2008) Review of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) genetic complexity and migration. **Florida Entomologist** 91:546-554.

Nagoshi RN, Rosas-García NM, Meagher RL, Fleischer SJ, Westbrook JK, Sappington TW, Murúa GM (2015) Haplotype profile comparisons between *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Mexico with those from Puerto Rico, South America, and the United States and their implications to migratory behavior. **Journal of Economic Entomology** 108:135-144.

Nagoshi RN, Goergen G, Tounou KA, Agboka K, Koffi D, Meagher RL (2018) Analysis of strain distribution, migratory potential, and invasion history of fall armyworm populations in northern Sub-Saharan Africa. **Scientific Reports** 8:1-10.

Nagoshi RN, Nagoshi BY, Cañarte E, Navarrete B, Solórzano R, Garcés-Carrera S (2019) Genetic characterization of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) in Ecuador and comparisons with regional populations identify likely migratory relationships. **PLoS One** 14:e0222332.

Nakazawa H, Tsuneishi E, Ponnuvel KM, Furukawa S, Asaoka A, Tanaka H, Ishibashi J, Yamakawa M (2004) Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against nucleopolyhedrovirus. **Virology** 321:154-62.

Nascimento ARBD, Fresia P, Cônsoli FL, Omoto C (2015) Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC Genomics** 16:1-12.

Noland JE, Breitenbach JE, Popham HJ, Hum-Musser SM, Vogel H, Musser RO (2013) Gut transcription in *Helicoverpa zea* is dynamically altered in response to baculovirus infection. **Insects** 4:506-520.

Okuma DM, Bernardi D, Horikoshi RJ, Bernardi O, Silva AP, Omoto C (2018). Inheritance and fitness costs of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) resistance to spinosad in Brazil. **Pest Management Science** 74:1441-1448.

Oliveira NC, Phelan L, Labate CA, Cônsoli FL (2022) Non-targeted metabolomics reveals differences in the gut metabolic profile of the fall armyworm strains when feeding different food sources. **Journal of Insect Physiology** 139:104400.

Oliveira NCD, Consoli FL (2023) Dysbiosis of the larval gut microbiota of *Spodoptera frugiperda* strains feeding on different host plants. **Symbiosis** 89:197-211.

Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Head GP (2016) Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science** 72:1727-1736.

O'Reilly DR (1997) Auxiliary genes of baculoviruses. **The Baculoviruses**. New York: Springer p.267-300.

Overton K, Maino JL, Day R, Umina PA, Bett B, Carnovale D, Ekesi S, Meagher R, Reynolds OL (2021) Global crop impacts, yield losses and action thresholds for fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*): A review. **Crop Protection** 145:105641.

Paredes-Sánchez FA, Rivera G, Bocanegra-García V, Martínez-Padrón HY, Berrones-Morales M, Niño-García N, Herrera-Mayorga V (2021) Advances in control strategies against *Spodoptera frugiperda*. A review. **Molecules** 26:5587.

Pandey A, Yadav R, Sanyal I (2022) Evaluating the pesticidal impact of plant protease inhibitors: lethal weaponry in the co-evolutionary battle. **Pest Management Science** 78:855-868.

Pashley, DP (1986). Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae): a sibling species complex? **Annals of the Entomological Society of America** 79:898-904.

Patil UR, Savanurmath CJ, Mathad SB, Aralaguppi PI, Ingalhalli SS (1989) Effects of nuclear polyhedrosis virus on the growth, development and reproduction in surviving generations of the armyworm *Mythimna (Pseudaletia) separata* (Walker). **Journal of Applied Entomology** 108:527-532.

Peng K, van Lent JW, Boeren S, Fang M, Theilmann DA, Erlandson MA, Vlak M, van Oers MM (2012) Characterization of novel components of the baculovirus *per os* infectivity factor complex. **Journal of Virology** 86:4981-4988.

Perelle AH, Harper JD (1986) An evaluation of the impact of sublethal dosages of nuclear polyhedrosis virus in larvae on pupae, adults, and adult progeny of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Journal of Invertebrate Pathology** 47:42-47.

Pérez-Hedo M, López C, Albajes R, Eizaguirre M (2012) Low susceptibility of non-target Lepidopteran maize pests to the Bt protein Cry1Ab. **Bulletin of Entomological Research** 102:737-743.

Petersen JM, Bézier A, Drezen JM, van Oers MM (2022) The naked truth: An updated review on nudiviruses and their relationship to bracoviruses and baculoviruses. **Journal of Invertebrate Pathology** 189:107718.

Pinto CPG, Azevedo EB, Santos ALZ, Cardoso CP, Fernandes FO, Rossi GD, Polanczyk, RA (2019) Immune response and susceptibility to *Cotesia flavipes* parasitizing *Diatraea saccharalis* larvae exposed to and surviving an LC₂₅ dosage of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology** 166:107209.

