

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

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

ANA SILVIA GIMENES GARCIA

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Carvalho dos Santos

Co-Orientador: Prof. Dr. Elton Luiz Scudeler

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

**BOTUCATU – SP
2021**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Garcia, Ana Silvia Gimenes.

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

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

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

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

Agradecimientos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

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

Resumo

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

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

Abstract

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

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

1. Introdução

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

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

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

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

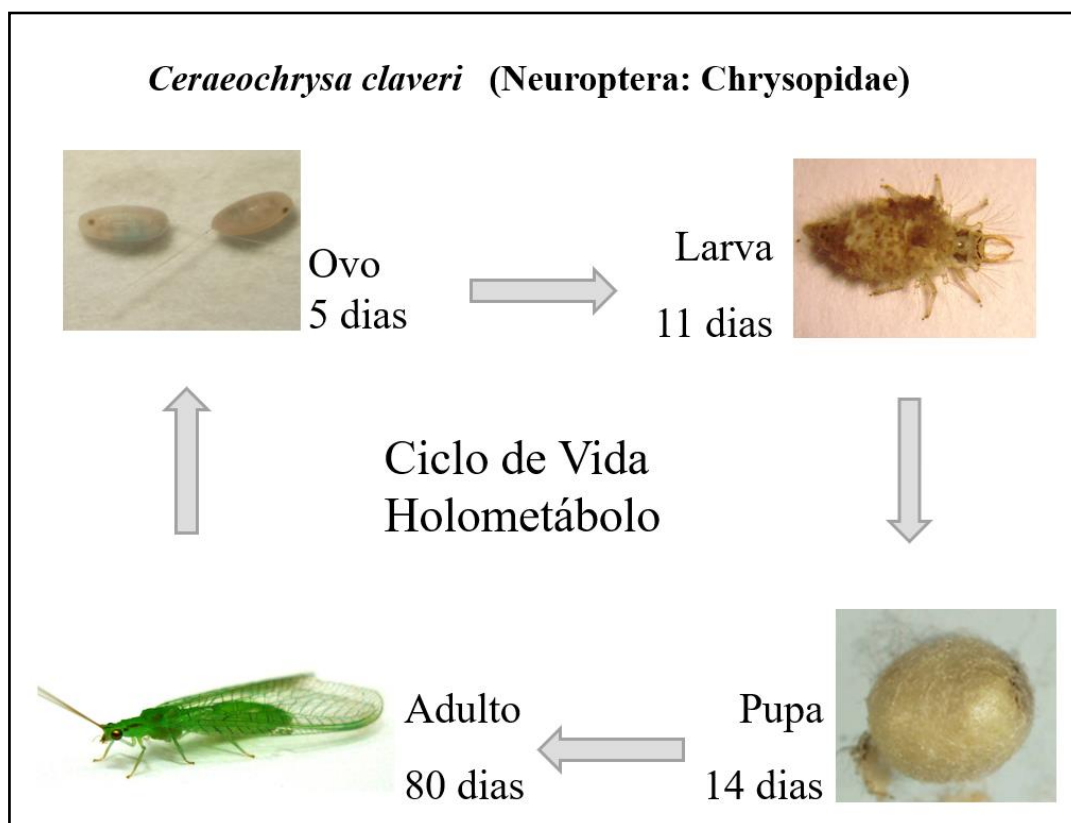


Figura 1. Esquema representando o ciclo de vida de *Ceraeochrysa claveri* e a duração dos estágios de desenvolvimento.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. Objetivos

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do biopesticida azadiractina e do inseticida sintético piriproxifem nos testículos de insetos adultos de *Ceraeochrysa claveri* do seguinte modo:

- Diferenças morfológicas e ultraestruturais nos testículos de insetos adultos;
- Avaliação do número de ovos provenientes do cruzamento entre machos tratados e fêmeas não tratadas (fecundidade);
- Avaliação da fertilidade dos ovos provenientes do cruzamento entre machos tratados e fêmeas não tratadas;
- Identificação dos genes diferencialmente expressos nos testículos após exposição aos inseticidas.

3. Referências

- Abdel-Rahman, A.G.; El-Sayed, A.K.; Laila, S.H.; Imam, A.I. Histological alternations in male testis of *Pectinophora gossypiella* (S.) adults induced by treating larvae with neem formulations. **1° Arab Conference of Applied Biological Pest Control**, Cairo, Egypt, 5-7: 171p, 2004.
- Adnan, S.M.; Uddin, M.M.; Alam, M.J.; Islam, M.S.; Kashem, M.A.; Rafii, M.Y.; Latif, M.A. Management of mango hopper, *Idioscopus clypealis*, using chemical insecticides and neem oil. **The Scientific World Journal**, 2014: 1-5, 2014.
- Anders, S.; McCarthy, D.J.; Chen, Y.; Okoniewski, M.; Smyth, G.K.; Huber, W.; Robinson, M.D. Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. **Nature Protocols**, 8(9): 1765-1786, 2013.
- Anders, S.; Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biology**, 11:1-12, 2010.
- Aribi, N.; Oulhaci, M.C.; Kilani-Morakchi, S.; Sandoz, J.C.; Kaiser, L.; Denis, B.; Joly, D. Azadirachtin impact on mate choice, female sexual receptivity and male activity in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 143: 95-101, 2017.
- Benelli, G.; Conti, B.; Garreffa, R.; Nicoletti, M. Shedding light on bioactivity of botanical by-products: neem cake compounds deter oviposition of the arbovirus vector *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in the field. **Parasitol Res**, 113:933-940, 2014.
- Bernardi, D.; Botton, M.; Cunha, U.S.; Bernardi, O.; Malausa, T.; Garcia, M.S.; Nava, D.E. Effects of azadirachtin on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and its compatibility with predatory mites (Acari: Phytoseiidae) on strawberry. **Pest Management Science**, 69: 75-80, 2013.
- Bezerra, C.E.S.; Nogueira, C.H.F.; Sombra, K.D.S.; Demartelaere, A.C.F.; Araujo, E.L. Crisopídeos (Neuroptera: Chrysopidae): aspectos biológicos, potencial de utilização e perspectivas futuras. **Caatinga** (Mossoró,Brasil), 22(3): 01-05, 2009.
- Biondi, A.; Desneux, N.; Siscaro, G.; Zappalà, L. Using organic-certified rather than synthetic pesticides may not be safer for biological control agents: Selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator *Orius laevigatus*. **Chemosphere**, 87(7): 803-812, 2012.
- Boina, D.R.; Rogers, M.E.; Wang, N.; Stelinski, L.L. Effect of pyriproxyfen, a juvenile hormone mimic, on egg hatch, nymph development, adult emergence and reproduction of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. **Pest Management Science**, 66: 349-357, 2010.

- Canard, M.; Principi, M.M. Development of Chrysopidae. In Canard, M.; Sèmèria, Y.; New, T.R. (Eds.) **Biology of Chrysopidae**. The Hague: Dr. W. Junk Publishers, p. 57-75, 1984.
- Celestino, D.; Braoios, G.I.; Ramos, R.S.; Gontijo, L.M.; Guedes, R.N.C. Azadirachtin-mediated reproductive response of the predatory pirate bug *Blaptostethus pallescens*. **BioControl**, 59: 697-705, 2014.
- Chapman, R.F. **The Insects: Structure and Function**, 4th edn. London, Hodder & Stoughton, 788p, 1998.
- Chen, J.; Ye, X.; Wang, J.; Xia, B.; Xin, T. Transcriptome analysis of *Tetranychus cinnabarinus* responses to exposure of an insecticide (diflubenzuron). **Systematic & Applied Acarology**, 25(7): 1329–1342, 2020.
- Chen, T.Y.; Liu, T.X. Susceptibility of immature stages of *Chrysoperla rufilabris* (Neurop., Chrysopidae) to pyriproxyfen, a juvenile hormone analog. **Journal of Applied Entomology**, 126: 125–129, 2002.
- Chen, X.D.; Neupane, S.; Gill, T.A.; Gossett, H.; Pelz-Stelinski, K.S.; Stelinski, L.L. Comparative transcriptome analysis of thiamethoxam susceptible and resistant Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), using RNA-sequencing. **Insect Science**, 00: 1–13, 2021.
- Cloyd, R.A.; Dickinson, A. Effect of insecticides on mealybug destroyer (Coleoptera: Coccinellidae) and parasitoid *Leptomastix dactylopii* (Hymenoptera: Encyrtidae), natural enemies of citrus mealybug (Homoptera: Pseudococcidae). **Journal of Economic Entomology**, 99(5): 1596-1604, 2006.
- Coats, J.R. Risks from natural versus synthetic insecticides. **Annual Review of Entomology**, 39: 489-515, 1994.
- Correia, A.A.; Wanderley-Teixeira, V.; Teixeira, A.A.C.; Oliveira, J.V.; Gonçalves, G.G.A.; Cavalcanti, M.G.S.; Brayner, F.A.; Alves, L.C. Microscopic analysis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) embryonic development before and after treatment with Azadirachtin, Lufenuron, and Deltamethrin. **Journal of Economic Entomology**, 106(2): 747-755. 2013.
- Fernandez, F.C.; Cruz-Landim, C.; Malaspina, O. Influence of the insecticide pyriproxyfen on the flight muscle differentiation of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Microscopy Research and Technique**, 75: 844–848, 2012.
- Fogel, M.N.; Schneider, M.I.; Rimoldi, F.; Ladux, L.S.; Desneux, N.; Ronco, A.E. Toxicity assessment of four insecticides with different modes of action on pupae and adults of

- Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae), a relevant predator of the Neotropical Region. **Environmental Science and Pollution Research**, 23:14918–14926, 2016.
- Freitas, S. O uso de crisopídeos no controle biológico de pragas. In: **Controle Biológico no Brasil: parasitóides e predadores**. Parra, J. R. P. *et al.* São Paulo: Manole, cap. 13, p. 209-224, 2002.
- Gao, S.; Xiong, W.; Wei, L.; Liu, J.; Liu, X.; Xie, J.; Song, X.; Bi, J.; Li, B. Transcriptome profiling analysis reveals the role of latrophilin in controlling development, reproduction and insecticide susceptibility in *Tribolium castaneum*. **Genetica**, 146: 287-302, 2018.
- Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S., Carvalho, R.P.L.; Batista, G.C.; Berti Filho, E.; Parra, J.R.P.; Zucchi, R.A.; Alves, S.B.; Vendramim, J.D.; Marchini, L.C.; Lopes, J.R.S.; Omoto, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, v. 10, 2002.
- Garcia, A.S.G.; Scudeler, E.L.; Pinheiro, P.F.F.; Santos, D.C. Can exposure to neem oil affect the spermatogenesis of predator *Ceraeochrysa claveri*? **Protoplasma**, 256: 693-701, 2019.
- Gepp, J. Morphology and anatomy of the preimaginal stages of Chrysopidae: a short survey. In: **Biology of Chrysopidae**. Canard, M.; Séméria, Y.; New, T.R. The Hague: Dr. W. Junk Publishers, p. 9-19, 1984.
- Ginjunpalli, G.K.; Baldwin, W.S. The time- and age-dependent effects of the juvenile hormone analog pesticide, pyriproxyfen on *Daphnia magna* reproduction. **Chemosphere**, 92: 1260–1266, 2013.
- Gullan, P.J. **Os insetos: um resumo de entomologia**. São Paulo: Roca, 2007.
- He, F.; Sun, S.; Sun, X.; Ji, S.; Li, X.; Zhang, J.; Jiang, X. Effects of insect growth-regulator insecticides on the immature stages of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 164: 665-674, 2018.
- Ishaaya, I.; Barazani, A.; Kontsedalov, S.; Horowitz, A.R. Insecticides with novel modes of action: Mechanism, selectivity and cross-resistance. **Entomological Research**, 37: 148–152, 2007.
- Ishaaya, I.; De Cock, A.; Degheele, D. Pyriproxyfen, a potent suppressor of egg hatch and adult formation of the greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). **Physiology, Toxicology, and Biochemistry**, 87(5): 1185-1189, 1994.
- Isman, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, 51: 45-66, 2006.
- Jonsson, M.; Wratten, S.D.; Landis, D.A.; Gurr, G.M. Recent advances in conservation biological control of arthropods by arthropods. **Biological Control**, 45:172–175, 2008.

- Klowden, M.J. **Physiological Systems in Insects**. Second Edition, University of Idaho Moscow, Idaho, 203-214, 2007.
- Linton, Y.M.; Nisbet, A.J.; Mordue (Luntz), A.J. The effects of azadirachtin on the testes of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.). **Journal of Insect Physiology**, 43(11): 1077-1084, 1997.
- Liu, Y.; Qi, M.; Chi, Y.; Wuriyanghan, H. De Novo Assembly of the Transcriptome for Oriental Armyworm *Mythimna separata* (Lepidoptera: Noctuidae) and Analysis on Insecticide Resistance-Related Genes. **Journal of Insect Science**, 16(1): 92; 1–8, 2016.
- Mansoor, M.M.; Raza, A.B.M.; Abbas, N.; Aqueel, M.A.; Afzal, M. Resistance of green lacewing, *Chrysoperla carnea* Stephens to nitenpyram: Cross-resistance patterns, mechanism, stability, and realized heritability. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 135: 59-63, 2017.
- Mansoor, M.M.; Shad, S.A. Resistance of green lacewing, *Chrysoperla carnea* (Stephens), to buprofezin: Cross resistance patterns, preliminary mechanism and realized heritability. **Biological Control**, 129:123–127, 2019.
- Medina, P.; Smagghe, G.; Budia, F.; Tirry, L.; Viñuela, E. Toxicity and absorption of Azadirachtin, Diflubenzuron, Pyriproxyfen, and Tebufenozide after Topical Application in predatory larvae of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). **Environmental Entomology**, 32(1): 196-203, 2003.
- Meng, X.; Zhang, N.; Yang, X.; Miao, L.; Jiang, H.; Ji, C.; Xu, B.; Qian, K.; Wang, J. Sublethal effects of chlorantraniliprole on molting hormone levels and mRNA expressions of three Halloween genes in the rice stem borer, *Chilo suppressalis*. **Chemosphere**, 238: 1-7, 2020.
- Merlin, B.L.; Cônsoli, F.L. Regulation of the larval transcriptome of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) by maternal and other factors of the parasitoid *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae). **Frontiers in Physiology**, 10:1-19, 2019.
- Mordue (Luntz), A.J.; Morgan, E.D.; Nisbet, A.J. Azadirachtin, a natural product in insect control. **Comprehensive Molecular Insect Science**, 6: 117-135, 2005.
- Mordue (Luntz), A.J.; Blackwell, A. Azadirachtin: an update. **Journal of Insect Physiology**, 39: 903-924, 1993.
- Nascimento, A.R.B.; Fresia, P.; Cônsoli, F.L.; Omoto, C. Comparative transcriptome analysis of lufenuron-resistant and susceptible strains of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC Genomics**, 16:1-12, 2015.

