

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

SÍLVIA DE OLIVEIRA MIRANDA

**DINÂMICA DA ATIVAÇÃO OVARIANA EM *ZABROTES SUBFASCIATUS* (BOH.)
(COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE, BRUCHINAE): A NECESSIDADE DE
SEMENTES E MACHOS**

ALFENAS/MG

2023

SÍLVIA DE OLIVEIRA MIRANDA

**DINÂMICA DA ATIVAÇÃO OVARIANA EM *ZABROTES SUBFASCIATUS* (BOH.)
(COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE, BRUCHINAE): A NECESSIDADE DE
SEMENTES E MACHOS**

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Curso do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Federal de Alfenas-MG, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk

Alfenas/MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Miranda, Sílvia de Oliveira .

Dinâmica da ativação ovariana em *Zabrotes subfasciatus* (boh.)
(Coleoptera: Chrysomelidae, Bruchinae) : A necessidade de sementes e machos / Sílvia de Oliveira Miranda. - Alfenas, MG, 2024.

64 f. : il. -

Orientador(a): Angel Roberto Barchuk.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Caruncho do feijão. 2. Hospedeiro. 3. Reprodução. 4. Oviposição. I. Barchuk, Angel Roberto, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

Sílvia de Oliveira Miranda

Dinâmica da ativação ovariana em *Zabrotes subfasciatus* (boh.) (Coleoptera:
Chrysomelidae, Bruchinae): A necessidade de sementes e machos

O(A) Presidente da banca examinadora abaixo
assina a aprovação da Dissertação apresentada
como parte dos requisitos para a obtenção do título
de Mestre em Ciências Fisiológicas pela
Universidade Federal de Alfenas. Área de
concentração: Ciências Fisiológicas

Aprovada em: 12 de dezembro de 2023

Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas.

UNIFAL-MG

Profa. Dra. Zila Luz Paulino Simoes

Instituição: Universidade de São Paulo

USP

Prof. Dr. Rodrigo Pires Dallacqua

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

UFMS



Documento assinado eletronicamente por **Angel Roberto Barchuk, Professor do Magistério Superior**, em 12/12/2023, às 17:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifalmg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1148368** e o código CRC **39510096**.

AGRADECIMENTOS

A presente jornada de mestrado foi, sem sombra de dúvida, uma trilha de descobertas, aprendizados e muitos desafios. Hoje, ao concluir esta dissertação, sinto-me imensamente grata por cada passo dado, e é com profunda emoção que dedico estas palavras de agradecimento a todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a concretização deste sonho.

Primeiramente, expresso minha sincera gratidão ao meu orientador, Barchuk, cuja orientação sábia, paciência e incentivo constante foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Sua dedicação e paixão pela pesquisa inspiraram-me a ir além dos limites, a questionar e a aprofundar meus conhecimentos. Obrigada pela confiança!

À professora Livia e à professora Ester, que com sua expertise e generosidade compartilharam valiosas contribuições ao meu projeto, agradeço do fundo do coração. Seus insights foram como faróis, iluminando caminhos inexplorados e enriquecendo minha compreensão.

À Juliana, que com sua competência esteve sempre disponível para auxiliar nos momentos mais desafiadores, deixo meu reconhecimento. Sua colaboração foi essencial para o êxito das experimentações e análises realizadas. Agradeço, além disso, imensamente o que fez por mim sobretudo no início de 2023, me acolhendo à sua maneira quando mais precisei.

Ao grupo de pesquisa, uma verdadeira comunidade de aprendizado e troca de experiências nos “cafés com duas mãos”, expresso minha admiração e agradecimento. Em especial ao Takashi, Emily e Bruno pela longa parceria, amizade, risadas e o compartilhamento de experiências que me ajudaram muito na execução desse trabalho.

Agradeço de maneira especial aos meus pais, Jorge e Cleuza, cujo apoio incondicional e amor foram meu alicerce. Sem a confiança deles, esta jornada teria sido muito mais difícil, principalmente no último ano. Meus dois irmãos, Waner e Wagner, fonte de alegria e estímulo, também merecem meu agradecimento pela constante inspiração e por “desde sempre” carregarem a irmãzinha deles nos braços. Eu tenho os melhores irmãos do mundo!

Aos amigos, Fernanda, Letícia, Matheus e Gustavo, verdadeiros companheiros de jornada, agradeço por compartilharem risos, desafios e momentos de descontração. Seus subsídios, conselhos e incentivos foram determinantes para manter a chama da motivação acesa.

Ao meu namorado, Thales, que caminhou ao meu lado, compreendendo as noites de estudo e os períodos de ausência, deixo meu carinho e agradecimento. Sua presença foi meu refúgio nos momentos de cansaço.

Ao Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas pelo apoio fundamental e pela oportunidade de crescimento acadêmico que me foi proporcionada. Agradeço à coordenadora Roseli por sua orientação dedicada, expertise e inspiração ao longo desta jornada acadêmica. Além disso, quero expressar meu reconhecimento especial à Adriana, cuja eficiência, paciência e prontidão desempenharam um papel vital na facilitação do meu percurso acadêmico. Sua amabilidade e disposição para ajudar foram elementos fundamentais na superação de desafios administrativos. Agradeço a todos os envolvidos no programa de pós-graduação, pela dedicação incansável em promover um ambiente acadêmico estimulante e propício ao desenvolvimento de novos conhecimentos.

Ao Instituto Federal Campus Poços de Caldas, que proporcionou o ambiente propício para o desenvolvimento da pesquisa, expressei minha gratidão pela infraestrutura e suporte oferecidos. Aos técnicos e auxiliares de laboratório, Dani e Gui, cuja dedicação e competência foram imprescindíveis, deixo meu reconhecimento. O trabalho e a paciência de vocês permitiram a realização dos meus experimentos.

À CAPES e à FAPEMIG, que viabilizaram financeiramente este projeto, agradeço o investimento em pesquisa e desenvolvimento científico. Suas bolsas foram essenciais para a continuidade deste trabalho.

Em cada página desta dissertação, carrego não apenas o resultado de uma pesquisa, mas também a gratidão por todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para este capítulo da minha jornada acadêmica. A todos vocês, meu mais sincero obrigado.

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

RESUMO

O besouro *Zabrotes subfasciatus* é um inseto predador de grãos estocados, particularmente do feijão (*Phaseolus vulgaris*). Portanto, entender a biologia de *Z. subfasciatus* permite o planejamento e a adoção de estratégias de controle sustentável dos grãos. Apesar de sua importância, há poucos trabalhos desenvolvidos sobre os parâmetros que envolvem a biologia da reprodução do inseto. Ensaio eletroantegráficos sugerem que o contato das fêmeas de *Z. subfasciatus* com o hospedeiro e com machos estimula a ovogênese e a oviposição. Porém, a dinâmica morfológica e molecular da ontogênese ovariana destes insetos em resposta a esses estímulos é desconhecida. Isto posto, buscamos determinar como macho e hospedeiro participam da fisiologia reprodutiva de fêmeas de *Z. subfasciatus*. Foram selecionados indivíduos imaturos que foram submetidos a condições controladas de umidade e temperatura, variando os fatores que possivelmente interferem na oviposição (macho e sementes de feijão, em várias combinações). Assim, foram verificados o número de ovos, o comportamento de oviposição diário por dez dias e a emergência de adultos após 25 dias da última medida de oviposição diária. Posteriormente foram realizados experimentos para a análise morfológica e molecular da ativação ovariana de fêmeas submetidas às combinações das variáveis. Para as análises morfológicas, as fêmeas foram dissecadas para a retirada dos ovários que foram processados (DAPI - faloidina) para microscopia de fluorescência. Para as análises moleculares, foram coletados ovários e carcaças de fêmeas dos quais foi extraído RNA total. Estas amostras foram utilizadas em ensaios de qPCR para determinar os níveis de transcrição do gene da vitelogenina (*Vg*) e de seu receptor (*VgR*), por serem importantes indicadores de capacidade reprodutiva. Os resultados das análises de fecundidade das fêmeas em diferentes condições sugerem que, sozinhas, as variáveis não são suficientes para induzir atividade de postura. Observou-se, também, que as fêmeas estão aptas para a reprodução no primeiro dia de vida adulta e mostram um período concentrado de oviposição nos primeiros 6 dias de vida. As análises morfológicas indicam que no início da vida adulta já acontece endocitose de *Vg* mediada pela ação de *VgR*, nos ovários (o que não acontece em pupas) e que a ativação ovariana diminui com o tempo. As análises moleculares mostraram que a vitelogênese (expressão de *Vg* em carcaça e do receptor de *Vg* em ovários) é promovida pela presença de hospedeiro e que a presença do macho estimula a síntese de *Vg* nos ovários.

Palavras-chave: Caruncho do feijão; hospedeiro; reprodução; oviposição.

ABSTRACT

The beetle *Zabrotes subfasciatus* is an insect that preys on stored grains, particularly beans (*Phaseolus vulgaris*). Therefore, understanding the biology of *Z. subfasciatus* allows the planning and adoption of sustainable grain control strategies. Despite its importance, there is little work developed on the parameters involving the biology of insect reproduction. Electroantennographic assays suggest that contact between *Z. subfasciatus* females and the host and males stimulates oogenesis and oviposition. However, the morphological and molecular dynamics of the ovarian ontogenesis of these insects in response to these stimuli is unknown. That said, we sought to determine how male and host participate in the reproductive physiology of *Z. subfasciatus* females. Immature individuals were selected and subjected to controlled humidity and temperature conditions, varying the factors that possibly interfere with oviposition (male and bean seeds, in various combinations). Thus, the number of eggs, daily oviposition behavior for ten days and the emergence of adults after 25 days of the last daily oviposition measurement were verified. Subsequently, experiments were carried out for the morphological and molecular analysis of ovarian activation in females subjected to combinations of variables. For morphological analyses, females were dissected to remove the ovaries that were processed (DAPI - phalloidin) for fluorescence microscopy. For molecular analyses, ovaries and carcasses of females were collected from which total RNA was extracted. These samples were used in qPCR assays to determine the transcription levels of the vitellogenin gene (*Vg*) and its receptor (*VgR*), as they are important indicators of reproductive capacity. The results of female fecundity analyses under different conditions suggest that, alone, the variables are not sufficient to induce egg-laying activity. It was also observed that females are ready for reproduction on the first day of adult life and show a concentrated period of oviposition in the first 6 days of life. Morphological analyses indicate that at the beginning of adult life, Vg endocytosis, mediated by the action of VgR, already occurs in ovarioles (which does not happen in pupae) and that ovarian activation decreases over time. Molecular analyses showed that vitellogenesis (expression of Vg in carcass and Vg receptor in ovaries) is promoted by the presence of the host and that the presence of the male stimulates the synthesis of Vg in the ovaries.

Keywords: Bean weevil; host; reproduction; oviposition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação de ovário de fêmeas de <i>Zabrotes subfasciatus</i>	15
Figura 2 - Representação da região apical de um ovaríolo meroístico telotrófico de um coleóptero com células nutridoras (trofócitos) em destaque.	16
Figura 3 - Regulação da captação de vitelogenina (Vg) por oócitos em maturação no sistema reprodutor de insetos.....	18
Figura 4 - Esquema do ciclo de vida de <i>Zabrotes subfasciatus</i>	20
Figura 5 - Vista dorsal mostrando o dimorfismo sexual de adultos de <i>Zabrotes subfasciatus</i>	21
Figura 6 - Fluxograma mostrando as abordagens experimentais desenvolvidas.	25
Figura 7 - Imagens do procedimento para a seleção de fêmeas virgens	26
Figura 8 - Delineamento experimental da análise do perfil de oviposição e fecundidade.....	27
Figura 9 - Fotos representativas de (A) Ovário de pupa fêmea (em estágio intermediário) de <i>Zabrotes subfasciatus</i> . (B) Ovário de fêmea de <i>Z. subfasciatus</i> com quatro dias de vida adulta. (C) Ovário de fêmea de <i>Z. subfasciatus</i> com oito dias de vida adulta.....	28
Figura 10 - Delineamento experimental a obtenção do material biológico das análises morfológicas e de transcrição gênica.....	29

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Número total de ovos colocados por fêmeas de <i>Zabrotes subfasciatus</i> em diferentes condições experimentais durante os primeiros 10 dias de vida adulta.....	35
Gráfico 2 - Perfil de oviposição de fêmeas de <i>Zabrotes subfasciatus</i> das diferentes condições apresentadas durante o período de oviposição.....	36
Gráfico 3 - Comparativo diário da oviposição de fêmeas de <i>Zabrotes subfasciatus</i> do grupo D com indivíduos emergentes das sementes do mesmo grupo durante o período de 10 dias.....	37
Gráfico 4 – Porcentagem de fêmeas de <i>Zabrotes subfasciatus</i> dos quatro grupos experimentais com oócitos em desenvolvimento nos ovários e com oócitos retidos no cálix dos ovários nos dias 1, 4 e oito de vida adulta.	39
Gráfico 5 - Comparativo dos níveis relativos de mRNA dos genes Vg e VgR nos ovários de fêmeas de <i>Zabrotes subfasciatus</i> dos quatro grupos experimentais durante o período de 24 horas, quatro e oito dias de vida adulta.....	41
Gráfico 6 - Comparativo da quantificação relativa do mRNA de gene de Vg nos ovários de fêmeas de <i>Zabrotes subfasciatus</i> dos grupos experimentais agrupados por dias de experimento.	42
Gráfico 7 - Comparativo da quantificação relativa do mRNA de gene de VgR nos ovários de fêmeas de <i>Zabrotes subfasciatus</i> dos grupos experimentais agrupados por dias de experimento.	43
Gráfico 8 - Comparativo da quantificação relativa do mRNA de gene de Vg e VgR nas carcaças de fêmeas de <i>Zabrotes subfasciatus</i> dos grupos experimentais durante o período de 24 horas, quatro e oito dias de vida.	45
Gráfico 9 - Comparativo da quantificação relativa do mRNA de gene de Vg nas carcaças de fêmeas de <i>Zabrotes subfasciatus</i> dos grupos experimentais agrupados por dias de experimento.	46
Gráfico 10 - Comparativo da quantificação relativa do mRNA de gene de VgR nas carcaças de fêmeas de <i>Zabrotes subfasciatus</i> dos grupos experimentais agrupados por dias de experimento.	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Sobre os insetos fitófagos	12
1.2	Insetos que atacam grãos armazenados	13
1.3	Bruquídeos e sementes armazenadas.....	13
1.4	Biologia reprodutiva de Bruquídeos.....	14
1.5	REGULAÇÃO DA VITELOGÊNESE EM INSETOS.....	17
1.6	Biologia de <i>Zabrotes subfasciatus</i>	19
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	22
3.	OBJETIVO	24
3.1	Objetivo geral	24
3.2	Objetivos específicos do período.....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	VISÃO GERAL.....	25
4.2	DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE OVIPOSIÇÃO E DE FECUNDIDADE DE FÊMEAS DE <i>ZABROTES SUBFASCIATUS</i>	27
4.3	Análises morfológicas DOS OVÁRIOS com DAPI-Faloidina.....	28
4.4	Análise de transcrição gênica	30
4.4.1	Extração de RNA total e síntese de cDNA	31
4.4.2	PCR quantitativa (qCPR) em tempo real	33
5	ANÁLISE E APRESENTAÇÃO DE DADOS	34
6	RESULTADOS	35
6.1	Perfil de oviposição e fecundidade de fêmeas de <i>Zabrotes subfasciatus</i>	35
6.2	Morfologia de ovários de fêmeas	37