Pinto CP, Walker AA, Robinson SD, Chin YKY, King GF, Rossi GD (2021) Venom composition of the endoparasitoid wasp *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) and functional characterization of a major venom peptide. **Toxicon** 202:1-12.

Pogue MG (2002) A world revision of the genus *Spodoptera* Guenee (Lepidoptera: Noctuidae). **Memoirs of the American Entomological Society** 43:1-202.

Ponton F, Tan YX, Forster CC, Austin AJ, English S, Cotter SC, Wilson K (2023) The complex interactions between nutrition, immunity and infection in insects. **Journal of Experimental Biology** 226:jeb245714.

Price PW (1984) **Insect ecology**. New York: Wiley. 607 p.

Qi GJ, Ma J, Wan J, Ren YL, McKirdy S, Hu G, Zhang ZF (2021) Source regions of the first immigration of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) invading Australia. **Insects** 12:1104.

Qu Y, Xiao D, Li J, Chen Z, Biondi A, Desneux N, Song D (2015) Sublethal and hormesis effects of imidacloprid on the soybean aphid *Aphis glycines*. **Ecotoxicology** 24:479-487.

R Core Team (2023). *_R: A Language and Environment for Statistical Computing_*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>>.).

Rao R, Fiandra L, Giordana B, de Eguileor M, Congiu T, Burlini N, Aciello S, Corrado G, Pennacchio F (2004) AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 34:1205-1213.

Ribeiro C, Brehélin M (2006) Insect haemocytes: what type of cell is that? **Journal of Insect Physiology** 52:417-429.

Roy A, Walker III WB, Vogel H, Chattington S, Larsson MC, Anderson P, Schlyter F (2016) Diet dependent metabolic responses in three generalist insect herbivores *Spodoptera* spp. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 71:91-105.

RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

Saeed S, Sayyed AH, Ahmad I (2010) Effect of host plants on life-history traits of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pest Science** 83:165-172.

SAS Institute (2015) SAS/IML® 14.1 User`s guide. Cary: SAS Institute Inc.

Sait SM, Begon M, Thompson DJ (1994) The effects of a sublethal baculovirus infection in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. **Journal of Animal Ecology** 541-550.

Sarate PJ, Tamhane VA, Kotkar HM, Ratnakaran N, Susan N, Gupta VS, Giri A P (2012) Developmental and digestive flexibilities in the midgut of a polyphagous pest, the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Journal of Insect Science** 12:42.

Sauphanor B, Berling M, Toubon JF, Reyes M, Delnatte J (2006) Carpocapse des pommes cas de résistance au virus de la granulose en vergers biologiques: Fruits et légumes. **Phytoma, la Défense des Végétaux** 590:24-27.

Scholefield JA, Shikano I, Lowenberger CA, Cory JS (2019) The impact of baculovirus challenge on immunity: the effect of dose and time after infection. **Journal of Invertebrate Pathology** 167:107232.

Scriber JM, Slansky Jr F (1981) The nutritional ecology of immature insects. **Annual Review of Entomology** 26:183-211.

Sheehan G, Farrell G, Kavanagh K (2020) Immune priming: the secret weapon of the insect world. **Virulence** 11:238-246.

Shelby KS, Popham HJ (2006) Plasma phenoloxidase of the larval tobacco budworm, *Heliothis virescens*, is virucidal. **Journal of Insect Science**, 6:13.

Shikano I, Ericsson JD, Cory JS, Myers JH (2010) Indirect plant-mediated effects on insect immunity and disease resistance in a tritrophic system. **Basic and Applied Ecology** 11:15-22.

Sparks TC, Nauen R (2015) IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 121:122-128.

Silva IF, Baldin ELL, Specht A, Roque-Specht VF, Morando R, Malaquias JV, Paula-Moraes SV (2021) Role of nutritional composition in the development and survival of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) on artificial diet and natural hosts. **Bulletin of Entomological Research** 111:257-269.

Silva-Brandão KL, Peruchi A, Seraphim N, Murad NF, Carvalho RA, Farias JR, Brandao MM. (2018). Loci under selection and markers associated with host plant and host-related strains shape the genetic structure of Brazilian populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae). **PloS One** 13: e0197378.

Silveira EB, Cordeiro BA, Ribeiro BM, de Castro ME, Soares EF, Bão SN (2007) An *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus mutant, vApAg, induces hemocytes apoptosis in vivo and displays reduced infectivity in larvae of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Virus Research** 130: 182–192.

Singh AK, Mullick S (1997) Effect of leguminous plants on the growth and development of gram pod borer, *Helicoverpa armigera*. **Indian Journal of Entomology** 59:209-214.