- Ono, É.K.; Zanardi, O.Z.; Aguiar Santos, K.F.; Yamamoto, P.T. Susceptibility of *Ceraeochrysa cubana* larvae and adults to six insect growth-regulator insecticides. **Chemosphere**, 168: 49-57, 2017.
- Oppenheim, S.J.; Baker, R.H.; Simon, S.; Desalle, R. We can't all be supermodels: the value of comparative transcriptomics to the study of non-model insects. **Insect Molecular Biology**, 24(2): 139–154, 2015.
- Oulhaci, C.M.; Denis, B.; Kilani-Morakchi, S.; Sandoz, J.C.; Kaiser, L.; Joly, D.; Aribi, N. Azadirachtin effects on mating success, gametic abnormalities and progeny survival in *Drosophila melanogaster* (Diptera). **Pest Management Science**, 74: 174–180, 2018.
- Pappas, M.L.; Broufas, G.D.; Koveos, D.S. Chrysopid predators and their role in biological control. **Journal of Entomology**, 8(3): 301–326, 2011.
- Pathan, A.K.; Sayyed, A.H.; Aslam, M.; Razaq, M.; Jilani, G.; Saleem, M.A. Evidence of field-evolved resistance to organophosphates and pyrethroids in *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). **Journal of Economic Entomology**, 101:1676–1684, 2008.
- Ridgeway, J.A.; Timm, A.E. Comparison of RNA isolation methods from insect larvae. **Journal of Insect Science**, 14:1-5, 2014.
- Roubos, C.R.; Rodríguez-Saona, C.; Isaacs, R. Mitigating the effects of insecticides on arthropod biological control at field and landscape scales. **Biological Control**, 75:28–38, 2014.
- Rugno, G.R.; Zanardi, O.Z.; Cuervo, J.B.; Morais, M.R.; Yamamoto, P.T. Impact of insect growth regulators on the predator *Ceraeochrysa cincta* (Schneider) (Neuroptera: Chrysopidae). **Ecotoxicology**, 25: 940-949, 2016.
- Rugno, G.R.; Zanardi, O.Z.; Yamamoto, P.T. Are the pupae and eggs of the lacewing *Ceraeochrysa cubana* (Neuroptera: Chrysopidae) tolerant to insecticides? **Journal of Economic Entomology**, 108: 2630-2639, 2015.
- Sayyed, A.H.; Pathan, A.K.; Faheem, U. Cross-resistance, genetics and stability of resistance to deltamethrin in a population of *Chrysoperla carnea* from Multan, Pakistan. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 98:325–332, 2010.
- Schmutterer, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, 35: 271-297, 1990.
- Schuster, S.C. Next-generation sequencing transforms today's biology. **Nature Methods**, 5: 16-18, 2008.

- Scudeler, E.L.; Garcia, A.S.G.; Padovani, C.R.; Santos, D.C. Action of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on cocoon spinning in *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 97: 176–182, 2013.
- Shimizu, T. Suppressive effects of azadirachtin on spermiogenesis of the diapausing cabbage army worm, *Mamestra brassicae*, *in vitro*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 46: 197-199, 1988.
- Sohail, M.; Khan, S.S.; Muhammad, R.; Soomro, Q.A.; Asif, M.U.; Solangi, B.K. Impact of insect growth regulators on biology and behavior of *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). **Ecotoxicology**, 28: 1115–1125, 2019.
- Tayade, D.V. Effect of phytochemical azadirachtin on the morphology and cytology of the testis follicle of the Indian grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. **Bioscience Discovery**, 3(1): 79-81, 2012.
- Wei, N.; Zhong, Y.; Lin, L.; Xie, M.; Zhang, G.; Su, W.; Li, C.; Chen, H. Transcriptome Analysis and Identification of Insecticide Tolerance-Related Genes after Exposure to Insecticide in *Sitobion avenae*. **Genes**, 10: 1-18, 2019.
- Wu, G.; Miyata, T. Susceptibilities to methamidophos and enzymatic characteristics in 18 species of pest insects and their natural enemies in crucifer vegetable crops. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 82: 79–93, 2005.

4. Resultados

Os resultados obtidos estão apresentados na forma de artigos científicos, que serão submetidos à revistas especializadas. Os artigos foram denominados como Capítulo 1 e 2.

Capítulo 1: Impact of ingestion of Azadirachtin and Pyriproxyfen on reproduction of male insects of the natural enemy *Ceraeochrysa claveri*

Capítulo 2: Genes diferencialmente expressos nos testículos de *Ceraeochrysa claveri* em resposta aos inseticidas Azadiractina e Piriproxifem

CAPÍTULO 1

Impact of ingestion of Azadirachtin and Pyriproxyfen in male insects of the natural enemy *Ceraeochrysa claveri*

Ana Silvia Gimenes Garcia^{a,*}, Aime Giovanna Pereira^a, Carlos Roberto Padovani^b, Elton Luiz Scudeler^a, Daniela Carvalho dos Santos^a

^aLaboratory of Insects, Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP - São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil.

^bDepartment of Biostatistics, Plant Biology, Parasitology and Zoology, Institute of Biosciences of Botucatu, UNESP - São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil.

Abstract

The great demand for sustainable agriculture has brought interest in new pest control methodologies, including compatibility between natural enemies, such as *Ceraeochrysa claveri* and insecticides, both natural and synthetic. Within this panorama, the objective of this work was to evaluate the effect of the intake of Azadirachtin and Pyriproxyfen on the reproduction of males of *C. claveri*. For this, morphological analyzes were used in light and transmission electron microscopy, confocal microscopy, in addition to statistical analysis of the life cycle, fecundity and fertility of treated insects. The results showed that both insecticides caused few morphological changes in the testes, such as spacing between the cysts, in addition to changes in the tunic that covers it. The treated groups showed no changes in the markings on actin filaments and microtubules, as well as in the statistical analyzes, where there was only a reduction in fecundity, but maintaining the viability of the generated individuals. These results indicate that these insecticides could be suitable for use in management programs aimed at conserving and increasing the population of natural enemies. However, further studies should be carried out to assess the compatibility of these insecticides with *C. claveri* in field conditions.

Keywords: biopesticide; green lacewing; morphology; testes; ultrastructure.

Introduction

Ceraeochrysa claveri is an insect belonging to the family Chrysopidae, where the larvae are predators and can be used in the biological control of pest insects, thereby minimizing the use of insecticides that harm the environment. Due to its predatory efficiency, wide prey variety and high productive potential, *C. claveri* is considered one of the most effective agents for controlling agricultural pests (Canard et al., 1984; Freitas; Penny, 2001; Pappas et al., 2011; Scudeler; Santos, 2013).

Integrated Pest Management (IPM) recommends the use of selective products that preserve natural enemies. Therefore, knowledge about the effects of pesticides on beneficial organisms is indispensable, since the exclusive use of biological control may not be sufficient to control pest-insect populations (Chen; Liu, 2002; Medina et al., 2003; Cloyd; Dickinson, 2006; Jonsson et al., 2008), whereas the selection of those that can be used in conjunction is considered crucial (Roubos et al., 2014).

The search for alternative control methods includes the utilization of natural products that are generally less harmful to the environment, among which plant-based insecticides stand out (Adnan et al., 2014; Celestino et al., 2014). Azadirachtin was one of the first active components to be isolated from the neem tree, and proved to be the main ingredient in combating insects, acting by contact or ingestion (Schmutterer, 1990; Medina et al., 2003; Isman, 2006). This molecule interferes with the endocrine system by damaging the juvenile hormone (JH) and 20-hydroxyecdysone pathways, which are involved in the regulation of many physiological functions, leading to deleterious effects on development and reproduction, such as anti-feeding effect, growth reduction, inhibition of ecdysis, reduction of fertility and longevity of adults, sterilization, inhibition of oviposition, mortality and repellency (Mordue (Luntz); Blackwell, 1993; Coats, 1994; Mordue (Luntz) et al., 2005; Isman, 2006; Bernardi et al., 2013; Correia et al., 2013; Adnan et al., 2014; Aribi et al., 2017; Oulhaci et al., 2018).

Studies have also been performed to assess the compatibility of synthetic insecticides with predatory insects, including some species of Chrysopidae (Medina et al., 2003; Cloyd; Dickinson, 2006). The majority of studies mainly assess lethal effects, but these insecticides are capable of provoking a variety of sublethal effects such as changes in growth, larval development and reproduction, in addition to biological parameters such as fecundity, fertility and longevity (Chen; Liu 2002; Cloyd; Dickinson, 2006; Desneux et al., 2007; Biondi et al., 2012; Fogel et al., 2016; Ono et al., 2017; He et al., 2018; Sohail et al., 2019; Jindra; Bittova 2020).

Among the utilized synthetic insecticides that mimic the juvenile hormone, we highlight Pyriproxyfen, which provokes imbalance in the levels of this hormone in the insect, resulting in strong suppression of embryogenesis, metamorphosis, adult formation and sterility in many pest insects (Boina et al., 2010; Fernandez et al., 2012). It is widely used in control of the whiteflies, mealybugs and in programs for cotton crop management (Ishaaya et al., 1994; 2007).

The effects of both insecticides on target insects are well known, especially those related to their life cycle and reproduction, due to the objective of creating effective strategies to control these pests. However, the natural enemies that are found in these ecosystems / environments or that comprise part of Integrated Pest Management also suffer from the actions of these insecticides, so that knowing the effects of these products on these individuals and in particular, on their reproduction, is extremely important for maintenance of these species, ensuring a more sustainable agriculture.

Considering the economic importance of *C. claveri* in agriculture and in Integrated Pest Management, this work aims to evaluate the effect of the biopesticide azadirachtin and the synthetic insecticide pyriproxyfen on this natural enemy. Based on morphological, ultrastructural and molecular analyses of the testes of this insect, we intend to evaluate the effect of the ingestion of azadirachtin and pyriproxyfen on this organ, as well as to assess the fecundity of females and the fertility of eggs originating from the crossing between control females and treated males.

Material and Methods

Insects

The present study utilized recently hatched *C. claveri* larvae, obtained from a colony maintained at the Insects Laboratory at the Biosciences Institute of UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil. The insect colony and the bioassays were maintained in a growth chamber under controlled environmental conditions: temperature, $25 \pm 1^\circ\text{C}$; relative humidity, $70 \pm 10\%$; and photoperiod, 12:12 h (light / dark). Larvae of *C. claveri* were fed *ad libitum* eggs of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) until the formation of pupae. The adults were raised on an artificial diet composed of honey and brewer's yeast (1:1, v:v). The *D. saccharalis* eggs were supplied by CETMA Comércio de Agentes para Controle Biológico, Lençóis Paulista, São Paulo state, Brazil.

Bioassays

Larvae of recently hatched *C. claveri* were fed *ad libitum* eggs of *D. saccharalis* treated with two concentrations of each insecticide tested. For azadirachtin, the commercial formulation Azamax® (UPL do Brasil – Indústria e Comércio de Insumos Agropecuários S.A., Ituverava-SP, Brazil) was used, diluted in distilled water at the concentrations 12 and 36mg of active ingredient (a.i.) L⁻¹, while Pyriproxyfen was used in its commercial formulation Tiger 100 EC® (Sumitomo Chemical do Brasil Representações Ltda, São Paulo, Brazil) diluted at the concentrations 50 and 100mg a.i. L⁻¹. The commercial formulations used in this study, as well as their dosages, were selected from the records at the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA, 2020), with the lowest and highest dosages of each product being chosen according to the crop in which the presence of chrysopids has been recorded.

The *C. claveri* larvae were randomly divided into four experimental groups (n= 30 per group), and each experimental group comprised five replicates. The insects were individualized in polyethylene pots and fed *D. saccharalis* eggs that had been treated with the insecticides cited above, through the immersion technique for 5 seconds, and dried at room temperature (Scudeler; Santos, 2013). The treated eggs were supplied *ad libitum* and changed every three days. The control larvae were fed eggs immersed only in distilled water for 5 seconds and dried at room temperature. The experimental groups were conducted under the same environmental conditions described for the raising of insects.

Data on mortality and duration of the larval and pupal stages until the emergence of adults in each experimental group were collected daily. Newly emerged adults from each experimental group were placed in polyethylene pots and fed an artificial diet as previously described. After this, only adult males aged 10 days were utilized in morphological analyses of testes.

Light Microscopy

The specimens were cooled for 30 seconds before being dissected using saline solution for insects (0.1M NaCl; 0.1M Na₂HPO₄; 0.1M KH₂PO₄). The testes were collected (n= 10 per group) and fixed in Karnovsky's solution (4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.3)) for 24 hours. After initial fixation, the material was subjected to the technique of embedding in methacrylate-glycol (historesin), undergoing dehydration in ethyl alcohol (70-95%) and imbibition in resin (Leica Historesin Embedding Kit, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) according to the manufacturer's instructions. Next,

3 μm sections were made using a Leica RM 2045 microtome, and subsequently subjected to Hematoxylin and Eosin (HE) staining (Pearse, 1972) for analysis of general organ morphology, using a Leica DM 500 optical microscope with the LAS EZ digital image capture system.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

The testes of all groups (n= 5 per group) were processed according to the routine protocol of the Electron Microscopy Center of IBB, UNESP. The biological samples were fixed in Karnovsky's solution for 24 hours, post-fixed in osmium tetroxide 1% in the same buffer for 2 hours, dehydrated in an increasing sequence of acetone solutions and embedded in Araldite resin. Ultrathin sections were contrasted in uranyl acetate and lead citrate and examined in a TECNAI Transmission Electron Microscope, from the FEI Company.

Confocal Laser Microscopy

After initial fixation of the testes in 2% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer for 24h, the material was subjected to the following protocol: washing in PBS buffer with Triton X-100, blocking nonspecific reactions with Protein Block, incubation in anti- β -Tubulin-FITC antibody incubation (Sigma-Aldrich®), overnight in 1:100 dilution. After this step, the material was washed with PBS and incubated with Phalloidin-TRITC (Sigma-Aldrich®) in a 1:1000 dilution for 3 hours. Slides were prepared with mounting medium containing DAPI to identify the nuclei. The material was observed and analyzed using a Leica TCS SP5 II Spectral Confocal Microscope. After capturing the images, the fluorescence intensity of each experimental group was quantified (10 individuals per experimental group for phalloidin; 5 fields of 10 individuals per experimental group for tubulin), using the software LAS AF. The same were evaluated statistically by non-parametric analysis of variance for the model with one factor, complemented with the test of Dunn (Zar, 2009), considering a 5% significance level.

Analysis of life cycle, fecundity and fertility

To verify possible alterations in fecundity and fertility provoked by ingestion of azadirachtin and pyriproxyfen after the emergence of adults, couples were formed with control females and males from the control and treated groups. These couples were individualized in plastic boxes and fed a diet based on brewer's yeast and honey (1:1). For each treatment, 15 repetitions were carried out, with each repetition being comprised of one

couple. The couples were evaluated daily to determine the fecundity that corresponds to the number of eggs per female, and to assess fertility, the viability of the postures was observed. For this analyzes, the Kruskal-Wallis nonparametric variance analysis technique was used, complemented with Dunn's multiple comparison test (Zar, 2009). For the viability was used the parametric technique of analysis of variance for the one-factor model (Zar, 2009).