6.3	NÍVEIS de transcrição dos genes <i>vg</i> e <i>vgR</i> em fêmeas	40
6.3.1	Ovários	40
6.3.2	Carcaça	44
6.3.3	Carcaças <i>versus</i> Ovários	48
7	DISCUSSÃO	50
8	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS	55
	APÊNDICE A – Tabelas referentes ao experimento comportamental	59
	APÊNDICE B – Tabelas referentes à análise morfológica de ovários	61
	APÊNDICE C – Tabelas referentes análise de transcrição dos genes <i>vg</i> e <i>vgR</i>	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 SOBRE OS INSETOS FITÓFAGOS

Os insetos pertencem à classe Insecta, que é a maior e bem diversificada classe dentro do filo Arthropoda (EGGLETON, 2020). Os insetos são animais que possuem grande importância ecológica, médica, econômica, social e até política, como por exemplo na ciclagem de nutrientes e polinização, quando são vetores de doenças e quando são predadores e invasores (EGGLETON, 2020; HURD, 2003; JONES, 2017; LOCKWOOD, 2012). Nos insetos podemos identificar diversas especializações alimentares, sendo algumas espécies mais generalistas que outras. Uma explicação para esta diversidade é que esses animais foram os primeiros a desenvolver voo, portanto se dispersaram e diversificaram seus nichos, de consumidores de materiais vegetais a parasitas de mamíferos, como cupins e percevejos (EGGLETON, 2020; REINHARDT, 2007). Os insetos que se alimentam de matéria vegetal, da semente armazenada à planta, são chamados de fitófagos.

Dentro da classe Insecta, a maior parte dos insetos fitófagos, ou herbívoros, pertencem às ordens Coleoptera, Diptera, Hemiptera, Hymenoptera e Lepidoptera (EGGLETON, 2020). Quase a metade das espécies de insetos herbívoros pertencem à Ordem Coleoptera. A ordem Coleoptera, conhecida popularmente por incluir os besouros, é a ordem de insetos com o maior número de espécies descritas, portanto, mais diversificado é o seu nicho ecológico (EGGLETON, 2020; MCKENNA *et al.*, 2019). As Superfamílias Chrysomeloidea e Curculionoidea formam um grande clado de espécies de hábito fitófago, o chamado Phytophaga (MCKENNA *et al.*, 2019). Este clado compreende grande parte de espécies conhecidas como pragas agrícolas, que atacam de plantações a grãos armazenados. Os Curculionoidea são o maior grupo de besouros e são representados por algumas famílias, dentre elas a Curculionidae que é a maior família. Chrysomeloidae, é composta por algumas famílias, dentre elas a família Chrysomelidae que é a segunda maior família dentro de Phytophaga (MCKENNA *et al.*, 2019). Dentro da família Chrysomelidae há gêneros de importância econômica, dentre eles alguns pertencentes à subfamília Bruchinae como *Callosobruchus* e *Zabrotes*, conhecidos como pragas de grãos armazenados.

1.2 INSETOS QUE ATACAM GRÃOS ARMAZENADOS

Com o crescimento da população humana, a demanda por alimento tem aumentado e, conseqüentemente, a produção agrícola, e isso exige que grãos e sementes sejam mantidos com perda mínima de qualidade e quantidade (massa), até o seu consumo (LORINI *et al.*, 2015). Porém, há insetos de hábito fitófago especializados em grãos armazenados, conhecidos como pragas de grãos e produtos armazenados que, em sua maioria, são pertencentes à ordem Coleoptera. As pragas comumente atacam *commodities* agrícolas duráveis (milho, feijão, arroz, soja, entre outros), secas, armazenadas, também produtos alimentícios de valor agregado e derivados não alimentares de produtos agrícolas em todo o mundo. Desta forma, as pragas contribuem para a perda de valor de produtos pela sua própria presença e de suas excreções, danificando diretamente as sementes e, também, provocando acúmulo de inseticidas químicos em alimentos, bem como a exposição humana a produtos químicos perigosos como resultado da tentativa de controle das próprias pragas (LORINI, 2015; PHILLIPS *et al.*, 2010).

A adequação de um determinado hospedeiro para o ataque de uma espécie é determinada pela composição bioquímica e características físicas das sementes e as características adaptativas desenvolvidas pelos besouros para lidar com o conteúdo tóxico de tais sementes (PAJNI, 1987). Neste sentido, segundo seus hábitos, as pragas podem ser divididas em primárias e secundárias. As primárias são aquelas que atacam grãos sadios, podendo perfurar e penetrar grãos para completar seu desenvolvimento e, também, alimentar-se, como, por exemplo, os coleópteros *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833), *Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763) e *S. zeamais* (Motschulsky, 1855). As pragas secundárias são aquelas que atacam grãos já danificados, como, por exemplo, o coleóptero *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (LORINI, 2015; HAGSTRUM, 2017).

1.3 BRUQUÍDEOS E SEMENTES ARMAZENADAS

Os Coleoptera pertencentes à família Chrysomelidae podem ser chamados de bruquídeos. Este é um grupo de besouros com baixa diferenciação genética e alto grau de similaridade interespecífica (PAJNI, 1987). O maior número de espécies vive nas regiões tropicais da Ásia, África e América Central e do Sul. Os bruquídeos possuem óbvia importância econômica, porque

se reproduzem em grãos de leguminosas e consomem proteínas valiosas que, de outra forma, seriam consumidas pelo homem. Outras espécies, no entanto, destroem as sementes de um imenso número de árvores leguminosas e arbustos que, embora não tenham valor econômico óbvio, impedem o avanço dos desertos nas áreas marginais de cultivo do mundo (SOUTHGATE, 1979). Portanto, os bruquídeos podem ser classificados como de armazenamento e de campo. Os de armazenamento consumindo sementes armazenadas após a colheita e os de campo estão associados às plantações (PAJNI, 1987).

Os bruquídeos de armazenamento estão diretamente associados a leguminosas, cujas sementes são utilizadas para oviposição e desenvolvimento. São animais que têm ciclos curtos de vida, e, como o suprimento de comida é abundante, a criação é contínua sem nenhuma interrupção e a fecundidade é alta (PAJNI, 1987). São exemplos comuns de bruquídeos os insetos dos gêneros *Callosobruchus*, *Zabrotes* e *Acanthoscelides* (HAGSTRUM *et al.*, 2017).

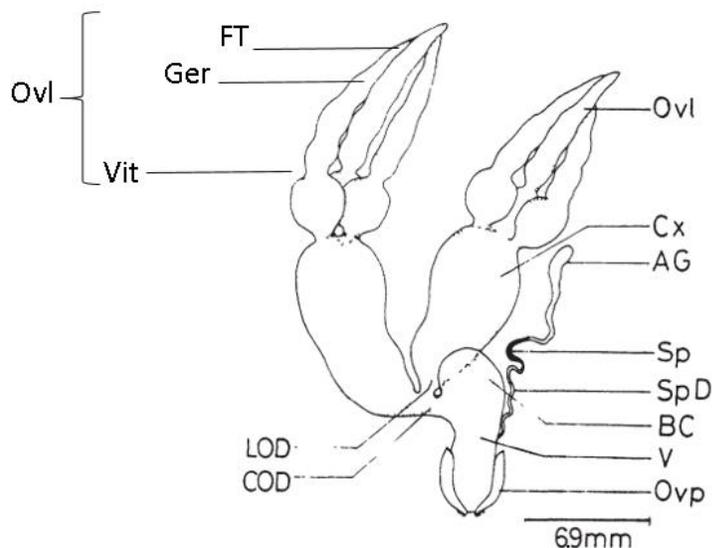
1.4 BIOLOGIA REPRODUTIVA DE BRUQUÍDEOS

Uma série de características estruturais da anatomia externa e interna relacionadas à biologia reprodutiva dos bruquídeos mostram algumas diferenças não só a nível de espécies e gêneros, mas também ao nível de subfamílias (PAJNI, 1987). Mas, no geral, eles possuem um ciclo de vida curto que varia entre 30 e 45 dias e possuem dimorfismo sexual. Os machos da maioria das espécies são polígamos, mas com capacidade variável na inseminação de fêmeas. Já as fêmeas variam entre monogamia e poliandria (PAJNI, 1987). Os bruquídeos são holometábolos, ou seja, possuem, assim como todos os coleópteros, metamorfose completa. Pelo curto ciclo de vida e acesso à alimentação, obtiveram sucesso reprodutivo em todos os continentes, exceto na Antártica (SOUTHGATE, 1979).

Devido à ampla diversidade dos bruquídeos, há diversas adaptações comportamentais nos adultos, que dependem do clima da região, como temperatura e umidade, e de características da planta hospedeira, como por exemplo a deiscência (SOUTHGATE, 1979). Sobre o comportamento de cópula, em geral, ocorre no decorrer de todo o dia, podendo haver monta ou não. Sobre o tempo de cópula, há também variações, por exemplo como ocorre em *Callosobruchus* e *Zabrotes subfasciatus* que possuem cópula de curta duração, cerca de 8 minutos, enquanto nas demais espécies pode variar entre 20 e 45 min (PAJNI, 1987).

Nos insetos, em geral, o sistema reprodutor é formado por um conjunto de órgãos localizados no abdome e sua forma e estrutura pode apresentar diferenças de acordo com a espécie (CHAPMAN, 2013). Por ser um grupo diverso, nos bruquídeos adultos há algumas variações anatômicas, particularmente nesses órgãos reprodutivos. Nos órgãos reprodutivos masculinos, os testículos são formados por dois pares de estruturas foliculares e o número de folículos em cada testículo e o número de glândulas acessórias masculinas variam entre os diversos gêneros. Por exemplo, existem 5 pares de glândulas acessórias em *Specularius*, 4-5 pares em *Callosobruchus* e 4 pares em *Zabrotes* (PAJNI, 1987). Os órgãos reprodutivos de fêmeas de insetos são geralmente constituídos por um par de ovários (**Figura 1**) formados por ovariolos que, por sua vez, são formados por unidades denominadas pedúnculo, pedicelo, vitelário, germário e filamento terminal. O número de ovariolos por ovário também é uma característica variável, desde 3 a 18 dependendo da espécie (CHAPMAN, 2013; PAJNI, 1987). A maturação dos ovos nos ovariolos acontece desde o filamento terminal ao vitelário (**Figura 1**).

Figura 1 - Representação de ovário de fêmeas de *Zabrotes*



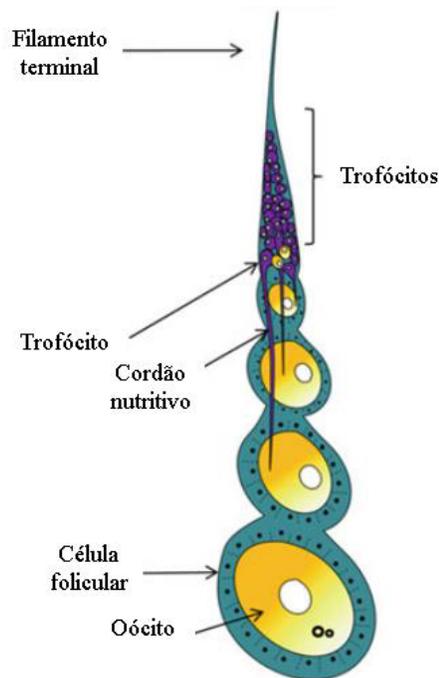
Fonte: KAUR *et al.*, 1999. Adaptado.

Legenda: Ovl= ovariolo; FT= filamento terminal; Ger= germário; Vit= vitelário; LOD= Oviduto lateral; COD= oviduto comum; Cx= cálix; AG= glândula acessória; Sp= espermateca; SpD= duto da espermateca; BC= bursa copulatória; V= vagina; Ovp= ovipositor. Fonte: KAUR *et al.*, 1999. Adaptado.

De acordo com a disponibilidade de nutrientes disponíveis para os oócitos, os ovários dos insetos podem ainda ser divididos, basicamente, em três tipos: (i) panoísticos, (ii) meroísticos

telotróficos e (iii) meroísticos politróficos. Em fêmeas de bruquídeos o ovário é do tipo meroístico telotrófico, com importantes células para o desenvolvimento dos oócitos, os trofócitos (**Figura 2**), ligadas por um cordão nutritivo aos oócitos, localizadas na região apical dos ovaríolos (CHAPMAN, 2013). Depois de nutridos, os oócitos se expandem, e mais tarde o ovo maduro sai do ovário, entra no oviduto e, em seguida para o oviduto comum onde ocorre a fertilização.