Singh S, Singh A, Kumar S, Mittal P, Singh IK (2020) Protease inhibitors: recent advancement in its usage as a potential biocontrol agent for insect pest management. **Insect Science** 27:186-201.

Smilanich AM, Langus TC, Doan L, Dyer LA, Harrison JG, Hsueh J, Teglas MB (2018) Host plant associated enhancement of immunity and survival in virus infected caterpillars. **Journal of Invertebrate Pathology** 151:102-112.

Southwood TRE (1978) **Ecological methods**. London: Chapman & Hall. p. 391.

Sparks AN (1979). A review of the biology of the fall armyworm. **Florida Entomologist** 82-87.

Steinrauf LK, Shiuan D, Yang WJ, Chiang MY (1999) Lysozyme association with nucleic acids. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 266:366-370.

Stokstad E (2017) New crop pest takes Africa at lightning speed. **Science** 356:473-474.

Strand MR (2008) The insect cellular immune response. **Insect Science** 15:1-14.

Stuart LM, Ezekowitz RA (2008) Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly. **Nature Reviews Immunology** 8:131-141.

Summers MD (1971) Electron microscopic observations on granulosis virus entry, uncoating and replication processes during infection of the midgut cells of *Trichoplusia ni*. **Journal of Ultrastructure Research** 35:606-625.

Tay WT, Meagher Jr RL, Czepak C, Groot AT (2023) *Spodoptera frugiperda*: ecology, evolution, and management options of an invasive species. **Annual Review of Entomology** 68: 299-317.

Teng ZW, Xu G, Gan SY, Chen X, Fang Q, Ye GY (2016) Effects of the endoparasitoid *Cotesia chilonis* (Hymenoptera: Braconidae) parasitism, venom, and calyx fluid on cellular and humoral immunity of its host *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae) larvae. **Journal of Insect Physiology** 85:46-56.

Terra WR, Ferreira C (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry** 109:1-62.

Terra WR, Ferreira C (2009) Digestive system. In: Resh VH, Cardé RT (Eds.) **Encyclopedia of Insects**. San Diego, CA: Academic Press, p. 273-281.

Terra WR, Ferreira C, Silva CP (2023) Overview of Insect Midgut Function. In **Molecular Physiology and Evolution of Insect Digestive Systems**. Cham: Springer International Publishing, p.13-26.

Thayappan K, Denis M, Ramasamy SM, Munusamy A (2017) Hemocytes and hemocytic responses in the mole crab *Emerita emeritus* (Linnaeus 1767). **Journal of Invertebrate Pathology** 148:129-137.

Thézé J, Takatsuka J, Nakai M, Arif M, EA Herniou EA (2015) Gene acquisition convergence between entomopoxviruses and baculoviruses. **Viruses** 7:1960-1974.

Theilmann DA, Blissard GW, Boning B, Jehle JA, O'reilly DR, Rohrmann GF, Vlak JM (2005) Baculoviridae. In Virus Taxonomy, **Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier/Academic Press p. 177-185.

Tian X, Fang X, Huang JQ, Wang LJ, Mao YB, Chen XY (2019) A gossypol biosynthetic intermediate disturbs plant defence response. **Philosophical Transactions of the Royal Society B** 374:20180319.

Toprak U, Erlandson M, Hegedus DD (2010) Peritrophic matrix proteins. **Trends in Entomology** 6:23-51.

Toprak U, Harris S, Baldwin D, Theilmann D, Gillott C, Hegedus DD, Erlandson MA (2012) Role of enhancin in *Mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus virulence: selective degradation of host peritrophic matrix proteins. **Journal of General Virology** 93:744-753.

Trudeau D, Washburn JO, Volkman LE (2001) Central role of hemocytes in *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. **Journal of Virology** 75: 996-1003.

Truzzi CC, Vieira NF, De Souza JM, De Bortoli SA (2021) Artificial diets with different protein levels for rearing *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Science** 21:2.

Valicente FH, Tuelher ES (2009) **Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, com Baculovírus**. Sete Lagoas: EMBRAPA, CNPMS. 14 p. (Circular Técnica, 114).

Vasconcelos SD, Cory JS, Wilson KR, Sait SM, Hails RS (1996) Modified behavior in baculovirus-infected lepidopteran larvae and its impact on the spatial distribution of inoculum. **Biological Control** 7:299-306.

Vilmos P, Kurucz E (1998) Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. **Immunology Letters** 62:59-66.

Vogelweith F, Thiery D, Quaglietti B, Moret Y, Moreau J (2011) Host plant variation plastically impacts different traits of the immune system of a phytophagous insect. **Functional Ecology** 25:1241-1247.