Furthermore, data on the life cycle of insects from the larval phase to the emergence of adults was also analyzed, collecting data daily throughout the cycle of 100 individuals for each experimental group. For the analyzes, we used the technique of nonparametric analysis of variance for the two-factor model complemented with Dunn's multiple comparison test (Zar, 2009).

The cumulative distribution of deaths in the study groups was evaluated by means of the Goodman test (Goodman, 1964) involving contrasts between and within the binomial populations. For all analyses, a significance level of 5% was considered.

Results

Histological observations revealed that the *C. claveri* adults present one pair of testes in a spiral format (Fig. 1A) disposed laterally to the alimentary canal, lined by a cellular tunic that covers them internally and externally. The inner layer of the tunic presents cells with flattened cytoplasm and nucleus, while the outer tunic has slightly more rounded cells (Figs. 1B and C). Each testis is also covered by a layer of whitish perivisceral fat body (Figs. 1D, I and L), formed by a compact mass of cells.

Spermatogenesis in *C. claveri* occurs in the apical-basal direction and the sperm cells are grouped into cysts with different stages of development. In each cyst, all germ cells are at the same stage of spermatogenesis. Cysts are formed by a cystic cell, whose function is to secrete the envelope that forms it and to maintain its nutrients. The cysts found have four stages of maturation, divided into spermatogonia, spermatocytes (Fig. 2B), spermatids (Figs. 1B and C) and spermatozoa (Fig. 1C).

The ultrastructural analyses revealed that the testes of *C. claveri* adults at 10 days of age present, in the great majority, cysts containing spermatids and spermatozoa, in different sectioning planes (Figs. 2A and B), where we were able to identify the slightly elongated nucleus and the region of the flagellum composed of an axoneme, whose array of microtubules is 9+9+2, in addition to two mitochondrial derivatives that surround it.

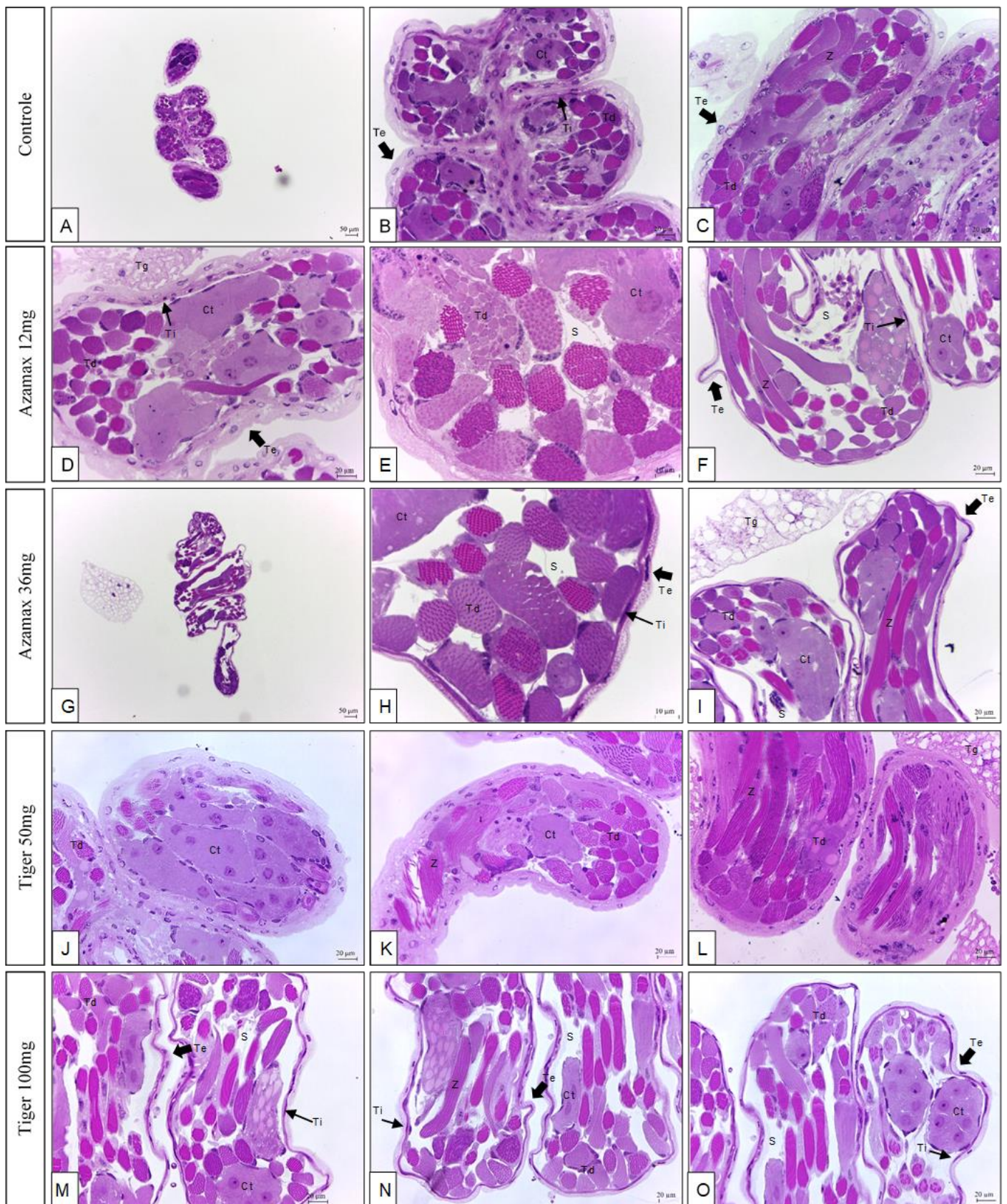


Figure 1: Sections analyzed under light microscopy stained with hematoxylin and eosin. **A-C.** Control group. Overview of the testes with a spiral shape, internal (Ti) and external (Te) tunic, and cysts containing spermatocytes (Ct), spermatids (Td) and spermatozoa (Z). **D-F.** Treatment with 12mg of azadirachtin. Spermatocytes, spermatids and spermatozoa cysts, internal and external tunic, and discreet spacing between the cysts (S). **G-I.** Treatment with 36mg of azadirachtin. Overview of the testes showing evident spacing, internal and external tunic showing deformities, spacing and cysts containing spermatocytes, spermatids and spermatozoa. **J-L.** Treatment with pyriproxyfen 50mg. Cells of the internal and external tunic showing normal morphology, as well as spermatocytes, spermatids and spermatozoa cysts that are also normal. **M-O.** Treatment with pyriproxyfen 100mg. Cells of the internal and external tunic showing deformities, as well as large spacing between spermatocytes, spermatids and spermatozoa cysts. Fat body (Tg).

In the groups treated with both insecticides and at the highest concentrations employed, we observed by light microscopy that the tunic undergoes a narrowing of the cells in its outer layer, flattening of the nuclei in the inner layer, and an irregular shape, as shown in figures 1H -I after treatment with 36mg of azadirachtin, and in figures 1M-O after treatment with 100mg of pyriproxyfen. These alterations were also observed through Transmission Electron Microscopy at the pyriproxyfen dose of 100mg (Fig. 2F). Cysts containing early stages of development (spermatogonia and spermatocytes) are observed at a slightly greater frequency than in the control group in all treatments (Figs. 1D and 1I, representing treatment with azadirachtin; 1J and 1O for pyriproxyfen treatment), besides narrow spacing between them (Figs. 1E-I for azadirachtin and 1M-O for pyriproxyfen). Through electron microscopy, we observed a greater amount of spermatids (Fig. 2C) and narrow spacing between the cysts (Figs. 2D) in the treatment with azadirachtin, when compared to the control group.

Through the immunocytochemical analysis of the testes, it was possible to obtain information on the presence and location of actin filaments (Phalloidin-TRITC) and of microtubules (Anti- β -Tubulin) in the control and treated groups. Actin filaments are found preferentially in the regions of the cellular tunic (Fig. 3A-B) and around less developed spermatogenic cysts (spermatogonia and spermatocyte cysts) (Fig. 3A-B). Yet in the treated groups, we found no change in the location of the actin filaments, as displayed in figures 3C-D (12mg and 36mg of azadirachtin) and 3E-F (50mg and 100mg of pyriproxyfen), with positive markings on the cellular tunic and around the cysts. For quantitative analyses, none of the treated groups showed statistical differences in the intensity of these stainings (Table 1).

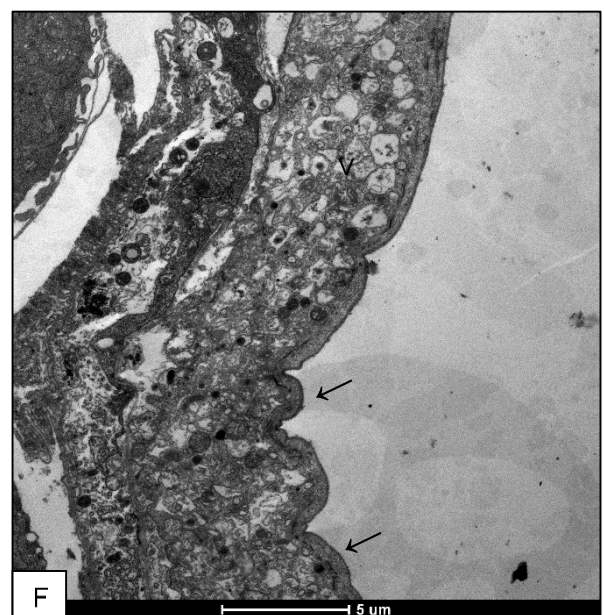
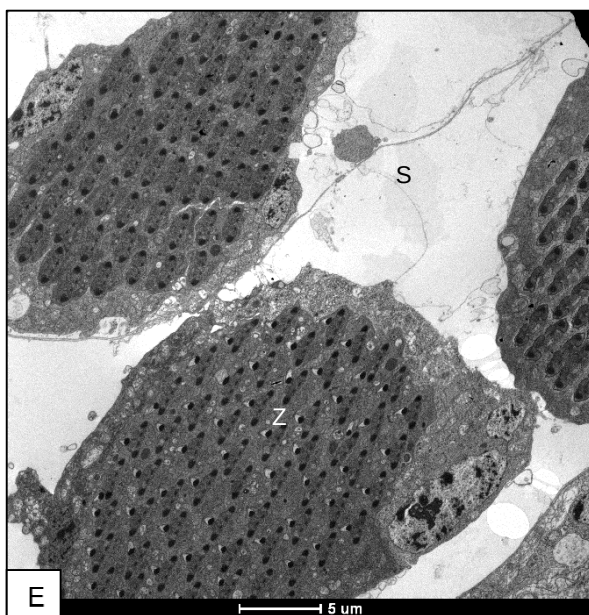
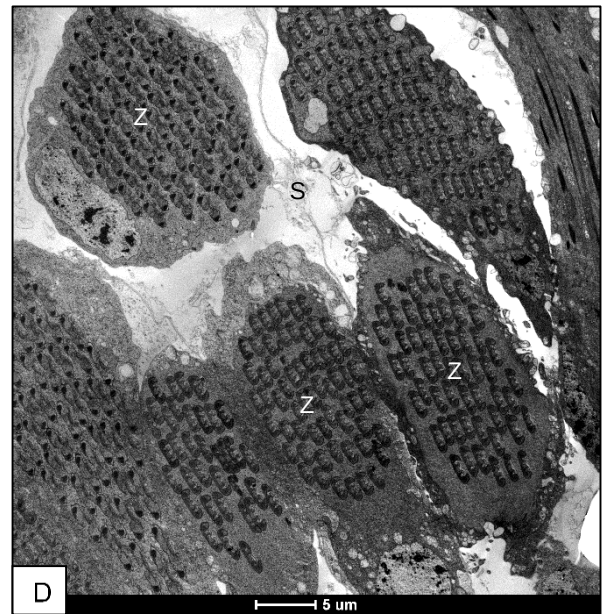
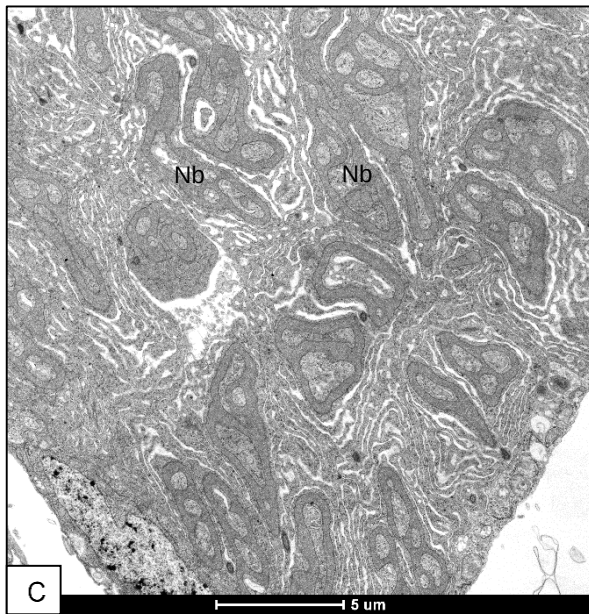
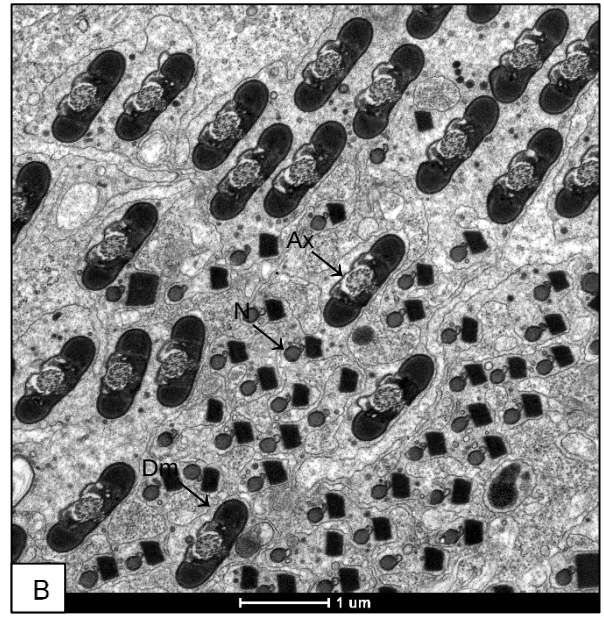
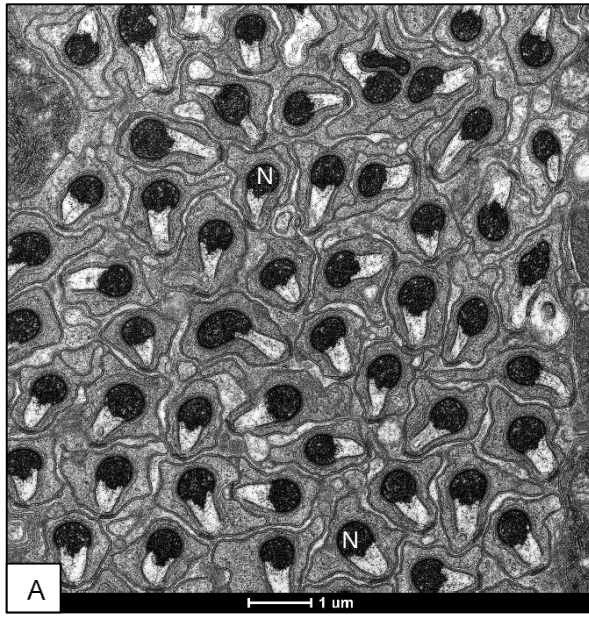


Figure 2: Photomicrographs in Transmission Electron Microscope. **A.** Region of nucleus (N) of spermatids from control group. **B.** B. Spermatozoa from the control group, presenting axoneme (Ax), mitochondrial derivatives (Dm) and nucleus. **C.** Beginning of nebenkern formation (Nb) in an insect treated with 12mg of azadirachtin. **D.** Spacing (S) between spermatozoa cysts (Z) under treatment with 12mg of azadirachtin. **E.** Treatment with 36mg of azadirachtin leading to spacing between spermatozoa cysts. **F.** Irregularities in the external tunic (arrows) of an insect treated with 100mg of pyriproxyfen, in addition to vacuolization of the cytoplasm (V).