Figura 2 - Representação da região apical de um ovaríolo meroístico telotrófico de um coleóptero com células nutridoras (trofócitos) em destaque.



Fonte: FRUTTERO *et al.*, 2017. Adaptado.

Após a cópula e fertilização, as fêmeas ovipositam em cachos ou individualmente sobre a vagem ou semente variando os formatos de ovos de acordo com a espécie. A larva recém-eclodida, que se alimenta da casca do ovo, penetra na parede da vagem ou semente para encontrar seu alimento. Algumas larvas mais seletivas podem rastejar por várias sementes e, dependendo da espécie, podem ser necessários até quatro sementes para seu desenvolvimento (SOUTHGATE, 1979). Após um tempo também variável de desenvolvimento, as larvas sofrem metamorfose dando lugar ao período de desenvolvimento pupal. Em bruquídeos, há três formas de pupação: (i) dentro da semente que foi alimento durante o período larval, (ii) por meio de casulo dentro ou fora da

semente ou vagem e (iii) no solo (SOUTHGATE, 1979). O tempo de desenvolvimento pupal varia bastante de espécie para espécie. Em qualquer caso, das sementes ou vagem emergem os adultos, em número que também diverge entre as espécies, cerca de 1 a 28 por semente ou vagem (PAJNI, 1987).

1.5 REGULAÇÃO DA VITELOGÊNESE EM INSETOS

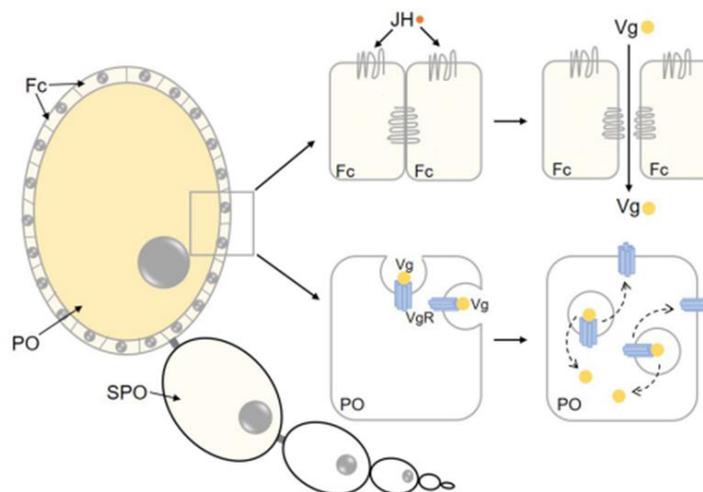
O controle de processos de desenvolvimento em insetos envolve cérebro, órgãos reprodutivos, tecido adiposo e sinais químicos que circulam no sangue, os hormônios (sexuais, relacionados ao desenvolvimento etc.) (CHAPMAN, 2013). Outros sinais químicos (feromônios e aleloquímicos), mediados por quimiorreceptores, são utilizados no controle da reprodução, de forma a regular comportamentos importantes, como a busca por sítios de oviposição, localização de parceiros, busca por fontes de alimentos, dispersão etc. (CHAPMAN, 2013).

O chamado mecanismo neuroendócrino, onde o sistema nervoso interage com o sistema endócrino, leva a uma regulação importante na metamorfose, morfogênese e reprodução. O controle da reprodução e do desenvolvimento em insetos é mediado por hormônios: neuropeptídeos, hormônios juvenis (HJ) e ecdisteróides (por exemplo a 20-hidroxiecdisona, 20E) (ROY, *et al.*, 2018). O hormônio juvenil (HJ) mantém características juvenis e previne a metamorfose antagonizando ações do 20E (que é a forma ativa da ecdisona, responsável pela metamorfose). Já, durante a reprodução dos insetos, o seu mecanismo de ação varia amplamente, podendo atuar indiretamente inclusive sobre as gônadas (LUO *et al.*, 2021). Os estímulos para a síntese de HJ variam de espécie para espécie e podem incluir fatores como disponibilidade de alimento, fotoperíodo, temperatura (NORIEGA, 2014; ZHOU *et al.*, 2000). Em *Drosophila*, o HJ regula um mecanismo importante na reprodução. Neste caso, a sinalização de hormônio juvenil induz a expressão de genes que contribuem para a formação ovariana de fêmeas e genes que também participam da contração do músculo ovariano, o que gera força mecânica para promover a ovulação (LUO *et al.*, 2021). A produção de ovos em insetos está, assim, sob regulação direta de fatores internos do animal, que sofrem influência de fatores externos, como disponibilidade de alimento, fotoperíodo, temperatura, alimentação e acasalamento (ENGELMANN, 1968).

Nos insetos holometábolos, como os bruquídeos, a ingestão de recursos energéticos, com a alimentação, estimula a liberação de neuro-hormônios e peptídeos semelhantes à insulina (ILPs) no cérebro e em vários tecidos periféricos. Este processo, em conjunto com o HJ e os ecdisteróides,

todos sob o controle de um sistema neuroendócrino comum, regulam diversos aspectos da reprodução, incluindo a síntese de glicofosfoproteínas essenciais para a nutrição dos oócitos, sendo a mais notável delas a vitelogenina (Vg) (ROY, *et al.*, 2018). A Vg é uma proteína do ovo de origem extra ovariana (corpo gorduroso) essencial na vitelogênese, que é a formação do vitelo, material nutritor composto de proteínas nesses animais e, conseqüentemente, de suma importância no desenvolvimento do embrião. Após secretada pelas células do corpo gorduroso, a vitelogenina é transportada pela hemolinfa e, antes da sua captação pelos oócitos em maturação, a Vg passa pelas células foliculares, e essa passagem é regulada pela ação do JH (TUFAIL *et al.*, 2014). Seguidamente, a Vg é internalizada pelos oócitos em desenvolvimento por endocitose mediada por receptores específicos (VgR: “vitellogenin receptor”) (WU *et al.*, 2021) (**figura 3**).

Figura 3 - Regulação da captação de vitelogenina (Vg) por oócitos em maturação no sistema reprodutor de insetos.



Fonte: WU *et al.*, 2021. Adaptado

Nota: A Vg passa entre as células foliculares, e tem sua entrada regulada pela ação de JH. Seguidamente, é internalizada pelos oócitos através de endocitose mediada por receptor (VgR). Em seguida, a Vg é separada de seu receptor, que é, então, reciclado para a membrana do oócito.

Legenda: Fc, células foliculares; PO, oócito primário; SPO, oócito sub-primário.

Uma vez no citoplasma do oócito, a Vg é armazenada em forma de vitelina (CHAPMAN, 2013). Nos insetos, em geral, os ovários vitelogênicos (com oócitos em maturação ou ovos maduros) tendem a apresentar tamanho aumentado quando comparados aos ovários que não

apresentam folículos em estágios de maturação, ou seja, quando não há incorporação de proteínas do ovo.

1.6 BIOLOGIA DE *Zabrotes subfasciatus*

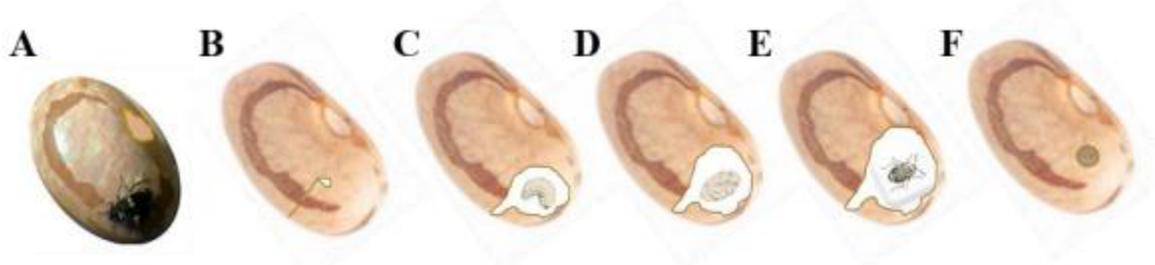
A espécie *Zabrotes subfasciatus* (BOHEMAM, 1833), pertencente à família Chrysomelidae e Subfamília Bruchinae (BOCAK *et al.*, 2014; BOUCHARD *et al.*, 2011), possui um ciclo de vida de cerca de 37 dias, e suas condições ótimas de desenvolvimento, essenciais para delimitar seu ciclo de vida, variam de 27°C a 32°C e Umidade Relativa superior a 70% (CORRÊA *et al.*, 2020; CREDLAND; DENDY, 1992; HOWE; CURRIE, 1964).

Em *Z. subfasciatus* a seleção do sítio adequado de oviposição é determinante para os imaturos, pois as larvas recém-eclodidas têm, relativamente, pouca mobilidade e dependem, para sua sobrevivência, dos recursos nutritivos selecionados pelas fêmeas adultas (DENDY; CREDLAND, 1991). *Z. subfasciatus* usam sementes de *Phaseolus vulgaris* como seu hospedeiro principal (PAJNI, 1987). Porém, quando dada a escolha entre diferentes espécies hospedeiras é capaz de usar espécies inicialmente rejeitadas para oviposição (TEIXEIRA E ZUCOLOTO, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2008; CORRÊA *et al.*, 2020).

A identidade de *Z. subfasciatus* pode ser estabelecida a partir da forma de seus ovos, que são esféricos em comparação com os ovos ovais de todas as outras espécies de bruquídeos. Esta espécie também é distinta na postura de ovos, os que são geralmente colocados na superfície das sementes ou vagens onde são cimentadas com a ajuda de secreção (PAJNI, 1987). Os ovos férteis (viáveis) são opacos e, quando não fecundados (inviáveis), translúcidos. O período embrionário, o desenvolvimento larval e pupal ocorrem dentro de uma única semente hospedeira e duram cerca de 25 dias (**Figura 4. A-B-C-D**) (CORRÊA *et al.*, 2020). O período embrionário dura aproximadamente 5 dias e o larval e pupal 14 e 6 dias, respectivamente. As larvas da espécie são do tipo curculioniforme (ápode, com cabeça distinta quitinizada), dotadas de mandíbulas desenvolvidas com as quais são capazes de romper os grãos perfurando seu tegumento para alimentação interna formando galerias. Dentro destas galerias, as larvas completam o desenvolvimento, consumindo, apenas, o conteúdo de uma semente (SOUTHGATE, 1979; CREDLAND; DENDY, 1992; PIMBERT; PIERRE 1983). Isto significa que no momento da oviposição, a mãe determina a quantidade e qualidade de alimento do imaturo, o que demonstra a relevância do comportamento de oviposição nesta espécie. Após o período de desenvolvimento

dentro da semente, o adulto pode sair da semente imediatamente ou permanecer nela alguns dias sem empurrar o opérculo ou janela circular que forma no grão antes de emergir (**Figura 4. F**). (SOUTHGATE, 1979; PAJNI, 1987).

Figura 4 - Esquema do ciclo de vida de *Zabrotes subfasciatus*.

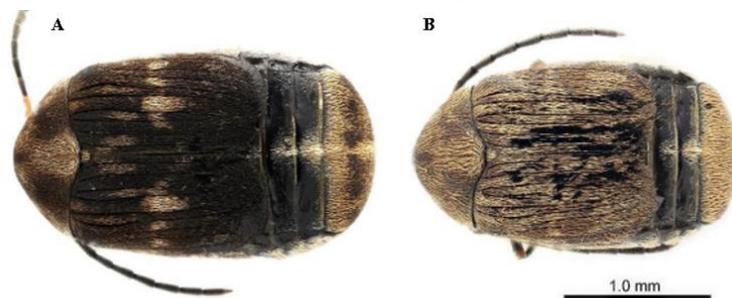


Fonte: CAPIZZANI, 2021.

Legenda: (A) Fêmea ovipositando, (B) larva penetrando no grão, (C) larva em desenvolvimento, (D) pupa em desenvolvimento, (E) inseto adulto pronto para sair do grão e (F) grão com janela circular formada para a saída do *Z. subfasciatus*.

Em sua fase adulta, que dura em média de 10 a 12 dias, *Z. subfasciatus* apresentam dimorfismo sexual. As fêmeas são maiores que os machos e apresentam manchas brancas no dorso, enquanto que os machos possuem uma cor acastanhada (**Figura 5**). O período de oviposição se concentra nos primeiros 6 dias de vida (TEIXEIRA *et al.*, 2009), com um pico de posturas entre o segundo e terceiro dia (HOWE; CURRIE 1964; MEIK; DOBIE 1986; TEIXEIRA *et al.*, 2009). Em condições laboratoriais, já foi comprovado que a alimentação do adulto é facultativa, pois os adultos podem produzir muitas gerações, sem se alimentarem (TEIXEIRA; ZUCOLOTO, 2003; CORRÊA *et al.*, 2020).

Figura 5 - Vista dorsal mostrando o dimorfismo sexual de adultos de *Zabrotes subfasciatus*.



Fonte: Adaptado de JOHNSON, A., 2019.

Legenda: A) fêmea e B) macho.

Durante o período reprodutivo, os indivíduos adultos de *Z. subfasciatus* apresentam um comportamento de antenação e movimentação dos machos em direção às fêmeas, sendo as fêmeas mais jovens, 1 a 5 dias de idade, as mais atrativas. Esse comportamento é seguido de monta e cópula, na maioria das vezes (PIMBERT, 1987; PIMBERT; POUZAT, 1988).