Vogelweith F, Moreau J, Thiéry D, Moret Y (2015) Food-mediated modulation of immunity in a phytophagous insect: An effect of nutrition rather than parasitic contamination. **Journal of Insect Physiology** 77:55-61.

Volkman LE, Summers MD (1977) *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: comparative infectivity of the occluded, alkali-liberated, and nonoccluded forms. **Journal of Invertebrate Pathology** 30:102-3.

Volp, TM, Zalucki MP, Furlong MJ (2022) What defines a host? Oviposition behavior and larval performance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on five putative host plants. **Journal of Economic Entomology** 115:1744-1751.

Wagner W, Möhrle F, Schnetter W (2002) Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 32:803-14.

Waldbauer GP (1968) The consumption and utilization of food by insects. **Advances in insect physiology** 5:229-288.

Wang JY, Zhang H, Siemann E, Ji XY, Chen YJ, Wang Y, Wan NF (2019) Immunity of an insect herbivore to an entomovirus is affected by different host plants. **Pest Management Science** 76:1004-1010.

Wang JY, Fan NN, Siemann E, Jiang JX, Wan NF (2021) Plant-mediated effects on life history traits of entomovirus infected caterpillars of *Spodoptera exigua*. **Journal of Applied Entomology** 145:567-574. (a)

Wang JY, Zhang H, Siemann E, Fan NN, Ji XY, Chen YJ, Wan NF (2021) Plants impact cellular immunity of caterpillars to an entomovirus. **Pest Management Science** 77:2415-2424. (b)

Washburn JO, Haas-Stapleton EJ, Tan FF, Beckage NE, Volkman LE (2000) Co-infection of *Manduca sexta* larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* M Nucleopolyhedrovirus. **Journal of Insect Physiology** 46:179-190.

Williams T, Bergoin M, van Oers MM (2017) Diversity of large DNA viruses of invertebrates. **Journal of Invertebrate Pathology** 147:4-22.

Wu ML, Ye GY, Zhu JY, Chen XX, Hu C. (2008). Isolation and characterization of an immunosuppressive protein from venom of the pupa-specific endoparasitoid *Pteromalus puparum*. **Journal of Invertebrate Pathology** 99:186-191.

Wu K, Yang B, Huang W, Dobens L, Song H, Ling E (2016) Gut immunity in Lepidopteran insects. **Developmental & Comparative Immunology** 64:65-74.

Wu HM, Feng HL, Wang GD, Zhang LL, Zulu L, Liu YH, Rao Q (2022) Sublethal effects of three insecticides on development and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Agronomy**12:1334.

Xiao H, Ye X, Xu H, Mei Y, Yang Y, Chen X, Li F (2020) The genetic adaptations of fall armyworm *Spodoptera frugiperda* facilitated its rapid global dispersal and invasion. **Molecular Ecology Resources** 20:1050-1068.

Xu C, Zhang Z, Cui K, Zhao Y, Han J, Liu F, Mu W (2016) Effects of sublethal concentrations of cyantraniliprole on the development, fecundity and nutritional physiology of the black cutworm *Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae). **PLoS One** 11:e0156555.

Yang F, Kerns DL, Brown S, Kurtz R, Dennehy T, Braxton B, Head G, Huang F (2015) Performance and cross-crop resistance of Cry1F maize selected *Spodoptera frugiperda* on transgenic Bt cotton: implications for resistance management. **Scientific Reports** 6:1-7.

Yi HY, Chowdhury M, Huang YD, Yu XQ (2014) Insect antimicrobial peptides and their applications. **Applied Microbiology and Biotechnology** 98:5807-5822

Yu SJ, Nguyen SN, Abo-Elghar GE (2003). Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (JE Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology** 77:1-11.

Yuan C, Xing L, Wang M, Wang X, Yin M, Wang Q, Zou Z. (2017). Inhibition of melanization by serpin-5 and serpin-9 promotes baculovirus infection in cotton bollworm *Helicoverpa armigera*. **PLoS Pathogens** 13: e1006645.

Zhang W, Tettamanti G, Bassal T, Heryanto C, Eleftherianos I, Mohamed A (2021) Regulators and signalling in insect antimicrobial innate immunity: Functional molecules and cellular pathways. **Cellular Signalling** 83:110003.

Zhao M, Yuan X, Wei J, Zhang W, Wang B, Myint Khaing M, Liang G (2017) Functional roles of cadherin, aminopeptidase-N and alkaline phosphatase from *Helicoverpa armigera* (Hübner) in the action mechanism of *Bacillus thuringiensis* Cry2Aa. **Scientific Reports** 7:46555.

Zhao L, Niu J, Feng D, Wang X, Zhang R (2023) Immune functions of pattern recognition receptors in Lepidoptera. **Frontiers in Immunology** 14:1203061.