Table 1. Marking intensity values (median [minimum; maximum value]) of actin filaments (Phalloidin) and microtubules (Tubulin) in the control groups, treated with 12mg and 36mg of azadirachtin and 50mg and 100mg of pyriproxyfen.

Variable	Phalloidin	Tubulin
Control	4,43 (1,28; 17,26)	33,63 (8,07;70,16)
12mg	4,76 (1,83; 10,99)	36,69 (25,88; 40,91)
36mg	5,24 (3,89; 8,93)	33,49 (17,88; 65,90)
50mg	4,19 (1,62; 11,63)	36,54 (15,10; 49,52)
100mg	5,37 (3,65; 10,11)	33,63 (19,51; 58,03)

The microtubules are found preferentially in regions where it is possible to visualize a large number of sperm bundles, in addition to staining in regions of spermatids, where microtubules are already present in the axoneme organization. In the control group images, the spermatozoa exhibit a highly elongated head region (marked in blue), and a tail (marked in green) about 2/3 the length of the head (Figs. 4A and B). The treated groups can be observed in figures 4C and 4D for azadirachtin treatments of 12 and 36mg, and in figures 4E-F, for doses of 50 and 100mg of pyriproxyfen, without preventing differences from the control group. In the quantitative analyses, we also did not observe significant differences at any insecticide dose when compared to the control.

The results of the analysis of the life cycle of larvae and pupae showed statistical differences only during the second and third larval instars, where only the 36mg group showed an increase in the number of days (from 4 to 5 days), while in the 3rd instar the two groups treated with pyriproxyfen showed an increase in phase duration (6 days). No statistical differences were observed in the 1st instar, with 4 days in duration, and phases of pre-pupa and pupa, with an average duration of 4 and 9 days, respectively (Table 2).

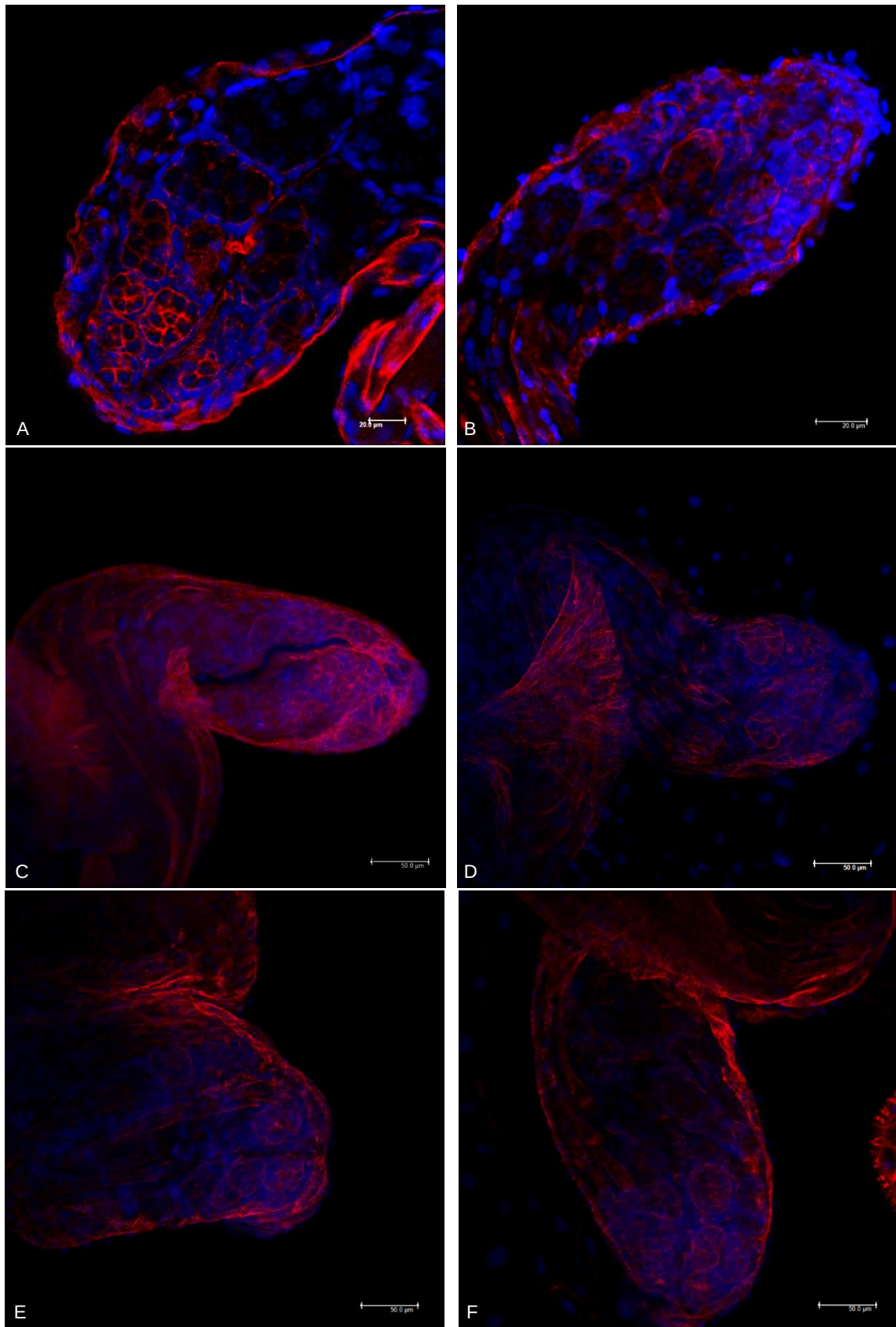


Figure 3: A-F. Actin filaments marked in red by Phalloidin-TRITC, positive mainly in the cell tunic and around the spermatogonia cysts. Nucleus marked in blue by DAPI. **A-B.** Control group. **C-D.** Groups treated with azadirachtin 12mg e 36mg, respectively. **E-F.** Treatments with 50mg e 100mg of pyriproxyfen, respectively.

Table 2. Duration of the life cycle (days) according to experimental groups and stage of development. [Median (minimum; maximum value)].

Group	Development time (days)				
	1° instar	2° instar	3° instar	Pre-pupa	Pupa
Control	4 (1;7) a	4 (3;7) a	5 (4;7) a	4 (3;5) a	9 (7;11) a
12mg	4 (1;8) a	4 (3;8) a	5 (3;8) a	4 (3;5) a	9 (8;10) a
36mg	4 (1;12) a	5 (3;9) b	5 (4;13) a	4 (3;7) a	9 (8;11) a
50mg	4 (1;8) a	4 (3;10) a	6 (4;13) b	4 (3;7) a	9 (8;11) a
100mg	4 (1;10) a	4 (2;7) a	6 (1;13) b	4 (2;6) a	9 (7;13) a

Different letters indicate a significant difference ($p < 0,05$).

In relation to the same groups, accumulated mortality was also analyzed. All experimental groups differed statistically from the control group, but did not differ from each other, obtaining the following data: control group 9%; 12mg 27%; 36mg 33%; 50mg 32% and 100mg 30% (Table 3).

Table 3. Mortality (%) of *C. claveri* treated with azadirachtin and pyriproxyfen during development until pupae stage.

Group	Mortality
Control	9% a
12mg	27 % b
36mg	33 % b
50mg	32 % b
100mg	30 % b

Percentages followed by different letters are significantly different. ($p < 0.05$, Goodman test)

For the adult phase, the mean fecundity and fertility values were analyzed in the 15 couples of the control and treated groups, in addition to the longevity of control females and treated males and duration of pre-oviposition and oviposition periods, the results of which are shown in Table 4. These analyses assessed couples formed by males who received treatment with the insecticides and females of the untreated control group. According to the results, adult longevity did not differ between groups, even in males, where insects received

treatment. For the fertility analyzes, we obtained statistical difference in all experimental groups, when compared to the control, in the number of eggs per couple, with an average of 501 eggs in the control group, decreasing to less than 306 eggs in the experimental groups; consequently, the number of emerged larvae was also lower, with 417 larvae in the control and decreasing to a maximum of 220 larvae in the treatments (Table 4). Despite the fact that fecundity decreased in the treated groups, fertility was not altered, even though the data showed a reduction from 82% in the control group, to 72% and 71% in the groups treated with azadirachtin (12mg and 36mg respectively) and 71% and 70% in the groups treated with 50mg and 100mg of pyriproxyfen (Table 4), these results being significantly the same. For the periods of pre-oviposition and oviposition, we did not obtain statistical differences.

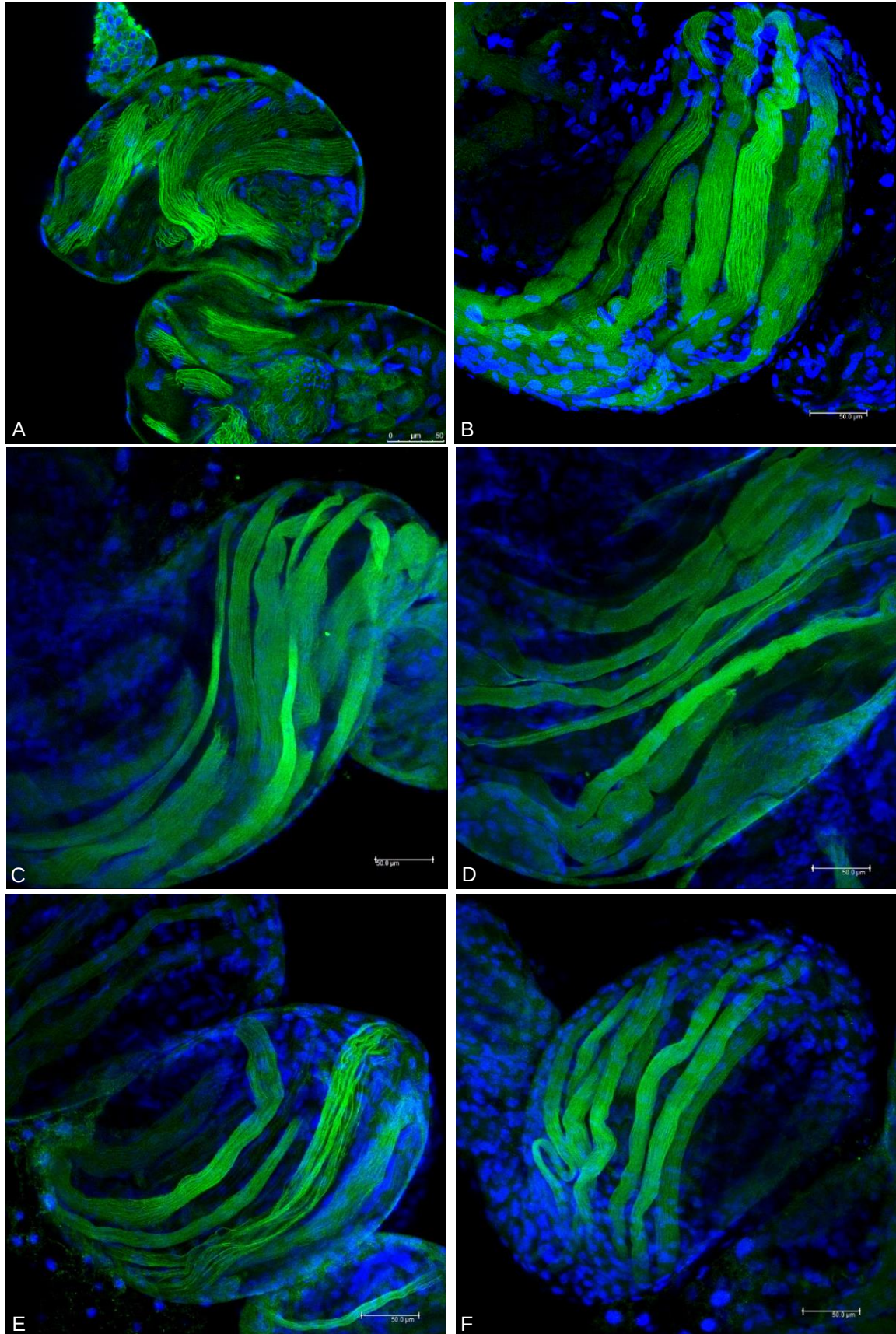


Figure 4: A-F. Microtubules marked in green by antibody anti β -tubulin (FITC), located in spermatozoa flagellum. Nucleus stained in blue by DAPI. **A-B.** Control group. **C-D.** Groups treated with azadirachtin 12mg e 36mg, respectively. **E-F.** Treatments with 50mg e 100mg of pyriproxyfen, respectively.

Table 4. Longevity of females and males (days), number of eggs per couple, number of larvae emerged, eggs viability (%), pre-oviposition and oviposition period (days) of *C. claveri* treated with azadirachtin and pyriproxyfen (mean $\pm$ SD).