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Z. subfasciatus são Bruquídeos de armazenamento (PAJNI, 1987), popularmente conhecidos como caruncho, gorgulho ou broca do feijão, identificados como uma das principais pragas de grãos armazenados. Seu centro de origem são as regiões tropicais e subtropicais das Américas Central e do Sul e usa como hospedeiro, principalmente, o feijão da espécie *Phaseolus vulgaris* L. (TEIXEIRA *et al.*, 2008). Devido à importância econômica e nutricional do feijão, que é considerado como importante fonte de proteína em muitas populações, *Z. subfasciatus* é tida como uma ameaça econômica e social pois é uma das maiores pragas dessa leguminosa, responsável por danos diretos e indiretos em seu cultivo, armazenamento e comércio. Há relatos também da introdução de *Z. subfasciatus* em muitos países da Europa e Ásia por meio de feijões infestados, onde tem ocasionalmente ampliado seu registro de hospedeiros, tornando-se também uma praga séria de diversos tipos de Fabaceae (MEIK; DOBIE, 1986; XU, 2012).

Como *Z. subfasciatus* possui um relativamente curto ciclo de vida, o que favorece sua rápida infestação em grãos estocados (CORRÊA *et al.*, 2020), os prejuízos na pós-colheita e armazenamento das sementes traduzem-se em uma considerável redução de peso devido o consumo pelas larvas, que formam galerias no grão. Isto acarreta a diminuição da qualidade nutricional e declínio do poder germinativo, pois quando as larvas infestam uma semente tendem a consumir praticamente todos os cotilédones, removendo assim sua possível chance de germinação. Além disso há depreciação comercial devido à presença de insetos adultos ou imaturos, fragmentos e excrementos (LORINI, 2015; PHILLIPS, 2010; SOUTHGATE, 1979). A estes prejuízos somam-se os danos indiretos, pelo favorecimento da entrada de ácaros e microrganismos, principalmente fungos (LORINI, 2015; PHILLIPS, 2010).

Apesar da sua importância biológica e econômica, poucos trabalhos foram realizados com a finalidade de investigar a biologia de *Z. subfasciatus*, fundamental para o planejamento de estratégias de controle de infestação de grãos (TEIXEIRA *et al.*, 2009; TEIXEIRA; ZUCOLOTO, 2012). Uma das questões mais importantes para o desenvolvimento de *life-history traits* desta espécie refere-se à dinâmica morfológica e molecular da ontogênese ovariana e como esta se comporta em resposta a estímulos ambientais. Nesta espécie, além da temperatura e a humidade, estes estímulos estão basicamente representados pela disponibilidade de hospedeiro e presença de parceiro sexual. Ensaio eletroantegráficos sugerem que um dos fatores estimulantes seria o contato das fêmeas com o substrato de oviposição, ou seja, as sementes dos hospedeiros

(PIMBERT; POUZAT, 1988). A presença do macho, e conseqüentemente o acasalamento, também pode exercer forte influência sobre a ovogênese (PIMBERT, 1987; PIMBERT; POUZAT, 1988). **Neste trabalho testamos a hipótese de que tanto a presença do hospedeiro quanto a do macho são necessárias para a ativação do ovário adulto de fêmeas do inseto fitófago, predador de sementes armazenadas, o bruquídeo *Z. subfasciatus*.**

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Testar os efeitos da presença do macho e do hospedeiro (*P. vulgaris*) sobre o desenvolvimento do ovário adulto de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO PERÍODO

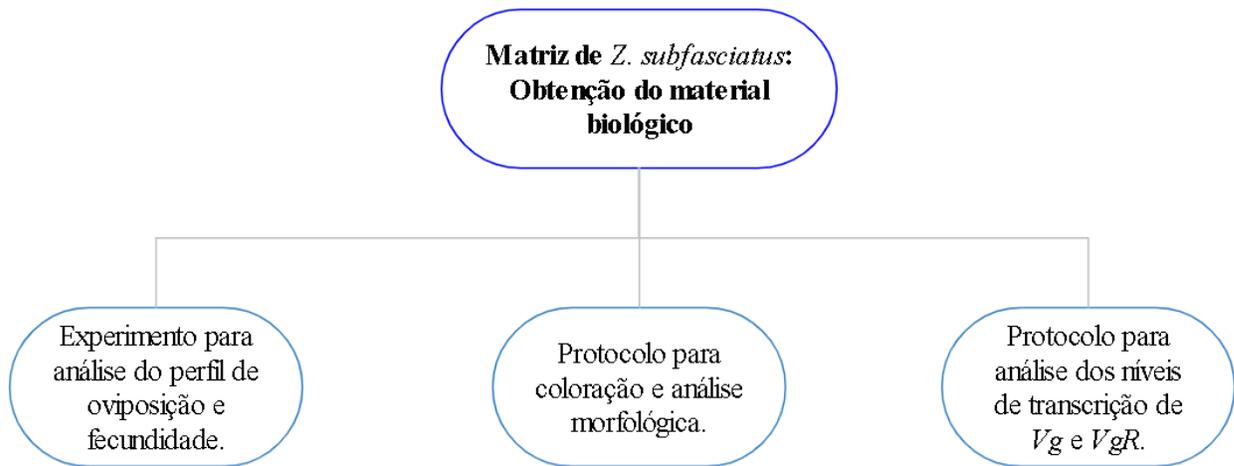
- a) Determinar o perfil de oviposição de fêmeas com privação de machos e/ou hospedeiro nos primeiros 10 dias de vida adulta.
- b) Determinar o comportamento diário de oviposição e a fecundidade de fêmeas com privação de machos e/ou hospedeiro nos primeiros 10 dias de vida adulta.
- c) Determinar o estado de desenvolvimento ovariano de fêmeas com privação de machos e/ou hospedeiro nos primeiros 10 dias de vida adulta.
- d) Determinar os níveis de transcrição do gene da vitelogenina (vg) e do gene do receptor de vg nos ovários e corpo gorduroso de fêmeas submetidas a condições de privação de macho e/ou hospedeiro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 VISÃO GERAL

Para alcançar os objetivos traçados, foram delineados três experimentos inicialmente realizados no Laboratório de Biologia do Instituto Federal do Sul de Minas, Campus de Poços de Caldas-MG (**Figura 6**). Para a obtenção do material biológico foram utilizadas matrizes de *Z. subfasciatus* mantidas em feijão *P. vulgaris* no Instituto Federal do Sul de Minas, campus de Poços de Caldas-MG, sob responsabilidade da Prof^a. Dra. Isabel R. do Valle Teixeira, mantidas em condições controladas de temperatura (30° C) e umidade (70%). Como substrato de oviposição foram utilizadas sementes de *P. vulgaris* livres de contaminação, com origem em um mesmo lote obtidos no mercado municipal de Poços de Caldas, MG.

Figura 6 - Fluxograma mostrando as abordagens experimentais desenvolvidas.



Fonte: Elaboração própria.

Nota: A obtenção do material biológico a partir da matriz de *Z. subfasciatus* não foi concomitante para os três experimentos.

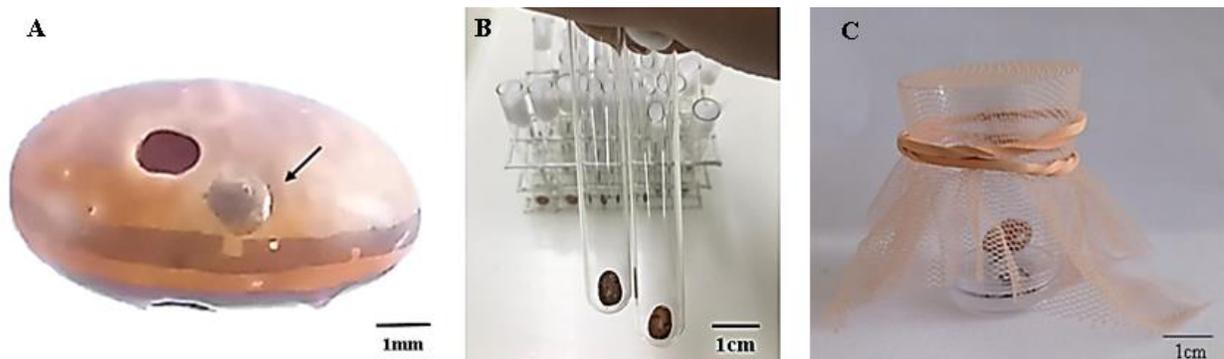
Para testar a influência dos diferentes fatores sobre a oviposição das fêmeas adultas nos três experimentos, foram utilizadas fêmeas virgens de *Z. subfasciatus*. Para a seleção de fêmeas virgens, diversas sementes individuais de feijão infestado com possíveis emergentes foram alocadas em tubos de ensaio (de 10 mL) vedados com algodão (**Figura 7 - B**). As sementes com possíveis emergentes apresentam opérculos escurecidos e ainda não rompidos (**Figura 7 - A**). Todos os tubos de ensaio com possíveis emergentes foram mantidos sob as mesmas condições ambientais

controladas de umidade (70%) e temperatura (30°C) em estufa BOD (Eletrolab modelo EL101/03), condições ótimas para o desenvolvimento da espécie (HOWE; CURRIE, 1964; TEIXEIRA; ZUCOLOTO, 2003; CORRÊA *et al.*, 2020). Em seguida, após a emergência, fêmeas, machos e hospedeiro foram colocados individualmente em potes acrílicos (de 3,5 cm de altura, com 2 cm de base e 3 cm de diâmetro de abertura superior) vedados com tecido tule de malha fina preso com elástico (**Figura 7 - C**) e separados nos seguintes grupos experimentais:

- Grupo A: Fêmeas.
- Grupo B: Fêmeas com machos, sem hospedeiro.
- Grupo C: Fêmeas com hospedeiro, sem machos.
- Grupo D: Fêmeas com machos e hospedeiro.

O número de indivíduos para cada grupo experimental foi previamente definido para cada um dos protocolos das três análises experimentais: Para o estudo do perfil de oviposição e fecundidade, foram selecionadas 72 fêmeas recém-emergidas e 36 machos. Na análise morfológica, foram escolhidas 120 fêmeas recém-emergidas, 60 machos e 10 pupas em fase intermediária (corpo com algumas estruturas como patas e regiões próximas à cabeça inicialmente pigmentadas). Já nas análises de transcrição, foram selecionadas 180 fêmeas recém-emergidas, 90 machos e 15 pupas em estágio intermediário.

Figura 7 - Imagens do procedimento para a seleção de fêmeas virgens



Fonte: Elaboração própria

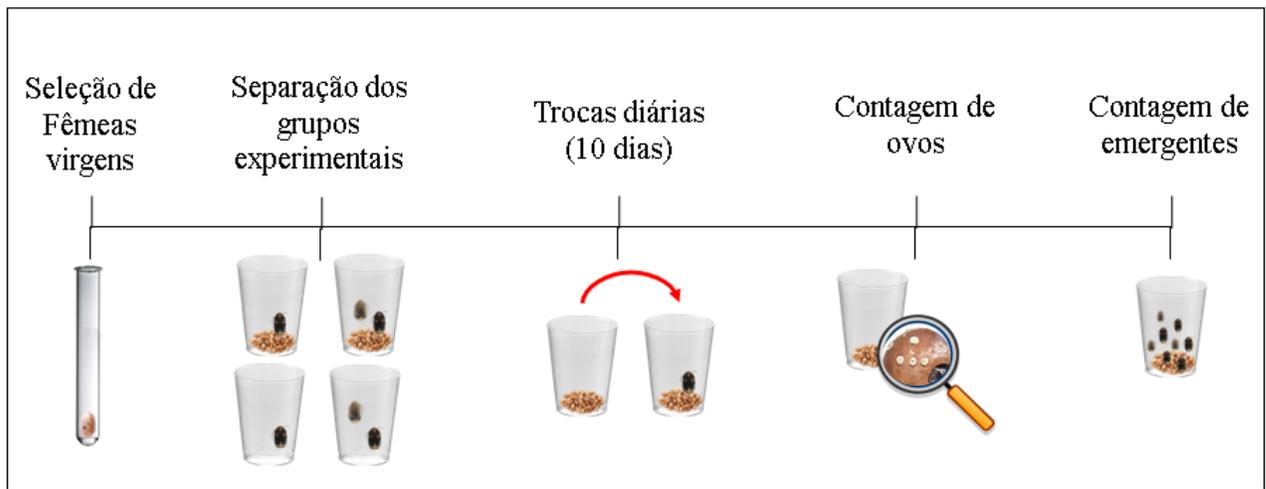
Legenda: (A) Indicação de opérculo com possível emergente. (B) Sementes com possíveis emergentes isoladas em tubos de ensaio. (C) Pote acrílico vedado com tule.

4.2 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE OVIPOSIÇÃO E DE FECUNDIDADE DE FÊMEAS DE *ZABROTES SUBFASCIATUS*

Para determinar o perfil de oviposição, comportamento diário de oviposição e a fecundidade de fêmeas com privação de machos e/ou hospedeiro nos primeiros 10 dias de vida adulta, setenta e duas fêmeas virgens foram selecionadas para os grupos experimentais. Sendo dezoito repetições (uma fêmea por pote/repetição) por grupo e trinta e seis machos nos dois grupos B e D. Nos grupos com hospedeiro, foram utilizados 10 grãos de feijão em cada pote para padronização e para garantir disponibilidade suficiente de substrato para oviposição de fêmeas com a presença de hospedeiro, visto que, como observado em condições laboratoriais, as fêmeas ao escolher os recursos disponíveis para a prole ovipositam uma média de 10 ovos a cada 24 horas (DENDY; CREDLAND, 1991). Então, isso aumentaria a probabilidade de eclosões.

Após montados os experimentos, a cada 24 horas, se trocavam os recipientes por outros com a mesma quantidade de hospedeiro, sendo estes novos, não infestados, para se ter certeza da quantidade de ovos colocados diariamente. Após 10 dias da última troca, quando os ovos se tornam mais visíveis, foi feita a contagem de ovos depositados em cada recipiente e hospedeiro. E após 25-26 dias da última troca, foi realizada a contagem de emergentes no grupo D (para obter uma estimativa indireta da fecundidade possibilitada pela condição experimental), o único que possibilitaria a emergência de novos insetos (**Figura 8**).

Figura 8 - Delineamento experimental da análise do perfil de oviposição e fecundidade.