Variable	Grupo					p-value
	Control	12mg	36mg	50mg	100mg	
Female	63,5 $\pm$ 23,9	60,8 $\pm$ 10,5	58,2 $\pm$ 9,3	54,1 $\pm$ 13,6	56,7 $\pm$ 11,2	p>0,05
Male	63,9 $\pm$ 16,9	68,3 $\pm$ 14,9	59,1 $\pm$ 22,6	57,8 $\pm$ 15,8	64,8 $\pm$ 9,7	p>0,05
Eggs	501 $\pm$ 122,6b	298,1 $\pm$ 120,7a	306,4 $\pm$ 147,2a	259,8 $\pm$ 131,4a	303,5 $\pm$ 106,8a	p<0,05
Larvae	416,9 $\pm$ 124,4b	216,1 $\pm$ 98,2a	220,1 $\pm$ 129,7a	181,8 $\pm$ 96,4a	211,9 $\pm$ 93,6a	p<0,05
Viability	82,4 $\pm$ 10,1	71,6 $\pm$ 7,5	71,2 $\pm$ 17,9	70,5 $\pm$ 9,5	70,1 $\pm$ 18,8	p>0,05
Pre oviposition	12,0 $\pm$ 1,1	13,9 $\pm$ 3,4	12,1 $\pm$ 3,3	11,5 $\pm$ 5,9	13,1 $\pm$ 3,9	p>0,05
Oviposition	31,5 $\pm$ 10,3	32,7 $\pm$ 17,1	26,1 $\pm$ 12,1	23,2 $\pm$ 8,9	22,9 $\pm$ 8,2	p>0,05

Means followed by different letters were significantly different. (p<0.05, Kruskal-Wallis; Dunn's test)

Discussion

It is known that pyriproxyfen acts mainly by blocking the metamorphosis of larvae into adulthood, in addition to affecting reproduction, reducing fecundity and fertility, as indicated in several studies on both pests and natural enemies (Chen; Liu, 2002; Cloyd; Dickinson, 2006; Boina et al., 2010; Gijupalli; Baldwin, 2013; Fogel et al., 2016; Ono et al., 2017; He et al., 2018; Sohail et al., 2019; Jindra; Bittova, 2020). The lack of studies demonstrating morphological alterations in the testes provoked by this insecticide leads us to believe that these effects are similar to those caused by the use of azadirachtin, due to the similarity of the results found on both in this study. The toxic effects of azadirachtin, in turn, have been reported in several investigations involving the development stages of insects, including the effects of exposure of this insecticide during the egg phase (Ahmad et al., 2003; Giolo et al., 2009; Rugno et al., 2015), development of larvae (Qi et al., 2001; Tomé et al., 2013; Garzón et al., 2015; Ono et al., 2017), pupal phase (Giolo et al., 2009; Scudeler et al., 2013; Ono et al., 2017; Francesena; Schneider, 2018) and emergence of adults (Garzón et al., 2015; Ono et al., 2017; Francesena; Schneider, 2018). Effects on the male reproductive system have also been reported, such as the action of azadirachtin on the testicular membranes

(Shimizu, 1988; Nisbet et al., 1995), inhibition of the formation of cysts around the spermatogonia, decreased number of cysts, disintegration and degeneration of germ cells, such as spermatogonia, spermatocytes, spermatids and spermatozoa and disorganized sperm bundles (Nisbet et al., 1996; Linton et al., 1997; Desneux et al., 2007; Ghazawi et al., 2007; Tayade, 2012; Vivekananthan et al., 2014; Oulhaci et al., 2018), corroborating the results obtained in this work on *C. claveri*.

The actin cytoskeleton plays important roles during the development and functioning of a differentiated cell. It acts by establishing the shape of the cell, contributes to cellular movements, such as muscle contraction, cell migration, transport of vesicles and organelles, in addition to being present in cell-cell junctions (Anuradha et al., 2007; Xiao; Yang, 2007) . It is known that the cells of the spermatogenic cysts are interconnected by ring canals that originate from the incomplete cytokinesis that occurs during the mitotic division of the spermatogonia, forming a contractile ring made up of several proteins, including actin, and allows communication between the germ cells of the cyst and the sharing of cytoplasmic constituents, by synchronizing, for example, subsequent mitotic and meiotic cell divisions (Hime et al., 1996; Greenbaum et al., 2011; Haglund et al., 2011; Eikenes et al., 2013; Eikenes et al., 2015). Similar organization of cysts, with the presence of the ring canals, is common in diverse insects and has already been described in many studies of different insect species (Cruz-Landim, 2001; Paccagnini et al., 2010; de Cuevas; Matunis, 2011; Viscuso et al., 2012; Ott et al., 2015), which is in line with the results obtained in the present work.

Works related to the membrane of testes have reported alterations caused by insecticides, such as disintegration of the testicular epithelium and vacuolization of the cytoplasm (Ghazawi et al., 2007; Tayade, 2012). Kumar et al. (2007), in a study carried out *in silico*, demonstrated that azadirachtin can interact directly with β -actin, affecting the polymerization-depolymerization cycle of actin. Yet Anuradha et al. (2007) reported in *D. melanogaster* the induction of actin depolymerization, leading cells to apoptosis, suggesting that actin is probably a target of azadirachtin activity. However, in *C. claveri*, despite the slight morphological alterations detected in the cellular tunic, there was no change in the presence and / or location of the actin filaments in these cells when subjected to treatment with both insecticides.

It is known that tubulin is the main component of the cytoskeleton in the flagellar axoneme of most animals. The axoneme presents a pair of central microtubules, nine pairs of peripheral microtubules and nine accessory microtubules ($9 + 9 + 2$) (Phillips, 1970). In addition to the axoneme, manchette microtubules are also described, which, according to

Dumser (1980), are a grouping of microtubules that form a cylindrical structure, the manchette, which helps to lengthen the spermatid. As the stretching cytoplasm reaches the axoneme microtubules, the manchette microtubules dissociate. This type of organization occurs in several species of insects, including *C. claveri*, as previously described by Garcia et al. (2019) (Zizzari et al., 2008; Gracielle et al., 2009; Zizzari et al., 2010; Name et al., 2012; Paoli et al., 2013; Viscuso et al., 2016). Nisbet et al., (1996) indicate a preference for binding azadirachtin in testes of insects submitted to insecticide treatment on the axoneme, causing a decrease in the sperm motility of the grasshopper *Schistocerca gregaria*. Other studies have described the degeneration and disorganization of the sperm bundles (Ghazawi et al., 2007; Tayade, 2012; Vivekananthan et al., 2014; Oulhaci et al., 2018; Garcia et al., 2019). However, according to the results obtained for *C. claveri*, none of the groups presented a statistical difference in the microtubule staining, leading to the hypothesis that there are no alterations in the formation of spermatozoa.

Several authors have reported the effects of azadirachtin and pyriproxyfen on the life cycle of natural enemies. Herein, we highlight works carried out on insects of the same order as *C. claveri*, such as *Ceraeochrysa cubana*, *Chrysoperla carnea*, *Chrysoperla rufilabris* and other natural enemies, including *Orius laevigatus*, *Cotesia plutellae* and *Diadromus collaris*, whose results were compatible with those found in our study, where both insecticides caused little damage in the development, survival / longevity or reproduction of these insects, and is thus considered harmless to these species of natural enemies, and suitable, according to the authors, for use in Integrated Pest Management programs (Medina et al., 2002; Charleston et al., 2005; Biondi et al., 2012; Rugno et al., 2015; Fogel et al., 2016; Rugno et al., 2016; Cremonez et al., 2017; Ono et al., 2017; Sohail et al., 2019).

The mortality rate in natural enemies caused by exposure to azadirachtin has also been studied by some researchers. According to Bernardi et al. (2013), azadirachtin did not cause significant mortality to the mite predators *Neoseiulus californicus* and *Phytoseiulus macropilis*, or to *O. laevigatus*, as reported by Biondi et al. (2012). Although the literature still questions the safety of insecticides of botanical origin to non-target insects, it is clear that the effects on these insects are less aggressive than on pests. This was corroborated by Scudeler et al. (2019), who reported 6.7% mortality in the natural enemy *C. claveri* versus 40% in the pest *Spodoptera eridania*. However, studies using pyriproxyfen indicate an increase in mortality from exposed natural enemies, ranging from 26% mortality in *Eriopsis connexa* (Fogel et al., 2016) to 100% in *C. cubana* (Ono et al., 2017), depending on the dose and the type of exposure. Our results showed an increase in mortality in all groups tested,

however, the values between treatments did not differ, with 27% and 33% mortality for treatments with azadirachtin, and 32% and 30% mortality in treatments with pyriproxyfen.

In relation to fecundity and fertility, several studies have been carried out on predators and pests, showing quite different results between these groups of insects. In works performed on natural enemies exposed to azadirachtin, the authors reported that this insecticide does not affect the reproduction of these insects, causing little or even no change in fecundity and / or fertility (Medina et al., 2004; Charleston et al., 2005; Biondi et al., 2012; Bernardi et al., 2013; Rugno et al., 2015). Yet these effects appear to have a greater impact on pests, with significant diminutions of fecundity and fertility (Bernardi et al., 2013; Benelli et al., 2017; Oulhaci et al., 2018). The same occurs in individuals exposed to pyriproxyfen, where non-target insects showed low toxicity while pests are more affected (Medina et al., 2002; Boina et al., 2010; Rugno et al., 2015; Rugno et al., 2016; He et al., 2018). This low toxicity can be attributed to the rapid excretion of these compounds by individuals of the order Neuroptera, as suggested by Rugno et al. (2016), and indicated in a study by Medina et al. (2003), where the insecticide was excreted by the insects within 48 hours after treatment with pyriproxyfen. As with the results found in our study, all treatments showed a decrease in the number of eggs, however, fertility showed no significant difference compared to the control, with viability above 70% in all treated groups. This decrease in number of eggs may have occurred due to the reproductive behavior that the chrysopids have, where the females select their partners in order to obtain success in the transmission of the genes, producing viable and apt descendants (Henry; Busher, 1987).

Although all treatments have affected *C. claveri* survival and reproductive parameters in some way, we conclude that the compatibility of these insects with azadirachtin and pyriproxyfen can still be beneficial in an integrated pest management program, since the treated insects have high reproductive viability. However, field studies are needed to assess such compatibility in MIP programs.

References

- Adnan, S.M.; Uddin, M.M.; Alam, M.J.; Islam, M.S.; Kashem, M.A.; Rafii, M.Y.; Latif, M.A. Management of mango hopper, *Idioscopus clypealis*, using chemical insecticides and neem oil. **The Scientific World Journal**, 2014: 1-5, 2014.
- Ahmad, M.; Oßiewatsch, H.R.; Basedow, T. Effects of neem-treated aphids as food/hosts on their predators and parasitoids. **Journal of Applied Entomology**, 127: 458-464, 2003.

- Anuradha, A.; Annadurai, R.S.; Shashidhara, L.S. Actin cytoskeleton as a putative target of the neem limonoid Azadirachtin A. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 37: 627-634, 2007.
- Aribi, N.; Oulhaci, M.C.; Kilani-Morakchi, S.; Sandoz, J.C.; Kaiser, L.; Denis, B.; Joly, D. Azadirachtin impact on mate choice, female sexual receptivity and male activity in *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 143: 95-101, 2017.
- Benelli, G.; Canale, A.; Toniolo, C.; Higuchi, A.; Murugan, K.; Pavela, R.; Nicoletti, M. Neem (*Azadirachta indica*): towards the ideal insecticide? **Natural Product Research**, 31: 369-386, 2017.
- Bernardi, D.; Botton, M.; Cunha, U.S.; Bernardi, O.; Malausa, T.; Garcia, M.S.; Nava, D.E. Effects of azadirachtin on *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and its compatibility with predatory mites (Acari: Phytoseiidae) on strawberry. **Pest Management Science**, 69: 75-80, 2013.
- Biondi, A.; Desneux, N.; Siscaro, G.; Zappalà, L. Using organic-certified rather than synthetic pesticides may not be safer for biological control agents: Selectivity and side effects of 14 pesticides on the predator *Orius laevis*. **Chemosphere**, 87: 803-812, 2012.
- Boina, D.R.; Rogers, M.E.; Wang, N.; Stelinski, L.L. Effect of pyriproxyfen, a juvenile hormone mimic, on egg hatch, nymph development, adult emergence and reproduction of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. **Pest Management Science**, 66: 349-357, 2010.
- Canard, M.; Séméria, Y.; NEW, T.R. **Biology of Chrysopidae**. The Hague: Dr. W. Junk Publishers, 294p, 1984.
- Celestino, D.; Braoios, G.I.; Ramos, R.S.; Gontijo, L.M.; Guedes, R.N.C. Azadirachtin-mediated reproductive response of the predatory pirate bug *Blaptostethus pallelescens*. **BioControl**, 59: 697-705, 2014.
- Charleston, D.S.; Kfir, R.; Dicke, M.; Vet, L.E.M. Impact of botanical pesticides derived from *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on the biology of two parasitoid species of the diamondback moth. **Biological Control**, 33: 131-142, 2005.
- Chen, T.Y.; Liu, T.X. Susceptibility of immature stages of *Chrysoperla rufilabris* (Neurop., Chrysopidae) to pyriproxyfen, a juvenile hormone analog. **Journal of Applied Entomology**, 126: 125-129, 2002.
- Cloyd, R.A.; Dickinson, A. Effect of insecticides on mealybug destroyer (Coleoptera: Coccinellidae) and parasitoid *Leptomastix dactylopii* (Hymenoptera: Encyrtidae), natural

- enemies of citrus mealybug (Homoptera: Pseudococcidae). **Journal of Economic Entomology**, 99(5): 1596-1604, 2006.
- Coats, J.R. Risks from natural versus synthetic insecticides. **Annual Review of Entomology**, 39: 489-515, 1994.
- Correia, A.A.; Wanderley-Teixeira, V.; Teixeira, A.A.C.; Oliveira, J.V.; Gonçalves, G.G.A.; Cavalcanti, M.G.S.; Brayner, F.A.; Alves, L.C. Microscopic analysis of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) embryonic development before and after treatment with Azadirachtin, Lufenuron, and Deltamethrin. **Journal of Economic Entomology**, 106(2): 747-755. 2013.
- Cremonese, P.S.G.; Pinheiro, D.O.; Falleiros, A.M.F.; Neves, P.M.O.J. Performance of reproductive system of *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae) subjected to buprofezin and pyriproxyfen: morphological analysis of ovarioles and testes. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 38(4): 2279-2292, 2017.
- Cruz-Landim, C. Organization of the cysts in bee (Hymenoptera, Apidae) testis: number of spermatozoa per cyst. **Iheringia**, 91:183-189, 2001.
- de Cuevas, M.; Matunis, E.L. The stem cell niche: lessons from the *Drosophila* testis. **Development**, 138: 2861-2869, 2011.
- Desneux, N.; Decourtye, A.; Delpuech, J.M. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. **Annual Review of Entomology**, 52: 81-106, 2007.
- Dumser, J.B. The Regulation of Spermatogenesis in Insects. **Annual Review of Entomology**, 25: 341-369, 1980.
- Eikenes, Å.H.; Brech, A.; Stenmark, H.; Haglund, K. Spatiotemporal control of Cindr at ring canals during incomplete cytokinesis in the *Drosophila* male germline. **Developmental Biology**, 377: 9-20, 2013.
- Eikenes, Å.H.; Malerød, L.; Lie-Jensen, A.; Wegner, C.S. Brech, A.; Liestøl, K.; Stenmark, H.; Haglund, K. Src64 controls a novel actin network required for proper ring canal formation in the *Drosophila* male germline. **Development**, 142: 4107-4118, 2015.
- Fernandez, F.C.; Cruz-Landim, C.; Malaspina, O. Influence of the insecticide pyriproxyfen on the flight muscle differentiation of *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apidae). **Microscopy Research and Technique**, 75: 844-848, 2012.
- Fogel, M.N.; Schneider, M.I.; Rimoldi, F.; Ladux, L.S.; Desneux, N.; Ronco, A.E. Toxicity assessment of four insecticides with different modes of action on pupae and adults of *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae), a relevant predator of the Neotropical Region. **Environmental Science and Pollution Research**, 23:14918-14926, 2016.

- Francesena, N.; Schneider, M.I. Selectivity assessment of two biorational insecticides, azadirachtin and pyriproxyfen, in comparison to a neonicotinoid, acetamiprid, on pupae and adults of a Neotropical strain *Eretmocerus mundus* Mercet. *Chemosphere*, 206: 349-358, 2018.
- Freitas, S.; Penny, N.D. The Green Lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) of Brazilian Agroecosystems. **Proc. Calif. Acad. Sci.**, 52: 245–395, 2001.
- Garcia, A.S.G.; Scudeler, E.L.; Pinheiro, P.F.F.; Santos, D.C. Can exposure to neem oil affect the spermatogenesis of predator *Ceraeochrysa claveri*? **Protoplasma**, 256: 693-701, 2019.
- Garzón, A.; Medina, P.; Amor, F.; Viñuela, E.; Budia, F. Toxicity and sublethal effects of six insecticides to last instar larvae and adults of the biocontrol agents *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) and *Adalia bipunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae). **Chemosphere**, 132: 87-93, 2015.
- Ghazawi, N.A.; El-Shranoubi, E.D.; El-Shazly, M.M.; Abdel-Rahman, K.M. Effects of azadirachtin on mortality rate and reproductive system of the grasshopper *Heteracris littoralis* Ramb. (Orthoptera: Acrididae). **Journal of Orthoptera Research**, 16(1): 57-65, 2007.
- Ginjunpalli, G.K.; Baldwin, W.S. The time- and age-dependent effects of the juvenile hormone analog pesticide, pyriproxyfen on *Daphnia magna* reproduction. **Chemosphere**, 92: 1260–1266, 2013.
- Giolo, F.P.; Medina, P.; Grützmacher, A.D.; Viñuela, E. Effects of pesticides commonly used in peach orchards in Brazil on predatory lacewing *Chrysoperla carnea* under laboratory conditions. **BioControl**, 54: 625-635, 2009.
- Goodman, L.A. Simultaneous confidence intervals for contrasts among multinomial populations. **Annals of Mathematical Statistics**, 35(2):716-725, 1964.
- Gracielle, I.M.S.; Fiorillo, B.S.; Lino-Neto, J.; Bão, S.N. Morphology of the male reproductive system and spermiogenesis in *Hypanthidium foveolatum* (Alfken, 1930) (Hymenoptera: Apidae: Megachilinae). **Micron**, 40: 419–425, 2009.
- Greenbaum, M.P.; Iwamori, T.; Buchold, G.M.; Matzuk, M.M. Germ cell intercellular bridges. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, 3: 1-19, 2011.
- Haglund, K.; Nezis, I.P.; Stenmark, H. Structure and functions of stable intercellular bridges formed by incomplete cytokinesis during development. **Communicative & Integrative Biology**, 4(1): 1-9, 2011.

- He, F.; Sun, S.; Sun, X.; Ji, S.; Li, X.; Zhang, J.; Jiang, X. Effects of insect growth-regulator insecticides on the immature stages of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 164: 665-674, 2018.
- Henry, C.; Busher, C. Patterns of mating and fecundity in several common green lacewings (Neuroptera: Chrysopidae) of eastern north america. **Psyche A Journal of Entomology**, 94: 219-244, 1987.
- Hime, G.R.; Brill, J.A.; Fuller, M.T. Assembly of ring canals in the male germ line from structural components of the contractile ring. **Journal of Cell Science**, 109: 2779-2788, 1996.
- Ishaaya, I.; Barazani, A.; Kontsedalov, S.; Horowitz, A.R. Insecticides with novel modes of action: Mechanism, selectivity and cross-resistance. **Entomological Research**, 37: 148–152, 2007.
- Ishaaya, I.; De Cock, A.; Degheele, D. Pyriproxyfen, a potent suppressor of egg hatch and adult formation of the greenhouse whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). **Physiology, Toxicology, and Biochemistry**, 87(5): 1185-1189, 1994.
- Isman, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, 51: 45-66, 2006.
- Jindra, M.; Bittova, L. The juvenile hormone receptor as a target of juvenoid “insect growth regulators”. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 103(3): 1-7, 2020.
- Jonsson, M.; Wratten, S.D.; Landis, D.A.; Gurr, G.M. Recent advances in conservation biological control of arthropods by arthropods. **Biological Control**, 45:172–175, 2008.
- Kumar, R.P.; Manoj, M.N.; Kush, A.; Annadurai, R.S. In silico approach of azadirachtin binding with actins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 37: 635-640, 2007.
- Linton, Y.M.; Nisbet, A.J.; Mordue (Luntz), A.J. The effect of azadirachtin on the testis of the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forsk.). **Journal of Insect Physiology**, 43: 1077-1084, 1997.
- Mapa - **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2020. URL: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons
- Medina, P.; Budia, F.; Del Estal, P.; Viñuela, E. Influence of Azadirachtin, a Botanical Insecticide, on *Chrysoperla carnea* (Stephens) Reproduction: Toxicity and Ultrastructural Approach. **Journal of Economic Entomology**, 97(1): 43-50, 2004.
- Medina, P.; Smagghe, G.; Budia, F.; Del Estal, P.; Tirry, L.; Viñuela, E. Significance of penetration, excretion, and transovarial uptake to toxicity of three insect growth

- regulators in predatory lacewing adults. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 51: 91-101, 2002.
- Medina, P.; Smagghe, G.; Budia, F.; Tirry, L.; Viñuela, E. Toxicity and absorption of Azadirachtin, Diflubenzuron, Pyriproxyfen, and Tebufenozide after Topical Application in predatory larvae of *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). **Environmental Entomology**, 32(1): 196-203, 2003.
- Mordue (Luntz), A.J.; Blackwell, A. Azadirachtin: an update. **Journal of Insect Physiology**, 39: 903-924, 1993.
- Mordue (Luntz), A.J.; Morgan, E.D.; Nisbet, A.J. Azadirachtin, a natural product in insect control. **Comprehensive Molecular Insect Science**, 6: 117-135, 2005.
- Name, K.P.O.; Barros-Cordeiro, K.B.; Filho, J.B.G.; Wolff, M.; Pujol-Luz, J.R.; Bão, S.N. Structure and ultrastructure of spermatozoa and spermiogenesis in three species of *Lucilia* Robineau-Desvoidy, 1830 (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Morphology**, 273:160–172, 2012.
- Nisbet, A.J.; Mordue (Luntz), A.J.; Williams, L.M.; Hannah, L.; Jennens, L.; Ley, S.V.; Mordue, W. Autoradiographic localization of [22,23-3H2] dihydroazadirachtin binding sites in desert locust testes and effects of azadirachtin on sperm motility. **Tissue Cell**, 28(6): 725- 729, 1996.
- Nisbet, A.J.; Mordue, A.J.; Mordue, W. Detection of [22,23-3H2] dihydroazadirachtin binding sites on *Schistocerca gregaria* (Forsk.) testes membranes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 25(5): 551-557, 1995.
- Ono, É.K.; Zanardi, O.Z.; Aguiar Santos, K.F.; Yamamoto, P.T. Susceptibility of *Ceraeochrysa cubana* larvae and adults to six insect growth-regulator insecticides. **Chemosphere**, 168: 49-57, 2017.
- Ott, G.J.; Shirkey, N.J.; Haimo, L.T.; Cardullo, R.A.; Thaler, C.D. Germ-cell hub position in a heteropteran testis correlates with the sequence and location of spermatogenesis and production of elaborate sperm bundles. **Molecular Reproduction & Development**, 82:295-304, 2015.
- Oulhaci, C.M.; Denis, B.; Kilani-Morakchi, S.; Sandoz, J.C.; Kaiser, L.; Joly, D.; Aribi, N. Azadirachtin effects on mating success, gametic abnormalities and progeny survival in *Drosophila melanogaster* (Diptera). **Pest Management Science**, 74: 174–180, 2018.
- Paccagnini, E.; Mercati, D.; Giusti, F.; Conti, B.; Dallai, R. The spermatogenesis and the sperm structure of *Terebrantia* (Thysanoptera, Insecta). **Tissue and Cell**, 42: 247-258, 2010.

- Paoli, F.; Gottardo, M.; Dallai, R.; Roversi, P.F. Morphology of the male reproductive system and sperm ultrastructure of the egg parasitoid *Gryon pennsylvanicum* (Ashmead) (Hymenoptera, Platygasteridae). **Arthropod Structure & Development**, 42: 297-308, 2013.
- Pappas, M.L.; Broufas, G.D.; Koveos, D.S. Chrysopid predators and their role in biological control. **Journal of Entomology**, 8(3): 301–326, 2011.
- Pearse, A.G.E. **Histochemistry theoretical and applied**. 3ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 759p, 1972.
- Phillips, D.M. Insect sperm: Their structure and morphogenesis. **Journal of Cell Biology**, 44: 243-277, 1970.
- Qi, B.; Gordon, G.; Gimme, W. Effects of neem-fed prey on the predacious insects *Harmonia conformis* (Boisduval) (Coleoptera: Coccinellidae) and *Mallada signatus* (Schneider) (Neuroptera: Chrysopidae). **Biological Control**, 22: 185–190, 2001.
- Roubos, C.R.; Rodríguez-Saona, C.; Isaacs, R. Mitigating the effects of insecticides on arthropod biological control at field and landscape scales. **Biological Control**, 75:28–38, 2014.
- Rugno, G.R.; Zanardi, O.Z.; Cuervo, J.B.; Morais, M.R.; Yamamoto, P.T. Impact of insect growth regulators on the predator *Ceraeochrysa cincta* (Schneider) (Neuroptera: Chrysopidae). **Ecotoxicology**, 25: 940-949, 2016.
- Rugno, G.R.; Zanardi, O.Z.; Yamamoto, P.T. Are the pupae and eggs of the lacewing *Ceraeochrysa cubana* (Neuroptera: Chrysopidae) tolerant to insecticides? **Journal of Economic Entomology**, 108: 2630-2639, 2015.
- Schmutterer, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, 35: 271-297, 1990.
- Scudeler, E.L.; Garcia, A.S.G.; Padovani, C.R.; Santos, D.C. Action of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on cocoon spinning in *Ceraeochrysa claveri* (Neuroptera: Chrysopidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 97: 176–182, 2013.
- Scudeler, E.L.; Garcia, A.S.G.; Padovani, C.R.; Santos, D.C. Pest and natural enemy: how the fat bodies of both the southern armyworm *Spodoptera eridania* and the predator *Ceraeochrysa claveri* react to azadirachtin exposure. **Protoplasma**, 256(3): 839-856, 2019.
- Scudeler, E.L.; Santos, D.C. Effects of neem oil (*Azadirachta indica* A. Juss) on midgut cells of predatory larvae *Ceraeochrysa claveri* (Navás, 1911) (Neuroptera: Chrysopidae). **Micron**, 44:125-132, 2013.

- Shimizu, T. Suppressive effects of azadirachtin on spermiogenesis of the diapausing cabbage army worm, *Mamestra brassicae*, in vitro. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 46: 197-199, 1988.
- Sohail, M.; Khan, S.S.; Muhammad, R.; Soomro, Q.A.; Asif, M.U.; Solangi, B.K. Impact of insect growth regulators on biology and behavior of *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). **Ecotoxicology**, 28: 1115–1125, 2019.
- Tayade, D.V. Effect of phytochemical azadirachtin on the morphology and cytology of the testis follicle of the Indian grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. **Bioscience Discovery**, 3(1): 79-81, 2012.
- Tomé, H.V.V.; Martins, J.C.; Corrêa, A.S.; Galdino, T.V.S.; Picanço, M.C.; Guedes, R.N.C. Azadirachtin avoidance by larvae and adult females of the tomato leafminer *Tuta absoluta*. **Crop Protection**, 46: 63-69, 2013.
- Viscuso, R.; Sottile, L.; Brundo, M.V.; Vitale, D.G.M. Genesis of spermatodesms in *Tylopsis liliifolia* (Orthoptera: Phaneropterinae) and their transit in the male genital tract. **Tissue and Cell**, 44: 195-203, 2012.
- Vivekananthan, T.; Selvisabhanayakam; Suresh, N. Histopathological observations on testes of adult blister beetle, *Mylabris indica* (Thunberg) (Coleoptera: Meloidae) treated with neem. **Journal of Entomological Research**, 38:45-52, 2014.
- Xiao, X.; Yang, W. Actin-based dynamics during spermatogenesis and its significance. Journal of Zhejiang University. **Science B.**, 8(7): 498-506, 2007.
- Zar, J.H. **Biostatistical analysis**. Ed 5, Prentice Hall, New Jersey, 994 p., 2009.
- Zizzari, Z.V.; Lupetti, P.; Mencarelli, C.; Dallai, R. Sperm ultrastructure and spermiogenesis of Coniopterygidae (Neuroptera, Insecta). **Arthropod Structure & Development**, 37: 410–417, 2008.
- Zizzari, Z.V.; Machida, R.; Tsutsumi, K.; Reynoso-Velasco, D.; Lupetti, P.; Dallai, R. Ultrastructural studies on euspermatozoa and paraspermatozoa in Mantispidae (Insecta, Neuroptera). **Tissue and Cell**, 42: 81–87, 2010.

CAPÍTULO 2

Genes diferencialmente expressos nos testículos de *Ceraeochrysa claveri* em resposta aos inseticidas Azadiractina e Piriproxifem

Ana Silvia Gimenes Garcia^{a,*}, Aime Giovanna Pereira^a, Fábio Malta de Sá Patroni^b, Elton Luiz Scudeler^a, Daniela Carvalho dos Santos^a

^aLaboratório de Insetos, Departamento de Biologia Estrutural e Funcional, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP - Botucatu, SP, Brazil. ^bCentro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Instituto de Biologia, Unicamp – Campinas, SP, Brazil.

Resumo

Ceraeochrysa claveri é um importante inimigo natural utilizado no controle biológico de pragas. Verificar sua compatibilidade com inseticidas é de grande importância não só para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável, mas também para a preservação dessa espécie. Para isso, adultos de *C. claveri* foram expostos a duas concentrações de Azadiractina (12 e 36mg i.a./L) e Piriproxifem (50 e 100mg i.a./L) e avaliados os genes diferencialmente expressos nos testículos de insetos adultos, através da análise do transcriptoma desse órgão. Os resultados apontaram diferença na expressão dos genes de nucleoporinas (*Nup*), algumas proteínas ribossomais (*Rpl* e *Rps*) e dedo de zinco (*Znf*), para ambos os inseticidas testados. Essas alterações podem estar relacionadas ao processo de espermatogênese e fecundidade dos insetos. Esse estudo revela que o uso de dados do transcriptoma dos testículos de *C. claveri* pode levar a uma melhor compreensão dos efeitos da azadiractina e piriproxifem nos testículos desse inseto. Além disso, esperamos que esses resultados auxiliem em futuros trabalhos sobre a toxicidade desses inseticidas, não só em *C. claveri*, mas também em outras espécies.