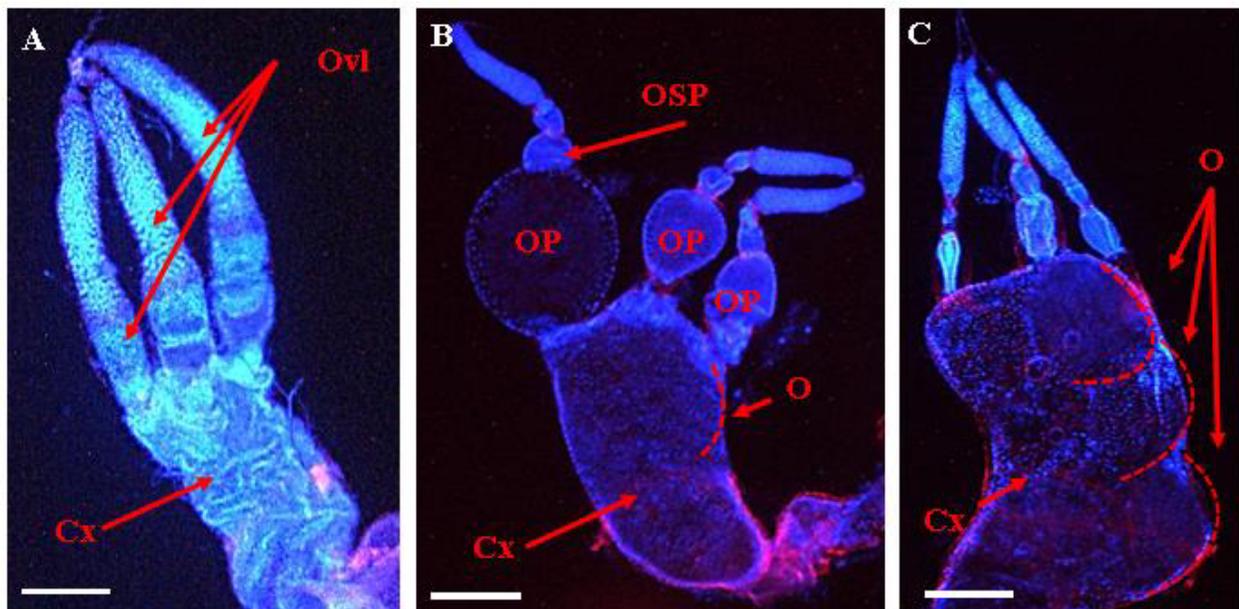


Fonte: Elaboração própria.

4.3 ANÁLISES MORFOLÓGICAS DOS OVÁRIOS COM DAPI-FALOIDINA

O estado de maturação dos ovários das fêmeas representa uma característica biológica ligada à reprodução, podendo servir como um indicativo dos efeitos da presença do macho e do hospedeiro no seu sucesso reprodutivo. Insetos holometábolos, como *Z. subfasciatus*, acumulam reservas corporais para suprir suas necessidades energéticas na reprodução. Em insetos holometábolos a maturação ovariana deve ocorrer durante o desenvolvimento pós-embriônico, no final do período de maturidade adulta ou nas primeiras horas após a emergência do adulto (JERVIS, 2007). No entanto, ainda não compreendemos completamente como isso ocorre ao longo da vida adulta do inseto das fêmeas de *Z. subfasciatus*. Nesse sentido, foram registrados dois indicativos de maturação ovariana, a presença de oócitos nos ovaríolos e a retenção de oócitos no cálix (Figura 9) de fêmeas sob condições de privação de macho e/ou hospedeiro em diferentes idades.

Figura 9 - Fotos representativas de (A) Ovário de pupa fêmea (em estágio intermediário) de *Zabrotes subfasciatus*. (B) Ovário de fêmea de *Z. subfasciatus* com quatro dias de vida adulta. (C) Ovário de fêmea de *Z. subfasciatus* com oito dias de vida adulta.

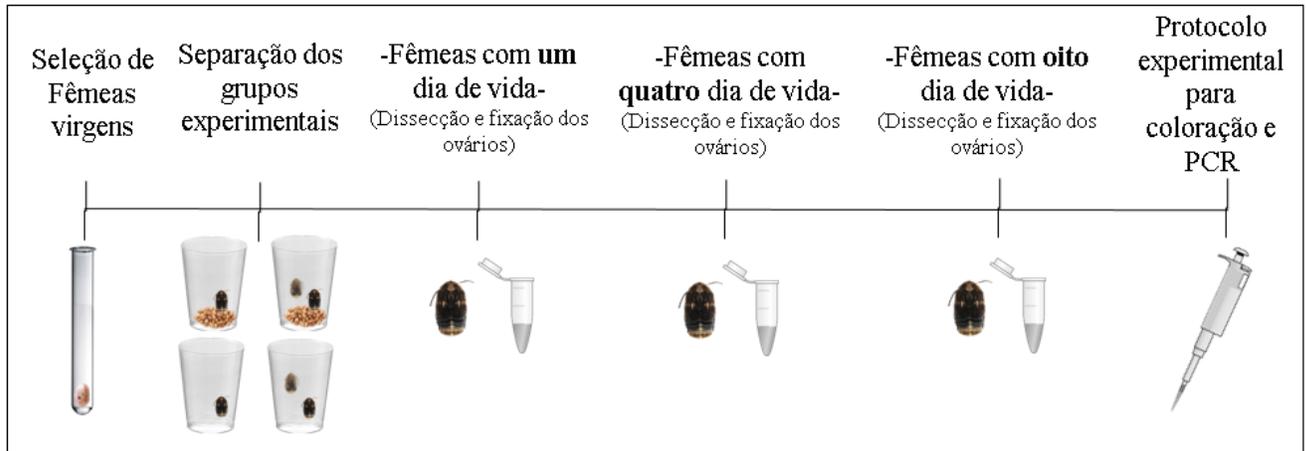


Fonte: Elaboração própria

Legenda: Ovários de fêmeas de *Z. subfasciatus* processados com DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, para núcleo) (azul) e Faloidina/Alexa (vermelho) para microscopia de fluorescência. Cx= cálix; Ovl = Ovariolo; O= Oócito; OSP= Oócito sub-primário (anterior ao primário); OP= Oócito primário, por estar mais próximo ao cálix (Classificação adaptada de WU *et al.*, 2021 e KAUR *et al.*, 1999). (A) Ovário de pupa sem a presença de oócitos em desenvolvimento nos ovaríolos e sem retenção de oócitos no cálix. (B) Ovário com a presença de oócitos em desenvolvimento nos ovaríolos e com retenção de oócito no cálix. (C) Ovário sem a presença de oócitos em desenvolvimento nos ovaríolos e com retenção de oócitos no cálix. Escala: 200 μ m.

Para esta etapa e para a etapa posterior, a análise de transcrição gênica, o delineamento experimental foi semelhante (**Figura 10**), variando apenas o número de animais utilizados nos grupos experimentais.

Figura 10 - Delineamento experimental a obtenção do material biológico das análises morfológicas e de transcrição gênica



Fonte: Elaboração própria

Para determinar o estado do desenvolvimento ovariano, 10 Pupas fêmeas e fêmeas com 0 a 24 horas, 4, e 8 dias de vida de cada grupo experimental (10 repetições/dia para cada grupo) foram dissecadas sob estereomicroscópio (Carl Zeiss- Stemi 305) para a obtenção de ovários. Esta fase do experimento foi realizada no Laboratório de Biologia do Instituto Federal do Sul de Minas, campus de Poços de Caldas-MG. Houve o acompanhamento diário das condições ambientais necessariamente até o décimo dia de vida adulta de cada fêmea, sendo feitas as dissecções nos dias propostos (1, 4, e 8).

O experimento foi realizado em duas rodadas sucessivas para viabilizar o espaço da estufa BOD na obtenção dos animais e manutenção do experimento. Inicialmente foram separados 60 potes, 13 estantes para tubos de ensaio e 300 tubos de ensaio para posterior utilização. Então 300 sementes com possíveis emergentes foram colocadas em tubos de ensaio para a obtenção de fêmeas para dois dos quatro grupos experimentais (Somente com Fêmeas e o outro com Fêmeas e machos). Os tubos foram colocados em uma estufa com temperatura e umidade controladas.

Após 24 horas, as fêmeas emergentes foram alocadas nos dois grupos descritos anteriormente. Posteriormente, as fêmeas foram colocadas em bandejas plásticas na estufa com

temperatura e umidade controladas. As fêmeas de 0 a 24 horas de vida adulta foram retiradas dos potes, dissecadas e foi feita a separação de ovariolos e carcaças (de 20 fêmeas, sendo 10 de cada uma das duas condições). Isso foi feito com as amostras obtidas nos dias sucessivos (4, e 8 dias de vida adulta).

A segunda rodada de experimentos foi realizada logo em seguida da primeira e se deu da mesma forma para os outros dois dos quatro grupos experimentais (Um somente com Fêmeas e hospedeiro e o outro com Fêmeas, machos e hospedeiro).

Realizamos ensaios de coloração com os fluoróforos DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma- 81271), para a marcação de núcleos, e a Faloidina conjugada a Alexa 546 (Invitrogen), para marcação de F-actina, o que revela, fundamentalmente, citoplasmas. Este experimento foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Biologia Experimental (CEBIOEX, Campus Santa Clara) da Universidade Federal de Alfnas (UNIFAL-MG).

Os ovários das fêmeas foram dissecados em solução de tampão fosfato 1x *Phosphate Buffered Saline* (PBS, *Sigma Aldrich*, UK: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM). Os ovários foram fixados por 24 horas em 200 µL de N-Heptano (Vetec-920178) /formaldeído (Proquímicos-10/0010) 37% a 4 °C. Então foram lavados (duas vezes, por cinco minutos) em PBS com Triton X-100 (PBST 0,5%) e incubados (20 min. em temperatura ambiente) com faloidina/alexa 1:500 v/v em PBST e cobertos com papel alumínio. Em seguida, foram lavados (três vezes, por cinco minutos) com solução PBST e incubados (quatro minutos) com solução contendo DAPI na concentração de 1:2000 v/v em PBST. Posteriormente foram lavados (três vezes, por dez minutos) em PBST e foram montadas as lâminas em glicerol 80% e examinadas em microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i) e foi confeccionada uma tabela com os dados de presença e retenção.

4.4 ANÁLISE DE TRANSCRIÇÃO GÊNICA

As pupas fêmeas e as fêmeas com 1, 4, e 8 dias de vida de cada grupo experimental foram dissecadas sob estereomicroscópio (Carl Zeiss- Stemi 305) para a obtenção de ovários e de carcaças abdominais, que foram colocados em TRIzol® (5 pares de ovários por tubo e cinco carcaças por

tubo) e armazenados a -20°C até a extração do RNA total. Esta fase do experimento foi realizada no Laboratório de Biologia do Instituto Federal do Sul de Minas, campus de Poços de Caldas-MG. Houve o acompanhamento diário das condições ambientais necessariamente até o décimo dia de vida adulta de cada fêmea, sendo feitas as dissecções nos dias propostos (1, 4, e 8).

Assim como na etapa anterior, o experimento foi realizado em duas rodadas sucessivas. Inicialmente foram separados 90 potes, 13 estantes para tubos de ensaio e 300 tubos de ensaio para posterior utilização. Então 300 sementes com possíveis emergentes foram colocadas em tubos de ensaio para a obtenção de fêmeas para dois dos quatro grupos experimentais (Somente com Fêmeas e o outro com Fêmeas e machos). Os tubos foram colocados em uma estufa com temperatura e umidade controladas.

Após 24 horas, as fêmeas emergentes foram alocadas nos dois grupos descritos anteriormente, 45 repetições para cada condição. Posteriormente, foram colocadas em bandejas plásticas na estufa com temperatura e umidade controladas. As fêmeas de 0 a 24 horas de vida adulta foram retiradas dos potes, dissecadas e foi feita a separação de ovariolos e carcaças (de 30 fêmeas, sendo 15 de cada uma das duas condições), com o auxílio de pinças de relojoeiro número 5 e pinça Bishop em PBS (*Phosphate Buffered Saline*; Sigma Aldrich, UK). Cada material foi colocado em tubos Axygen de 1,5 mL com 200 μL de TRIzol® e, assim, armazenado em freezer a -20°C , como mencionado antes. Isso foi feito com as amostras obtidas nos dias sucessivos (4, e 8 dias de vida adulta).

A segunda rodada de experimentos foi realizada logo em seguida da primeira e se deu da mesma forma para os outros dois dos quatro grupos experimentais (Um somente com Fêmeas e hospedeiro e o outro com Fêmeas, machos e hospedeiro).

Por fim, como grupo controle, foram também dissecadas 15 pupas fêmeas (fase intermediária) e seu material foi alocado em seis tubos Axygen (três para carcaça e três para ovários) de 1,5 mL com 200 μL TRIzol® e armazenados a -20°C até a extração do RNA total.

4.4.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Para determinar os níveis de transcrição da *vg* no corpo gorduroso e dos receptores de *vg* nos ovários de fêmeas, foi extraído o RNA total das amostras obtidas como descrito anteriormente e, em seguida, sintetizado o DNA complementar para a determinação dos níveis de transcrição por PCR em tempo real (qPCR). Essa fase do experimento foi realizada no Laboratório de Biologia

Molecular do Centro de Biologia Experimental (CEBIOEX, Campus Santa Clara) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

Para a extração de RNA total, as amostras em TRIzol (200 μ L) foram maceradas manualmente com pistilo e incubadas em temperatura ambiente por cinco minutos em TRIzol (completando até atingir o volume de 1 mL). Adicionou-se clorofórmio (Synth- 150822) (200 μ L) às amostras que então foram incubadas à temperatura ambiente (3 min.). Em seguida, foram centrifugadas (Centrífuga Refrigerada Sorvall Legend X1R – Thermo Scientific) (12000 xg, 15 min., a 4°C) e foi retirada (e colocada em novos tubos) a fase superior formada em cada um dos tubos das amostras, fase que continha clorofórmio e RNA. Em novos tubos (Axygen) de 1,5 mL contendo somente a fase superior foram adicionados 500 μ L de álcool isopropílico (Merck - K42983634) gelado, para precipitação do RNA e foram incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente. Aos dois tubos contendo amostras de ovários, por serem amostras menores, foram acrescentados 10 μ L de solução de glicogênio (1 μ g/ μ L) (Invitrogen- 518266). Todas as amostras foram então armazenadas em ultra freezer -80°C por 24 horas.