Introdução

A família Chrysopidae apresenta um diverso grupo de insetos predadores, amplamente utilizados no controle biológico de insetos praga. *Ceraeochrysa claveri*, pertencente à essa família e objeto de estudo deste trabalho, possui indivíduos predadores em seu estágio larval abrangendo grande variedade de presas com grande eficiência e alto potencial reprodutivo (Canard et al., 1984; Pappas et al., 2011; Scudeler; Santos, 2013).

Conhecer os efeitos dos pesticidas em organismos benéficos é indispensável em um Manejo Integrado de Pragas, pois esses produtos devem preservar os inimigos naturais e, ao mesmo tempo, controlar as populações de insetos-praga (Chen; Liu, 2002; Medina et al., 2003; Cloyd; Dickinson, 2006; Jonsson et al., 2008).

Pensando nisso, métodos alternativos de controle foram desenvolvidos, com a utilização, por exemplo, de produtos naturais como os inseticidas de origem vegetal (Adnan et al., 2014; Celestino et al., 2014). A Azadiractina, um componente ativo isolado da árvore de nim, interfere no sistema endócrino dos insetos, mais especificamente nas vias do hormônio juvenil (JH) e 20-hidroxiecdisona, e tem efeito no desenvolvimento e reprodução (Mordue (Luntz); Blackwell, 1993; Mordue (Luntz) et al., 2005; Isman, 2006; Bernardi et al., 2013; Adnan et al., 2014; Aribi et al., 2017; Oulhaci et al., 2018).

Inseticidas sintéticos também tem sido avaliados quanto à sua compatibilidade em programas de manejo, como é o caso de Piriproxifem, um inseticida que mimetiza o hormônio juvenil e provoca desequilíbrio nos níveis desse hormônio no inseto, resultando em forte supressão da embriogênese, metamorfose, formação de adultos e esterilidade em muitos insetos praga (Ishaaya et al., 1994; 2007; Boina et al., 2010; Fernandez et al., 2012).

Além disso, são necessários estudos que avaliem a compatibilidade de inseticidas com insetos predadores, incluindo algumas espécies de crisopídeos, para assegurar sua eficiência no manejo integrado e garantir a segurança dos insetos benéficos (Medina et al., 2003; Cloyd; Dickinson, 2006; Desneux et al., 2007). Conhecer os efeitos destes produtos nesses indivíduos e em especial, na sua reprodução, é de extrema importância para a manutenção destas espécies, assegurando uma agricultura mais sustentável.

Uma metodologia que tem contribuído muito no entendimento desses efeitos nos insetos é sequenciamento de próxima geração (NGS), que é uma ferramenta que permite a obtenção de grandes quantidades de informação genética de organismos não-modelo, como insetos (Schuster, 2008). Análise de transcriptoma é uma poderosa ferramenta para a pesquisa, permitindo o desenvolvimento de estratégias de controle de pragas com base na caracterização e exploração de genes relacionados a vários fatores importantes, como a ação

inseticida e o desenvolvimento de mecanismos de resistência (Oppenheim et al., 2015; Liu et al., 2016), sendo bastante utilizada em estudos com insetos praga (Ridgeway; Timm, 2014; Nascimento et al., 2015; Gao et al., 2018; Merlim; Cônsoli, 2019; Wei et al., 2019; Chen et al., 2020; Meng et al., 2020; Chen et al., 2021). A associação desses resultados com análises de ontologia permitem estabelecer uma relação entre genes alterados e respectivas funções de uma forma global e eficaz, possibilitando um melhor entendimento sobre as variações presentes entre tipos diferentes de tratamento.

Essa metodologia será muito útil para identificar os principais genes regulados pela Azadiractina e Piriproxifem nos testículos de *C. claveri*, contribuindo para o entendimento sobre as alterações detectadas em estudos morfológicos.

Material e Métodos

Insetos

Foram utilizadas larvas de *C. claveri* recém-eclodidas, obtidas da colônia mantida no Laboratório de Insetos do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu, São Paulo, Brasil. A colônia de insetos e os bioensaios foram mantidos em condições controladas de temperatura, 25 ± 1 °C; umidade relativa, $70 \pm 10\%$; e fotoperíodo, 12:12h (claro / escuro). As larvas de *C. claveri* foram alimentadas *ad libitum* com ovos de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) e os adultos com dieta artificial composta de mel e levedura de cerveja (1:1, v:v). Ovos de *D. saccharalis* foram fornecidos pelo CETMA Comércio de Agentes para Controle Biológico, Lençóis Paulista, Estado de São Paulo, Brasil.

Bioensaios

Larvas de *C. claveri* foram alimentadas *ad libitum* com ovos de *D. saccharalis* tratados com duas concentrações de cada inseticida testado. Para a Azadiractina utilizou-se a formulação comercial Azamax[®] (UPL do Brasil – Indústria e Comércio de Insumos Agropecuários S.A., Ituverava-SP, Brasil), diluída em água destilada nas concentrações 12 e 36 mg i.a/L; para o Piriproxifem utilizou-se a formulação comercial Tiger 100 EC[®] (Sumitomo Chemical do Brasil Representações Ltda, São Paulo, Brasil) diluída nas concentrações 50 e 100 mg i.a/L. As formulações comerciais utilizadas, bem como suas dosagens, foram selecionadas a partir dos registros no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa, 2020), sendo escolhidas as dosagens menores e maiores de cada produto de acordo com a cultura em que há registro de presença de crisopídeos.

As larvas foram individualizadas em potes de polietileno e alimentadas com ovos de *D. saccharalis* previamente tratados com as respectivas dosagens citadas acima através da técnica de imersão por 5 segundos e secos em temperatura ambiente (Scudeler; Santos, 2013), sendo trocados a cada três dias. O controle foi feito com larvas alimentadas com ovos sem tratamento. Os grupos experimentais foram conduzidos nas mesmas condições controladas descritas para a criação de insetos.

Adultos recém-emergidos de cada grupo experimental foram colocados em potes de polietileno e alimentados com dieta artificial conforme mencionado anteriormente. Depois disso, apenas machos adultos com 10 dias foram utilizados para a coleta dos testículos e análise das amostras.

Extração de RNA e sequenciamento

Tendo em vista que os testículos da espécie em questão possuem tamanho bastante reduzido, o material foi coletado em pools com 50 pares de testículos, com 3 repetições para cada grupo experimental, totalizando 15 pools (amostras). Para coleta, os espécimes foram resfriados por 30 segundos antes de serem dissecados pela região dorsal, fazendo uso de água DEPC, e após a remoção dos testículos, estes foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em biofreezer -80°C até o seu uso. As amostras foram então enviadas para a empresa NGS Soluções Genômicas (Piracicaba/SP) para realização da extração do RNA e para o posterior sequenciamento. O RNA total foi extraído por meio de Trizol, seguindo as especificações do fabricante. As amostras foram analisadas em termos de qualidade e integridade por meio dos equipamentos NanoVue (GE) e Bioanalyzer (Agilent). Os pools, apresentando um RNA Integrity Number (RIN) de no mínimo 8 foram selecionados para os procedimentos de sequenciamento. Os pools selecionados foram sequenciados por meio da plataforma Illumina HiSeq 2000 em pair-end (2x100). Os dados de sequenciamento foram recebidos por meio de um link FTP, e direcionados aos procedimentos de processamento e análise.

Análise dos dados do sequenciamento

O controle de qualidade dos dados sequenciados foi realizado utilizando o FastQC (v0.11.9) com os parâmetros padrões. Posteriormente, a remoção dos adaptadores Illumina foi feita com o Trimmomatic (v0.39) (Bolger et al., 2014), e os parâmetros utilizados foram os seguintes: -phred33, ILLUMINACLIP:TruSeq3-PE.fa:2:30:10, LEADING:3, TRAILING:3, SLIDINGWINDOW:4:15, e MINLEN:30. Após essa etapa, os reads resultantes foram

novamente avaliados pelo FastQC com os parâmetros padrões. Os melhores foram usados para montagem do transcriptoma com a ferramenta Trinity (v2.12.0) e com parâmetros padrões.

Com o transcriptoma montado foi possível alinhar os reads utilizando o Hisat2 (v2.0.5). Com os reads alinhados e ordenados foi possível utilizar o programa eXpress (v1.5.1) contagem dos mesmos. A análise de expressão diferencial gênica foi realizada no R (v3.4.4) utilizando o EBSeq (v1.18) (Leng et al., 2013) com 20 rounds para os cinco grupos em triplicatas: 12mg, 36mg, 50mg, 100mg e controle. Os parâmetros considerados foram os seguintes: $FDR \geq 0.05$, $|FC| > 2$, $ebtest_qtrm = 0.75$ e $ebtest_qtrm_cut = 10$.

A análise de enriquecimento de vias foi possível graças à anotação do transcriptoma feita com a ajuda do Trinotate (v3.2.2). O BlastX foi utilizado para buscas de transcritos, e o BLASTP para buscas de proteínas "Transdecoder-predicted". O último preparativo foi a criação do objeto Trinity.fasta.gene_trans_map pelo comando do Trinotate denominado "get_Trinity_gene_to_trans_map.pl".

Cada uma das lista de genes diferencialmente expressos foi enriquecida, considerando quatro listas para cada combinação de tratado vs controle. Essa etapa foi realizada no Python (v3.8.8) utilizando o Gseapy (v0.10.4). Com os ids adequados o enriquecimento pode ser iniciado sendo consultado os seguintes gene_sets: 'GO_Biological_Process_2018', 'GO_Cellular_Component_2018', 'GO_Molecular_Function_2018', 'Panther_2016', 'Reactome_2016' e 'ProteomicsDB_2020'.

Resultados

A anotação da montagem *de novo* permitiu a identificação putativa de um total de 29.212.472 transcritos para o grupo controle (3 réplicas), 46.697.499 no grupo 12mg de azadiractina, 45.675.024 para 36mg, 25.136.786 no grupo 50mg de piriproxifem, e 24.712.602 transcritos no tratamento com 100mg. Os valores de cada amostra (repetição estão contidos na tabela 1). Foi realizada a identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs) em todos os grupos utilizando EBSeq, usando um valor p ajustado de $< 0,05$ de significância. Para entender melhor suas funções, esses genes foram mapeados para os termos no banco de dados Gene Ontology (GO). Cada um dos termos GO foram enriquecidos em 4 grupos: Ct12 e Ct36, para os grupos tratados com azadiractina nas respectivas concentrações 12mg e 36mg; Ct50 e Ct100, para os tratamentos com 50mg e 100mg de piriproxifem, respectivamente.

Tabela 1. Número de transcritos obtidos em cada réplica e grupo experimental.

Grupo experimental	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Controle	9.797.763	9.872.209	9.542.500
12mg azadiractina	15.253.872	15.391.050	16.052.577
36mg azadiractina	14.205.316	16.379.134	15.090.574
50mg piriproxifem	8.217.810	9.086.931	7.832.045
100mg piriproxifem	7.468.121	8.987.388	8.257.093

As comparações resultaram em um total de 18035 DEGs no grupo Ct12 (up-regulated: 9021, down-regulated: 9014), 16292 em Ct36 (up-regulated: 8596, down-regulated: 7696), 13178 em Ct50 (up-regulated: 7000, down-regulated: 6178), e por fim, 12148 DEGs para Ct100 (up-regulated: 6289, down-regulated: 5859) (Figura 1).

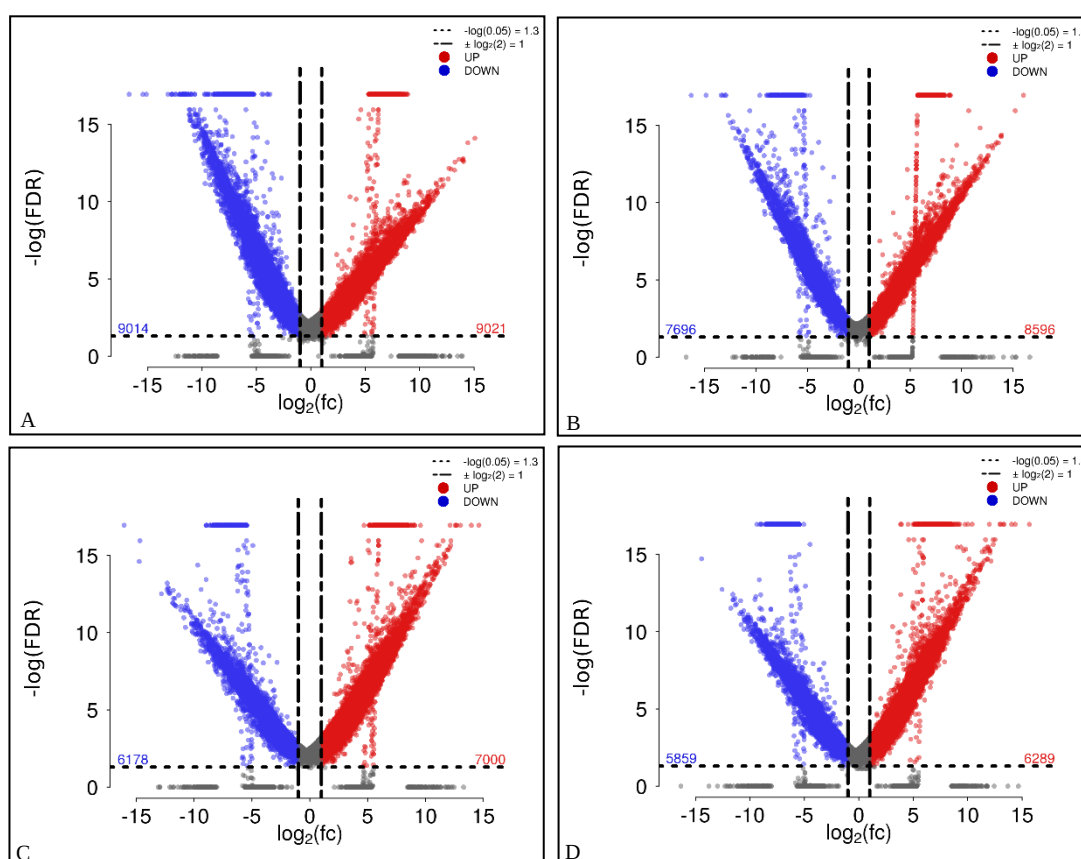


Figura 1. Gráficos de vulcão representando os genes diferencialmente expressos. **A.** Grupo Ct12; **B.** Grupo Ct36; **C.** Grupo Ct50 e **D.** Grupo Ct100. Os genes com expressão diferencial foram indicados por pontos vermelhos (regulados positivamente) e pontos azuis (regulados negativamente).