Após 24 horas, as amostras foram centrifugadas (12000 xg, 10 min., a 4°C), retirou-se o sobrenadante, permanecendo no tubo apenas o *pellet*. Ao *pellet* foi adicionado 1 mL de etanol (Synth - 141833) 75% e em seguida, foram centrifugadas (7500 xg, 5 min., a 4°C). Foi retirado e descartado o sobrenadante e, para secar o *pellet*, os tubos foram colocados no Termobloco (Cienlab Dry-Block) (58°C). Posteriormente foi realizada a quantificação do RNA (1,5 μ L da amostra) em Espectrofotômetro (NanoDrop 2000 – Thermo Scientific).

A síntese de DNA complementar foi feita de acordo com o sistema de síntese GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, A5000). Em seguida os tubos foram armazenados em um freezer a -20°C.

Para a determinação dos níveis de transcrição de *vg* e de *vgR* foram utilizados *primers* (Síntese Biotecnologia, <https://sintesebiotecnologia.com.br/>) (**Tabela 1**) para genes de uma das isoformas de vitelogenina que possui atividade relacionada à reprodução em insetos (Rodrigues *et al.*, em elaboração). Esses *primers* foram desenhados a partir de dados FASTA obtidos após o sequenciamento de transcriptomas de *Z. subfasciatus* por pesquisadores do Grupo de Pesquisa Biologia da Socialidade da Universidade Federal de Alfenas. Como controle de níveis de transcrição foram utilizados *primers* para o gene codificador da proteína ribossomal 32 (*rpl32*) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Descrição dos primers (vg, receptor de vg e controle) utilizados.

Nome	Abreviação	Primers (5'-3')	Tamanho do fragmento
Vitelogenina, gene 1, isoforma 1	Vg.g1.i1	F = CCATCCAGAACTGGATTCTC R = ATGAACGAGCTCGGTGTATG	197 pb
Receptor de Vitelogenina, gene 1, isoforma 1	REVG.g1.i1	F = GGATACCGATGGACACGTTT R = TTCTGACTACGGTTGGTGTG	137 pb
Proteína ribossomal L32	rpl32	F = TACACAACGTGAGGGAAGT R = AGCATGTCCGTTTCGTTACTC	146 pb

Fonte: RODRIGUES *et al.*, 2023

Legenda: Características dos oligonucleotídeos utilizados em nossos experimentos de qPCR para amplificar regiões codificantes dos genes selecionados. Todos com Tm de 60°C e, para todos os três genes o superior é o *forward* (F) e o inferior, o *reverse* (R). O tamanho do fragmento é dado em pares de base (pb).

4.4.2 PCR quantitativa (qCPR) em tempo real

Para analisar os níveis de transcrição de *vitelogenina* e de seu receptor na carcaça e ovários das fêmeas foi realizada PCR em Tempo Real. Para isso foram seguidos os seguintes passos e desenho experimental: Utilização do desenho experimental das placas com 96 poços. Sendo necessário utilizar seis placas com essa conformação, três placas para analisar os três genes na carcaça/grupo/dia e outras três placas para analisar os três genes nos ovários/grupo/dia.

Para cada um dos três genes (nos dois tecidos) foi preparado um Mix contendo 410 µL de Sybr, 303,4 µL de água de injeção, 32,8 µL de primer F e 32,8 µL de primer R. Em cada um dos 80 poços de cada gene (para cada tecido) foram colocados 9,5 µL do Mix preparado anteriormente. Em todos os poços (exceto NTC e suas réplicas técnicas) foi acrescentado 0,5 µL de cDNA da amostra (diluída 5 vezes). A placa então foi vedada com adesivo (MicroAmp) e colocada no bloco do equipamento de PCR em tempo real QUANTSTUDIO™3, onde foi realizada a reação de amplificação.

5 ANÁLISE E APRESENTAÇÃO DE DADOS

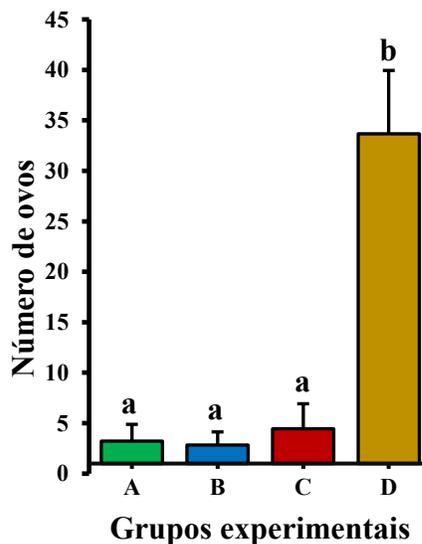
Para avaliar as características de distribuição dos dados provenientes das análises de perfil de oviposição, morfológica e de níveis de transcrição, realizou-se uma verificação de normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. No que diz respeito ao perfil de oviposição e às amostras quantitativas (dados qualitativos transformados em binários, com 1 indicando presença/retenção e 0 indicando ausência) de oócitos nos ovários, aplicou-se o teste de variância (ANOVA), seguido pelo teste Tukey. Para as análises de fecundidade do grupo experimental D (fêmea, macho e hospedeiro) em relação ao número de ovos por dia, utilizou-se o teste T. Para as amostras qualitativas intragrupo de presença e retenção de oócitos nos ovários, bem como para os dados dos níveis de transcrição de Vg e VgR , foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis (KRUSKAL; WALLIS, 1952), seguido de testes *post hoc*. Na análise qualitativa, foi utilizado o teste *post hoc* *Dwass-Steel-Critchlow-Fligner* (DSCF). Já na análise dos níveis de transcrição, foi utilizado o teste Dunn como *post hoc* para identificar diferenças significativas entre os grupos.

6 RESULTADOS

6.1 PERFIL DE OVIPOSIÇÃO E FECUNDIDADE DE FÊMEAS DE *Zabrotes subfasciatus*

Os resultados dos experimentos de análise do perfil de oviposição indicam que as fêmeas do grupo D, onde estavam presentes todas as condições (macho e feijão) durante todo o período do experimento, apresentaram uma média total de postura de ovos de 34 ± 6 ovos, superior à dos demais grupos. Nos grupos B e C, onde as variáveis estavam isoladas, assim como no grupo A, observou-se atividade de postura, embora esta fosse baixa, com uma média geral de $3,5 \pm 0,6$ ovos. Não se constatou diferença estatística entre as médias de ovos colocados pelas fêmeas dos grupos A, B e C (**Gráfico 1**).

Gráfico 1 - Número total de ovos colocados por fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* em diferentes condições experimentais durante os primeiros 10 dias de vida adulta



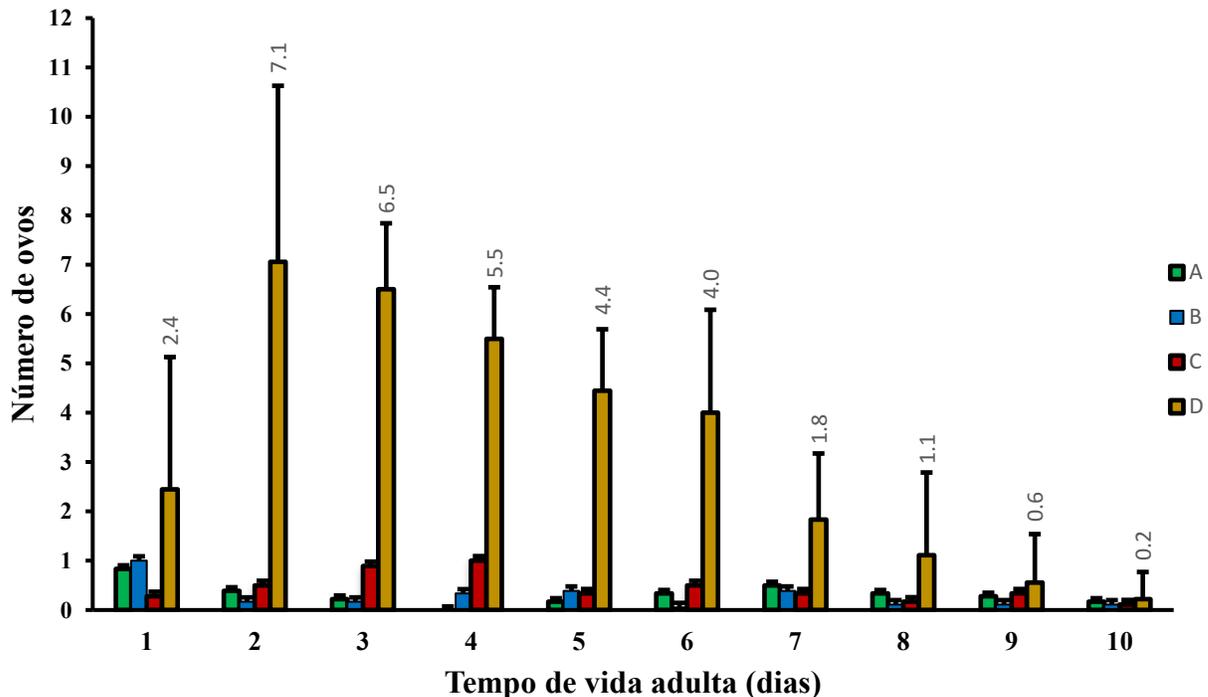
Fonte: Elaboração própria

Legenda: As barras indicam média do número de ovos + DP. Combinações de testes ANOVA provaram que as distribuições são diferentes entre si (a e b: $p < 0,05$). Grupo A: Só Fêmeas; Grupo B: Fêmeas com machos; Grupo C: Fêmeas com hospedeiro; Grupo D: Fêmeas com machos e hospedeiro.

Ainda sobre os grupos A, B e C (grupos de fêmeas, fêmeas com hospedeiro e fêmeas com machos, respectivamente), no decorrer dos 10 dias, eles apresentaram um pico de oviposição (maior média) em dias diferentes: os grupos A e B no primeiro dia e o grupo C no quarto dia de experimento. Já o grupo D (com fêmea, macho e hospedeiro) mostrou o pico de oviposição no segundo dia de experimento. Com relação ao perfil de oviposição durante o período estudado, os

grupos A, B e C apresentaram alguma postura de ovos durante os 10 dias de experimento, já o grupo D possui uma maior postura de ovos mais concentrada nos seis primeiros dias de experimento, decaindo consideravelmente a partir do sétimo dia (**Gráfico 2**).

Gráfico 2 - Perfil de oviposição de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* das diferentes condições apresentadas durante o período de oviposição



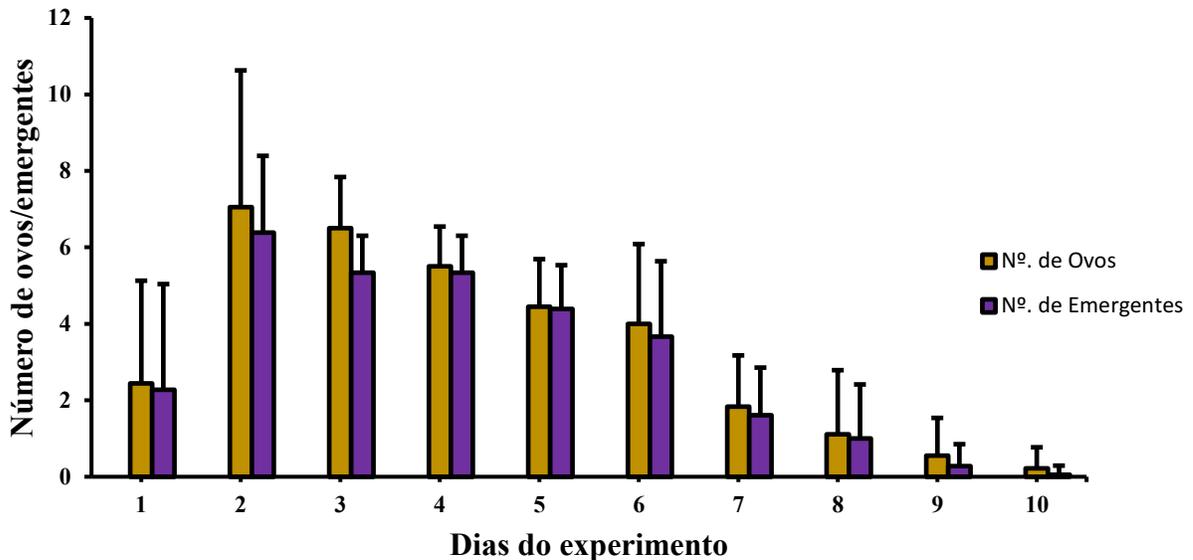
Fonte: Elaboração própria

Legenda: As barras mostram a média diária dos grupos experimentais + DP). Grupo A: Só Fêmeas; Grupo B: Fêmeas com machos; Grupo C: Fêmeas com hospedeiro; Grupo D: Fêmeas com machos e hospedeiro.

Para determinar o grau de fecundidade possibilitado por cada condição (o que nos daria informação adicional sobre o *timing* de início de cópulas), registramos, também, o número de emergentes. A única condição que apresentou fecundidade foi aquela em que havia fêmea, macho e hospedeiro (grupo D). Isto, porque na condição onde havia fêmea e macho somente (grupo B) não foram encontrados indivíduos emergentes, dado que as larvas, caso eclodissem dos ovos depositados na parede do recipiente, não conseguiriam se desenvolver. O grupo D apresentou, no decorrer dos 10 dias, uma média de 33 ± 5 ovos (**Gráfico 3**). Além disso, a média total de emergentes do grupo D foi próxima da média de posturas de ovos desse mesmo grupo (30 ± 4

emergentes), com médias diárias de emergentes em número sempre menor à média de ovos depositados (**Gráfico 3**).