Selecionando apenas os genes que obtiveram valor ajustado de $p < 0,05$, reduzimos esses números a um total de 494 genes em Ct12 (up-regulated: 317, down-regulated: 177), 29 em Ct36 (up-regulated: 0, down-regulated: 29), 116 em Ct50 (up-regulated: 82, down-regulated: 34), e por fim, 101 DEGs para Ct100 (up-regulated: 0, down-regulated: 101), representados na figura 2. Podemos observar que as menores doses de cada inseticida (Ct12 e Ct50) apresentaram mais genes com expressão aumentada, enquanto as maiores doses de cada inseticida não apresentaram genes com expressão aumentada. Os grupos Ct12 e Ct100 apresentaram maior quantidade de genes menos expressos, com 177 e 101, respectivamente.

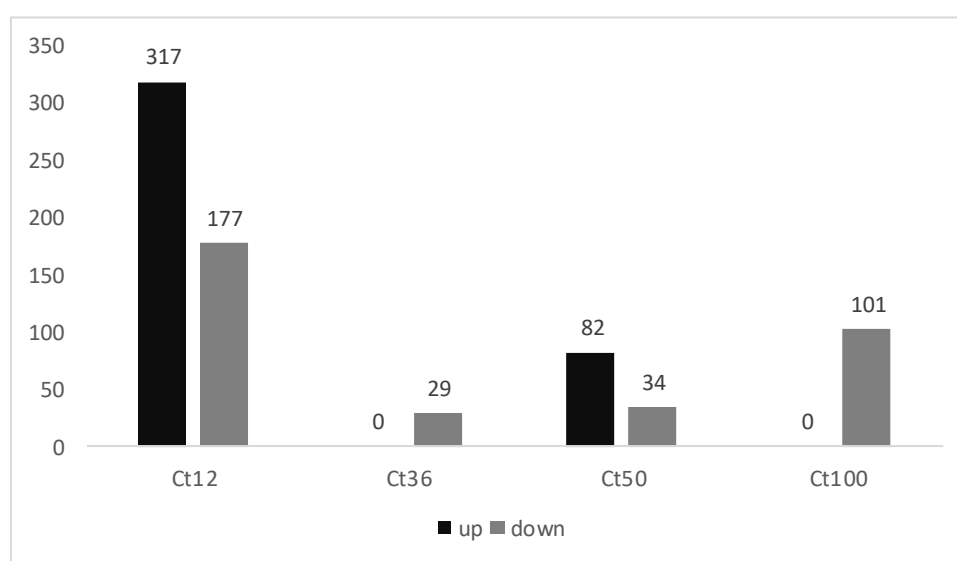


Figura 2. Representação dos genes diferencialmente expressos com valor ajustado de $p < 0,05$, em cada grupo experimental.

Os genes que foram comuns a pelo menos dois grupos totalizaram 21 up-regulated e 69 down-regulated. Dentre os genes que se apresentaram mais expressos, todos os listados a seguir foram comuns aos grupos Ct12 e Ct50, visto que os grupos Ct36 e Ct100 não apresentaram genes com valor de $p < 0,05$. Destacamos a nucleoporina Nup188, proteína ribossomal Rpl5, Rpl9, Rpl29 e proteínas dedo de zinco Zfp37, Znf135, Znf160, Znf184, Znf227, Znf233, Znf235, Znf568, Znf585B, Znf678, Znf717 e Znf782.

Os genes que apresentaram expressão diminuída encontram-se distribuídos entre os grupos experimentais conforme apresentado na tabela 2. Dentre eles destacamos algumas nucleoporinas e diversas proteínas ribossomais e dedo de zinco. Apenas essa última classe apresentou-se distribuída apenas entre os grupos Ct12 e Ct100, onde observamos as seguintes:

Zfp37, Znf135, Znf160, Znf184, Znf227, Znf233, Znf235, Znf568, Znf585B, Znf678, Znf717 e Znf782.

Tabela 1. Distribuição de genes com expressão diminuída entre os grupos experimentais.

Gene	Grupos
Down-regulated	
Nup35	Ct12, 36 e 100
Nup107	Ct12 e 100
Nup155	Ct36 e 50
Nup160	Ct12, 50 e 100
Rpl7	Ct12 e 36
Rpl13	Ct12, 36, 50 e 100
Rpl22	Ct12 e 100
Rpl27A	Ct12, 36, 50 e 100
Rpl30	Ct12, 36, 50 e 100
Rpl35	Ct12, 36, 50 e 100
Rpl37	Ct12, 36, 50 e 100
Rpl38	Ct12, 36, 50 e 100
Rps3	Ct36, 50 e 100
Rps5	Ct12 e 36
Rps7	Ct50 e 100
Rps8	Ct12 e 36
Rps10	Ct12, 36 e 50
Rps26	Ct36 e 100

Discussão

A base de dados deste trabalho foi construída por metodologia de sequenciamento de RNA dos testículos de *C. claveri*, cuja espécie não conta com dados na literatura de transcriptoma. Portanto, os resultados aqui descritos fornecem dados inéditos e permitem novos estudos com essa espécie.

Identificar os genes envolvidos no desenvolvimento do testículo e na espermatogênese é útil para revelar o mecanismo molecular da reprodução em uma espécie de inseto, e para seu correto desenvolvimento é necessário que genes específicos sejam ativados e desativados em momentos e locais específicos.

Os genes expressos nos testículos de insetos e que regulam o processo de espermatogênese são descritos em diversos trabalhos, onde podemos citar as Proteínas de Choque Térmico (HSPs), Citocromo P450 (CYPs), Nucleoporinas (NUP), além de diversas proteínas ribossomais (RPL e RPS) e dedo de zinco, ou *zinc finger* (ZNFs).

HSP

As HSPs desempenham um papel importante nos testículos. Os genes da família HSP60, 70 e 90 são altamente conservados entre os organismos e os mais abundantemente expressos, estando envolvidos em resposta ao stress induzidos por fatores ambientais, além da maturação dos espermatozoides, onde são encontradas em todos os tipos celulares, desde as espermatogônias até espermátides, em diversas espécies como ratos, insetos e humanos (Wei et al., 2014; Vedelek et al., 2018; Zhou et al., 2018; Luo et al., 2019).

Quando indivíduos são expostos a agentes químicos, como os inseticidas imidacloprid, deltametrina, clorantroliprole e azadiractina, a expressão desses genes pode ser aumentada ou diminuída, dependendo de sua função. Indivíduos do bicho-da-seda *Bombyx mori* expostos ao inseticida phoxim tiveram aumento na expressão de HSP no corpo gorduroso, enquanto testículos do mesmo inseto exposto ao flúor também tiveram sua expressão aumentada; células S2 de *Drosophila* expostas à azadiractina também tiveram expressão de HSP70 aumentada em células em processo de apoptose (Gu et al., 2015; Xu et al., 2016; Tang et al., 2018; Zhou et al., 2018; Meng et al., 2019).

Esses trabalhos sugerem que o aumento da expressão das HSPs esteja relacionado à proteção contra danos nesses tecidos e a resposta ao stress varia entre as diferentes espécies. Entretanto, em nossos resultados os genes da família HSP não apresentaram diferenças significativas de expressão em nenhum dos grupos tratados.

CYP

Outro grupo de genes bastante abordado na literatura em se tratando de tratamento com inseticidas são os genes da família CYP (citocromo P450), que estão relacionados a processos metabólicos, detoxificação celular e mecanismos de resistência em insetos. São encontrados em muitos tecidos de insetos, dentre eles tecido gorduroso, intestino médio, túbulos de Malpighi, sistema nervoso e testículos (Hsu et al., 2011; Antony et al., 2019; Wei et al., 2019).

Em insetos expostos a diversos inseticidas, como thiamethoxam, lufenuron, phoxim, imidacloprid, deltametrina, diflubenzuron, esses genes podem encontrar-se diferencialmente expressos (Gu et al., 2015; Nascimento et al., 2015; Zhou et al., 2018; Chen et al., 2020; Chen et al., 2021). Shu et al. (2020) e Yunta et al. (2016) especulam que genes regulados positivamente estejam envolvidos na degradação da azadiractina, em larvas de *Spodoptera frugiperda*, e de piriproxifem em *Anopheles gambiae*. Outros estudos sugerem relação com resistência ao piriproxifem nas moscas brancas *Trialeurodes vaporariorum* e *Bemisia tabaci*

(Ghanin; Kontsedalov, 2007; Karatolos et al., 2012). Embora esses genes sejam expressos em testículos de *C. claveri*, não houve diferenças na expressão em ambos os insetos testados.

Nucleoporinas

Dentre os genes que se encontraram diferencialmente expressos devido à exposição aos insetos testados, encontramos as Nucleoporinas (Nups), que fazem parte do complexo nuclear de poros, têm funções bem estabelecidas no transporte nucleo-citoplasma, bem como na quebra e remontagem do envelope nuclear durante a mitose, além de organizar o complexo estrutural e funcionalmente (Parrott et al., 2011).

Estudos com leveduras, rãs e ratos mostraram que muitas das nucleoporinas conhecidas são altamente conservadas em eucariotos em sequência, localização, interações de proteínas e funções estruturais e/ou de transporte no complexo de poros, e tem papel importante na regulação da gametogênese e diferenciação gonadal de machos e fêmeas (Kiger et al., 1999; Colozza et al., 2011; Preston et al., 2019).

Em trabalho realizado com *Drosophila melanogaster*, mutações nas nucleoporinas causaram esterilidade em fêmeas, as quais produziram ovos com deformidades, além de deformidade nos ovários. Nos testículos, as alterações parecem ter sido mais severas, apresentando tamanho reduzido dos testículos de pupas e adultos mutantes, com predominância de cistos de espermatócitos primários, e cistos que não continhas células germinativas em seu interior (Gigliotti et al., 1998). Parrott et al. (2011) também encontraram problemas de desenvolvimento das células germinativas similares em insetos adultos de *Drosophila* quando *nup98-96* era modificado. A depleção de Nup107-160 também em *Drosophila* resultou em uma maior frequência de falha durante a citocinese na meiose masculina, sugerindo que o complexo Nup107-160 desempenha um papel no núcleo dos espermatócitos e na divisão meiótica (Hayashi et al., 2016).

Em camundongos, a expressão de Nup50 é regulada pelas células germinativas de machos, onde, a sua deficiência causa apoptose das células germinativas primordiais (Park et al., 2016). Wang et al. (2014) sugerem que a azadiractina causa interferência na tradução e transcrição de proteínas com aumento da expressão de Nup43, inibindo o crescimento de larvas de *Drosophila*.

Nossos resultados apontam diminuição de expressão de Nup35 nos tratamentos Ct12, Ct36 e Ct100; Nup107 em Ct12 e Ct100; Nup155 em Ct36, Ct50 e Ct100; e Nup160 em Ct12, Ct50 e Ct100, além de aumento de expressão em Ct12 de Nup43 e Nup188 em Ct12 e Ct50. Esses dados nos levam a inferir que a diferença de expressão encontradas nas nucleoporinas

nos dois inseticidas testados pode estar relacionada com as alterações morfológicas encontradas nos testículos de *C. claveri*, como os espaçamentos entre os cistos e as alterações na túnica. Entretanto, são necessárias mais investigações a respeito dos mecanismos de ação desses inseticidas sobre essas proteínas.

Proteínas Ribossomais

Outra classe de genes que se apresentaram diferencialmente expressos nos tratamentos com azadiractina e piriproxifem foram as RPLs e RPSs (proteínas ribossomais L e S), que são essenciais para o crescimento, proliferação, diferenciação e desenvolvimento animal. O comprometimento dessas proteínas pode retardar o crescimento celular e o desenvolvimento animal (Zhou et al., 2015).

Em trabalho utilizando camundongos, pesquisadores encontraram que a radiação pode induzir apoptose em espermatogônias, diminuindo a expressão de Rpl27a (Li et al., 2020). Já em estudos com *Drosophila*, a insuficiência do gene RP que reduz o número de ribossomos e a síntese de proteínas em *Drosophila*, induz desenvolvimento larval retardado, tamanho corporal pequeno, esterilidade feminina e malformação de asas e olhos (Zhou et al., 2015).

Genes parálogos RpL22e, localizados dentro das células germinativas mitóticas mais próximas à região apical e no citoplasma de espermatócitos primários, são necessários para a maturação dos espermatozoides e fertilidade desses insetos. Entretanto, a superexpressão do mesmo parólogo causa redução da fertilidade e longevidade (Kearse et al., 2013; Mageeney et al., 2018; Mageeney; Ware, 2019). Em estudo com mosca branca exposta ao piriproxifem, os autores relataram que o aumento da expressão de algumas proteínas ribossomais pode estar relacionada ao mecanismo de resistência desses insetos (Ghanin; Kontsedalov, 2007), e o tratamento com azadiractina induziu apoptose em células Sf9 e afetando a expressão de vários genes, como de algumas proteínas ribossomais (Shu et al., 2018).

Nossos resultados apontam a diminuição da expressão de diversas RPLs, sendo as que se encontraram comuns em todos os grupos experimentais as RPL13, 27A, 30, 35, 37 e 38, e ainda aumento de expressão de RPL5, 9 e 29 em Ct 12 e Ct50. Esses resultados podem ter relação com a diminuição da fecundidade dos casais expostos, visto que muitos trabalhos relacionam alterações na fecundidade quando essas proteínas são alteradas.

Proteínas dedo de zinco

E por último, identificamos as proteínas zinc finger (ou dedo de zinco), que são uma classe de proteínas regulatórias que podem participar de diversas atividades celulares. Essas

proteínas foram caracterizadas como participantes do controle da homeostase celular e da diferenciação em vários organismos. Foram identificadas altamente expressas em testículos humanos (Znf300) (Cao et al., 2007), e em camundongos, onde Zfp105 aparece altamente expressa na espermatogênese, durante a progressão de espermatócitos para espermátides arredondadas no testículo de adultos (Przyborski et al., 1998; Zhou et al., 2010). Mutação em Zfx pode levar a diminuição da fertilidade, devido à redução das células germinativas (Luoh et al., 1997). Nos grupos tratados podemos observar diversas dessas proteínas com diferenças de expressão, tanto aumentadas quanto diminuídas, sendo necessário um maior aprofundamento na análise deste grupo de proteínas para o entendimento de seu papel na espermatogênese, visto que tivemos dificuldade em encontrar informações na literatura que nos permitisse comparar esses resultados na formação dos gametas masculinos em insetos.

Nossa análise até o momento, fornece uma visão geral dos genes diferencialmente expressos nos testículos dos insetos tratados com azadiractina e piriproxifem, oferecendo uma rica base de dados para o aprofundamento em estudos futuros sobre o modo de ação desses inseticidas na reprodução dos machos de *C. claveri*. De acordo com o encontrado na literatura, acreditamos que os genes diferencialmente expressos encontrados nesta análise inicial do transcriptoma, possam estar relacionados com as alterações morfológicas observadas (descritas no capítulo 1 desta Tese), como espaçamento entre os cistos espermáticos, alterações na túnica e redução da fecundidade dos insetos.

Novas análises dos dados gerados pelo transcriptoma dos testículos deste estudo serão feitas em breve e esperamos poder contribuir com informações mais robustas e abrangentes sobre o efeito de ambos os inseticidas nos testículos do inseto não alvo *C. claveri*.

Referências

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

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

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

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

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

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

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

Considerações finais

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

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