Gráfico 3 - Comparativo diário da oviposição de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* do grupo D com indivíduos emergentes das sementes do mesmo grupo durante o período de 10 dias.



Fonte: Elaboração própria

Legenda: Comparativo diário de Média + DP de ovos depositados por fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* do grupo D com indivíduos emergentes das sementes do mesmo grupo durante o período de 10 dias. Combinações de testes T provaram que as médias diárias de cada tipo de dado são iguais entre si ($p < 0,05$).

6.2 MORFOLOGIA DE OVÁRIOS DE FÊMEAS

Através da análise de variância aplicada aos dados quantitativos que indicam a presença (com uma representação binária, sendo 1 para presença e 0 quando ausência) de oócitos em desenvolvimento nos ovariolos das fêmeas dos grupos, constatou-se uma diferença estatisticamente significativa ao comparar os grupos A, B e C com o grupo D o qual englobava todas as variáveis consideradas. E, dos grupos analisados, as fêmeas do grupo D apresentaram, no somatório, mais oócitos em desenvolvimento em seus ovariolos (55% no primeiro dia, seguido de 50% e 15% nos demais dias) que as fêmeas dos demais grupos ($p < 0,05$) (**Gráfico 4**).

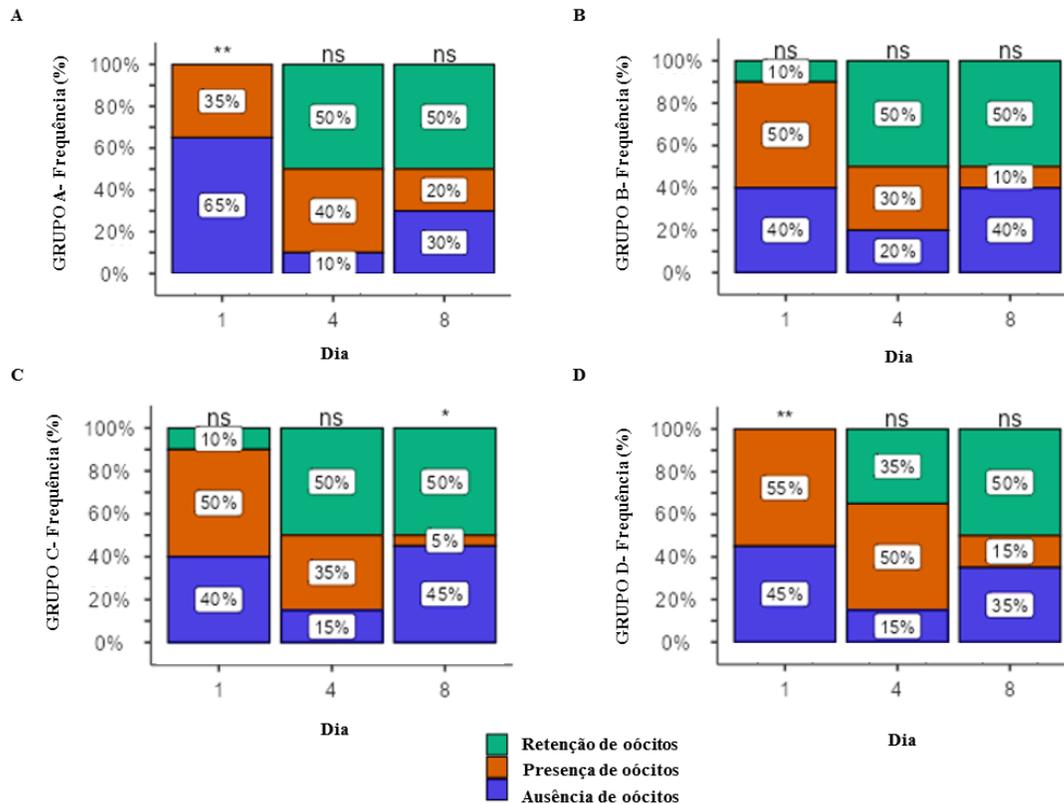
A análise morfológica intragrupo dos ovários das fêmeas revela diferença significativa em relação à presença de oócitos em desenvolvimento nos ovariolos nos grupos B, C e D (fêmeas com macho, fêmeas com hospedeiro e fêmeas com macho e hospedeiro, respectivamente). Dentro desses grupos, as análises dos dados qualitativos de presença e ausência indicam que não há

diferenças estatísticas entre os dois primeiros dias de experimento. No entanto, a presença dos oócitos diminui consideravelmente ao atingir o oitavo dia de vida. Este declínio é especialmente evidente no grupo D (fêmeas com macho e hospedeiro), onde se observa uma presença constante de oócitos nos primeiros dias de vida adulta, seguido por uma redução notável (**Gráfico 4. D**).

Comparações intergrupos de retenção de oócitos no cálix dos ovários das fêmeas não indicaram diferenças estatísticas. Contudo, em contrapartida ao padrão identificado anteriormente na presença de oócitos nos ovaríolos, o valor total de fêmeas com oócitos retidos nos ovários do grupo D (com machos e hospedeiros) é menor (N= 18) quando comparado com os demais grupos (A=20, B=22, C=22). Análises intragrupos de retenção de oócitos no cálix dos ovários indicaram que houve diferença estatística em todos os grupos experimentais. Com isso, observa-se uma maior retenção de oócitos nos últimos dias de experimento, após o período de oviposição (**Gráfico 4**).

Ao analisar a morfologia dos ovários de pupas, não foram encontrados oócitos vitelogênicos nos ovaríolos, nem oócitos retidos no cálix. Os ovaríolos das pupas analisadas apresentaram uma morfologia semelhante àquela representada pela **Figura 9. A**.

Gráfico 4 – Porcentagem de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* dos quatro grupos experimentais com oócitos em desenvolvimento nos ovariolos e com oócitos retidos no cálix dos ovários nos dias 1, 4 e oito de vida adulta.



Fonte: Elaboração própria

Legenda: Comparativo da presença de oócitos em desenvolvimento nos ovariolos e retenção de oócitos no cálix dos ovários de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* dos grupos experimentais A, B, C e D (de fêmeas, fêmeas com macho, fêmea com hospedeiro e fêmea com macho e hospedeiro, respectivamente) durante o período de um, quatro e oito dias de vida. As barras verdes indicam a porcentagem de fêmeas com oócitos no cálix, enquanto que as vermelhas indicam a porcentagem de fêmeas com oócitos em desenvolvimento presentes nos ovariolos. Teste de Kruskal-Wallis com *DCSF pairwise comparisons* provaram que as distribuições intragrupo são diferentes entre si (* $p=0,003$ e ** $p<0,002$). Análises estatísticas entre grupos revelaram também que as fêmeas do grupo D apresentaram uma maior proporção de oócitos em desenvolvimento que as dos demais grupos ($p<0,05$).

6.3 NÍVEIS DE TRANSCRIÇÃO DOS GENES *Vg* E *VgR* EM FÊMEAS

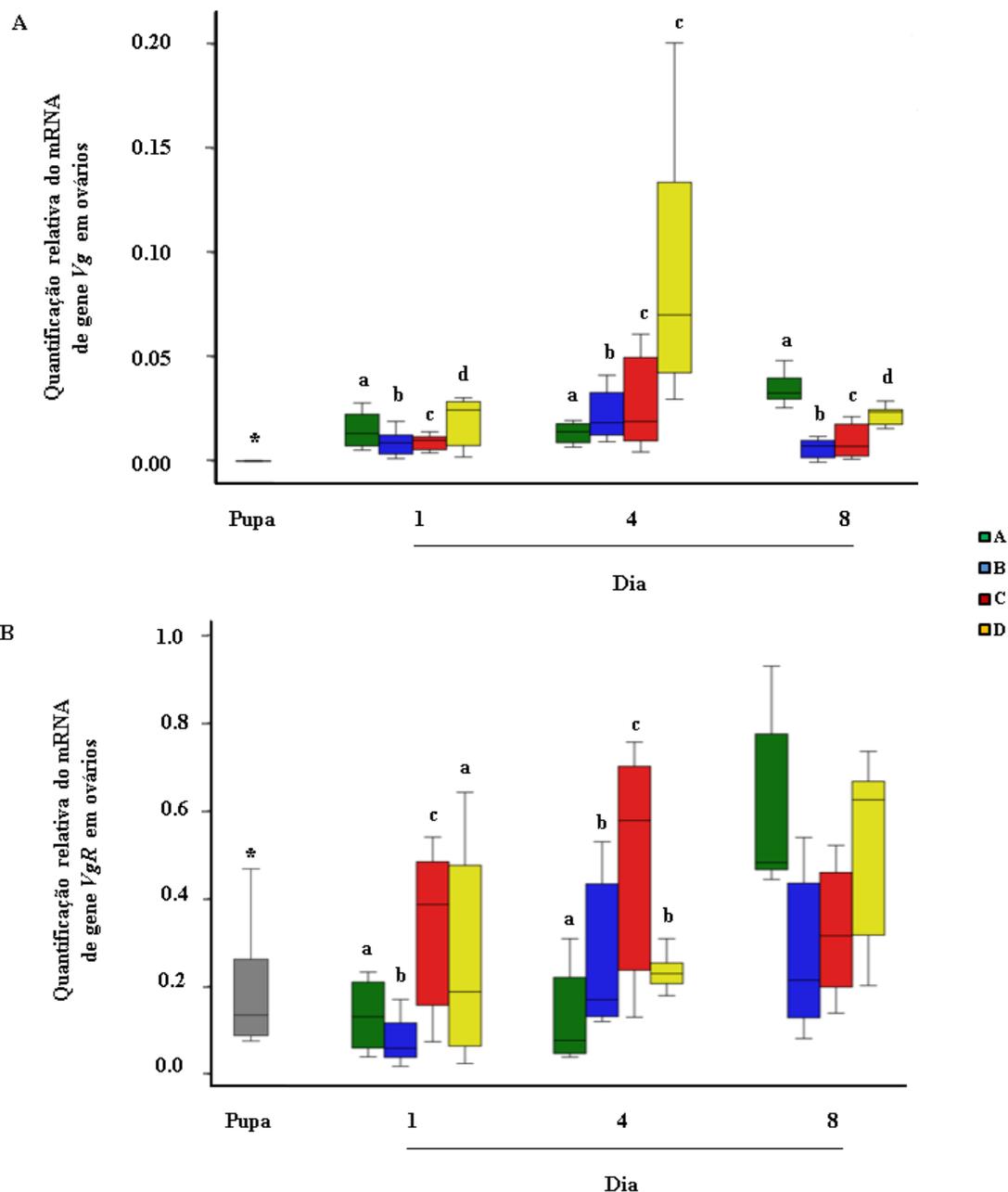
6.3.1 Ovários

Nossos resultados mostram que, independentemente da condição experimental, há expressão do gene para *Vg* (*Vg*) nos ovários de fêmeas adultas de *Z. subfasciatus* desde o primeiro dia de vida, e que os níveis de transcrição deste gene em pupas são quase indetectáveis (**Gráfico 5. A**). Além disso, os dados mostram que o gene para o receptor de *Vg* (*VgR*) também se expressa em todas as condições, como também em pupas (**Gráfico 5. B**).

A análise comparativa entre os grupos experimentais revela diferenças nas medianas dos níveis de transcritos de *Vg* presentes nos ovários das fêmeas de todos os grupos experimentais em todos os dias analisados. No primeiro dia, houve pouca variação no número de transcritos de *Vg* nos ovários das fêmeas de todos os grupos, com as fêmeas do grupo D apresentando os maiores níveis ($p < 0,05$; **Gráfico 5. A**). No quarto dia observa-se uma variação nos níveis de mRNA de *Vg* entre os grupos, com as fêmeas do grupo A apresentando os menores valores e, novamente, as do grupo D os maiores ($p < 0,05$); **Gráfico 5. A**). No oitavo dia do experimento, também observou-se uma variação de níveis de transcritos, com as fêmeas do grupo B com os menores níveis e as do grupo D com os maiores. Porém, surpreendentemente, as fêmeas do grupo A foram as que apresentaram os maiores níveis de transcritos de *Vg* em comparação com os demais grupos ($p < 0,05$; **Gráfico 5. A**). As fêmeas do grupo D foram as que apresentaram os maiores níveis de transcritos para *vg* nos dias 1 e 4 do período analisado, e, também, no 8vo dia, se excetuarmos as fêmeas do grupo A.

No que diz respeito aos receptores de *Vg* nos ovários, comparações múltiplas indicam a impossibilidade de rejeitar a hipótese de igualdade de medianas entre os grupos no último dia de experimento. No entanto, o perfil de transcrição do receptor de *Vg* nos diferentes grupos é semelhante ao perfil de transcrição de *vg* (**Gráfico 5. B**). Por outro lado, é notável que no primeiro e quarto dias, os grupos C e D apresentaram os maiores níveis de transcritos para receptor de *vg*, quando comparados aos demais grupos, com as fêmeas do grupo C com os maiores níveis ($p < 0,05$; **Gráfico 5. B**).

Gráfico 5 - Comparativo dos níveis relativos de mRNA dos genes *Vg* e *VgR* nos ovários de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* dos quatro grupos experimentais durante o período de 24 horas, quatro e oito dias de vida adulta.



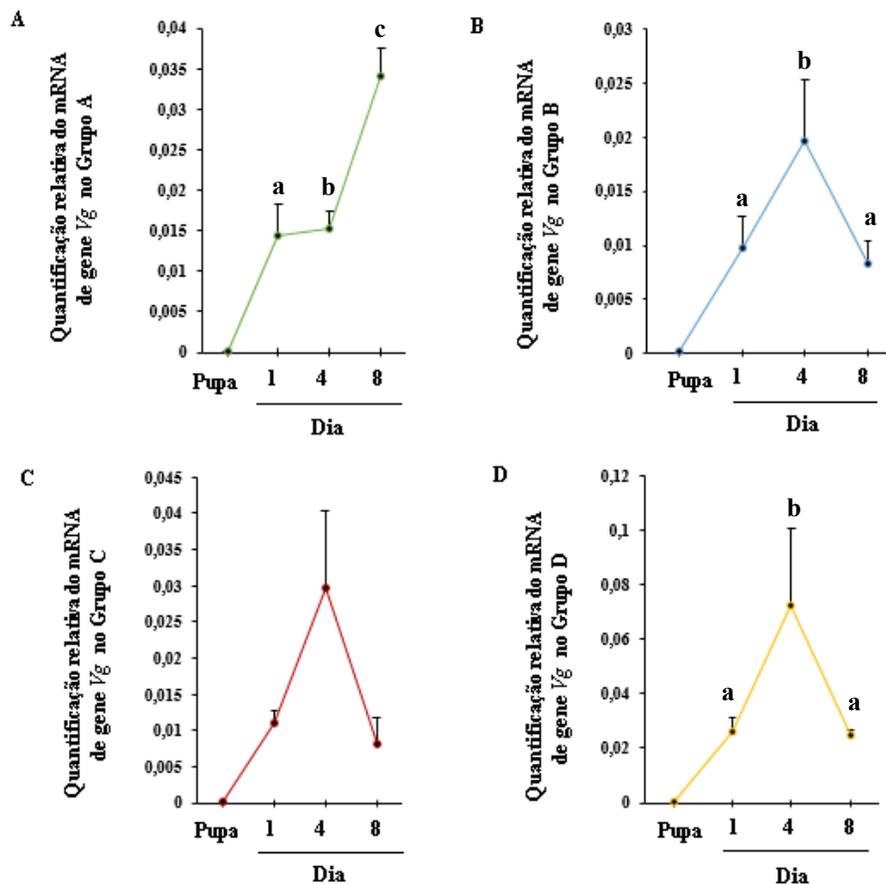
Fonte: Elaboração própria

Legenda: Comparativo dos níveis relativos de transcrição ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras) dos genes de *Vg* e *VgR* nos ovários de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* dos grupos experimentais A, B, C, D e PU (de fêmeas, fêmeas com macho, fêmea com hospedeiro, fêmea com macho e hospedeiro e pupas fêmeas, respectivamente) durante o período de 24 horas, quatro e oito dias de vida. Teste de Kruskal-Wallis com Dunn comparando os valores dos quatro grupos experimentais por dia (os valores de pupas foram analisados juntamente com os de 1 dia) provaram as medianas sinalizadas com letras diferentes (*, a, b, c e d $p < 0.05$) são diferentes entre si. (A) Comparação dos grupos experimentais a partir da análise

dos transcritos de *Vg* nos ovários das fêmeas. (B) Comparação dos grupos experimentais a partir da análise dos transcritos de *VgR* nos ovários das fêmeas.

Ao observar os grupos separadamente, incluindo as pupas, na presença do macho (grupos B e D), nota-se que no quarto dia de experimento há uma maior presença de transcritos de *Vg* quando comparado aos demais dias (**Gráfico 6. B e D**). Ademais, no grupo onde havia somente fêmeas e machos, há maior presença de transcritos no primeiro dia de experimento (**Gráfico 6. C**). Por outro lado, na ausência de qualquer uma das variáveis, observa-se uma maior quantidade de transcritos de *Vg* no último dia de experimento (**Gráfico 6. A**). O que indica uma possível influência do macho na transcrição de *Vg* nos ovários das fêmeas.

Gráfico 6 - Comparativo da quantificação relativa do mRNA de gene de *Vg* nos ovários de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* dos grupos experimentais agrupados por dias de experimento.



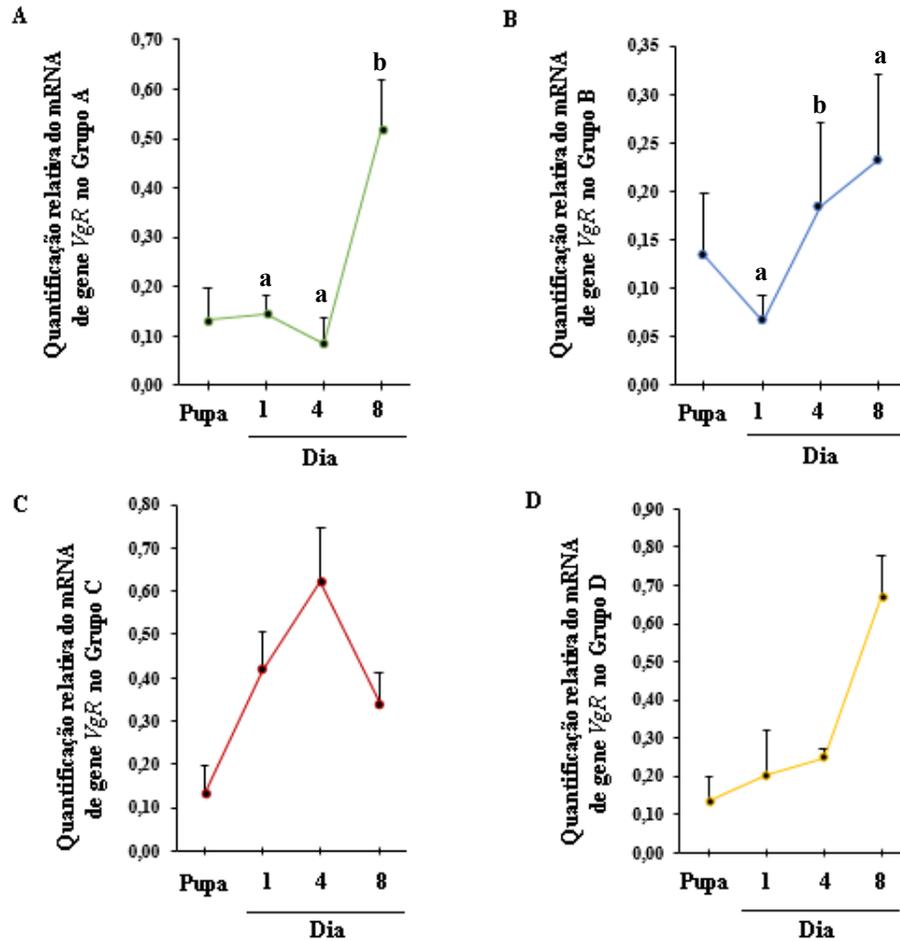
Fonte: Elaboração própria

Legenda: Comparativo (mediana + erro padrão das medianas de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras) da quantificação relativa de gene de *Vg* nos ovários de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* dos grupos experimentais A, B, C e D (de fêmeas, fêmeas com macho, fêmea com hospedeiro e fêmea com macho e hospedeiro, respectivamente)

agrupados por dias de experimento. Teste de Kruskal-Wallis com Dunn provaram as medianas sinalizadas nos dias com letras diferentes (*, a, b, c e d $p < 0.05$) são diferentes entre si (A) Comparação entre os dias de experimento no Grupo A e pupa. (B) Comparação entre os dias de experimento no Grupo B e pupa. (C) Comparação entre os dias de experimento no Grupo C e pupa. (D) Comparação entre os dias de experimento no Grupo D e pupa.

Após o período de oviposição (aproximadamente seis dias) a quantificação relativa do mRNA dos receptores de Vg em fêmeas sem e com todas as variáveis, é semelhante (**Gráfico 7. A e D**), diferente do encontrado nos grupos onde as variáveis estavam isoladas (**Gráfico 7. B e C**).

Gráfico 7 - Comparativo da quantificação relativa do mRNA de gene de VgR nos ovários de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* dos grupos experimentais agrupados por dias de experimento.



Legenda: Comparativo (mediana + erro padrão das medianas de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras) da quantificação relativa de gene de *Vg* nos ovários de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* dos grupos experimentais A, B, C e D (de fêmeas, fêmeas com macho, fêmea com hospedeiro e fêmea com macho e hospedeiro, respectivamente) agrupados por dias de experimento. Teste de Kruskal-Wallis com Dunn provaram as medianas sinalizadas nos dias com letras diferentes (*, a, b, c e d $p < 0.05$) são diferentes entre si. (A) Comparação entre os dias de experimento no Grupo A e pupa. (B) Comparação entre os dias de experimento no Grupo B e pupa. (C) Comparação entre os dias de experimento no Grupo C e pupa. (D) Comparação entre os dias de experimento no Grupo D e pupa.

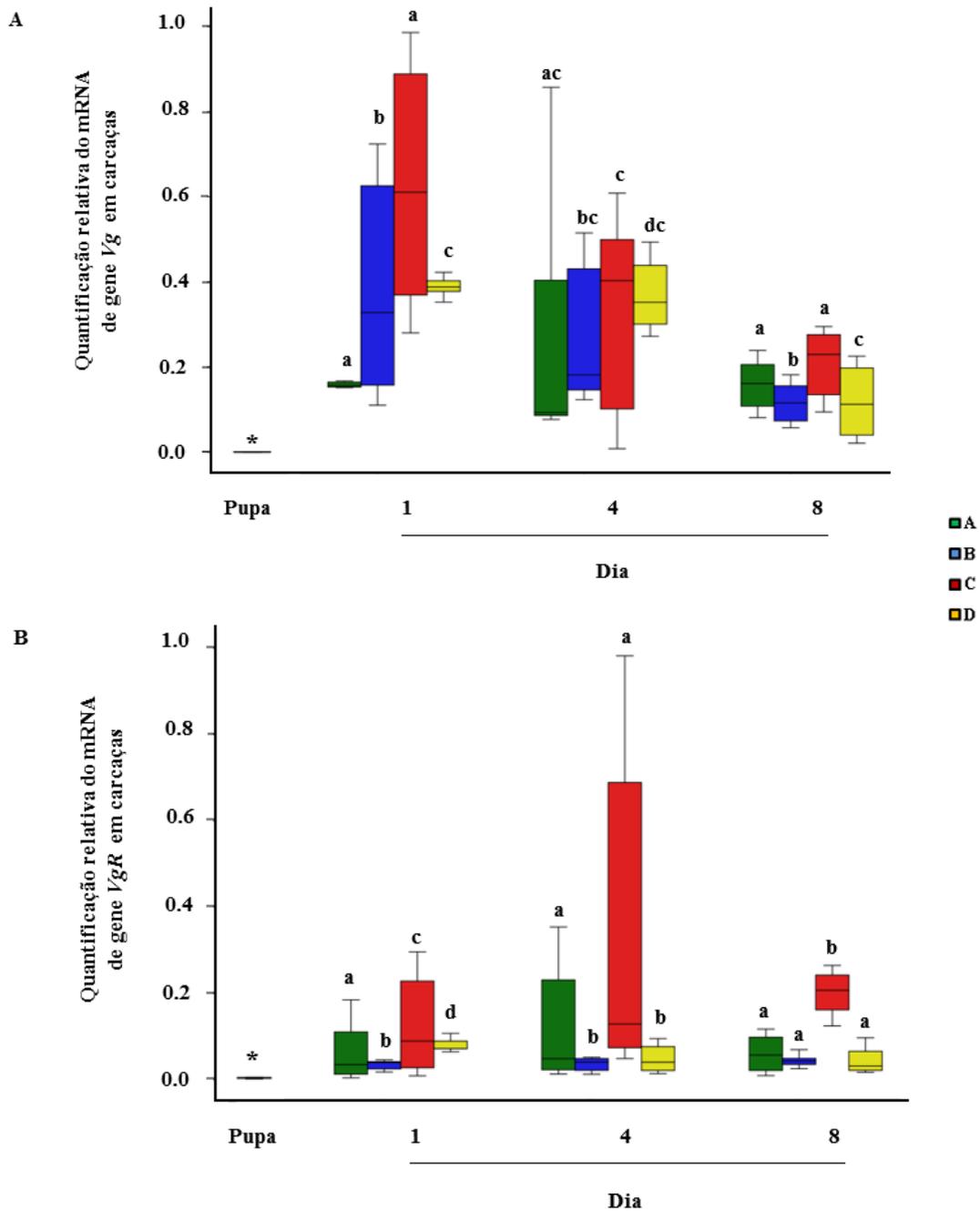
6.3.2 Carcaça

De maneira semelhante ao encontrado nas amostras de ovários, nossos resultados mostram que, independentemente da condição experimental, existe expressão do gene para a *Vg* em carcaças de fêmeas de *Z. subfasciatus* desde a fase pupal e, surpreendentemente, do gene para o receptor de *Vg* (**Gráfico 8. A e B**).

A partir dos dados obtidos dos transcritos dos genes de *Vg* nas carcaças, nota-se que, excetuando as fêmeas do grupo A, as dos grupos B, C e D, apresentam os maiores níveis de transcritos de *Vg* no primeiro dia de vida adulta e estes níveis diminuem com os dias (**Gráfico 8. A**). As fêmeas do grupo A apresentaram os maiores níveis no último dia do período analisado (ver medianas no **Gráfico 8. A**). A diferença do encontrado em ovários, as fêmeas do grupo C (e não as do grupo D) apresentaram os maiores níveis de transcrição de *vg* em carcaça, e no primeiro dia de vida.

Para os receptores de *Vg*, notoriamente, as fêmeas do grupo C (condição onde havia somente a presença do hospedeiro) foram as que apresentaram os maiores níveis de transcritos na carcaça em todo o período analisado ($p < 0,05$, sem suporte estatístico para o dia 4; **Gráfico 8. B**).

Gráfico 8 - Comparativo da quantificação relativa do mRNA de gene de *Vg* e *VgR* nas carcaças de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* dos grupos experimentais durante o período de 24 horas, quatro e oito dias de vida.



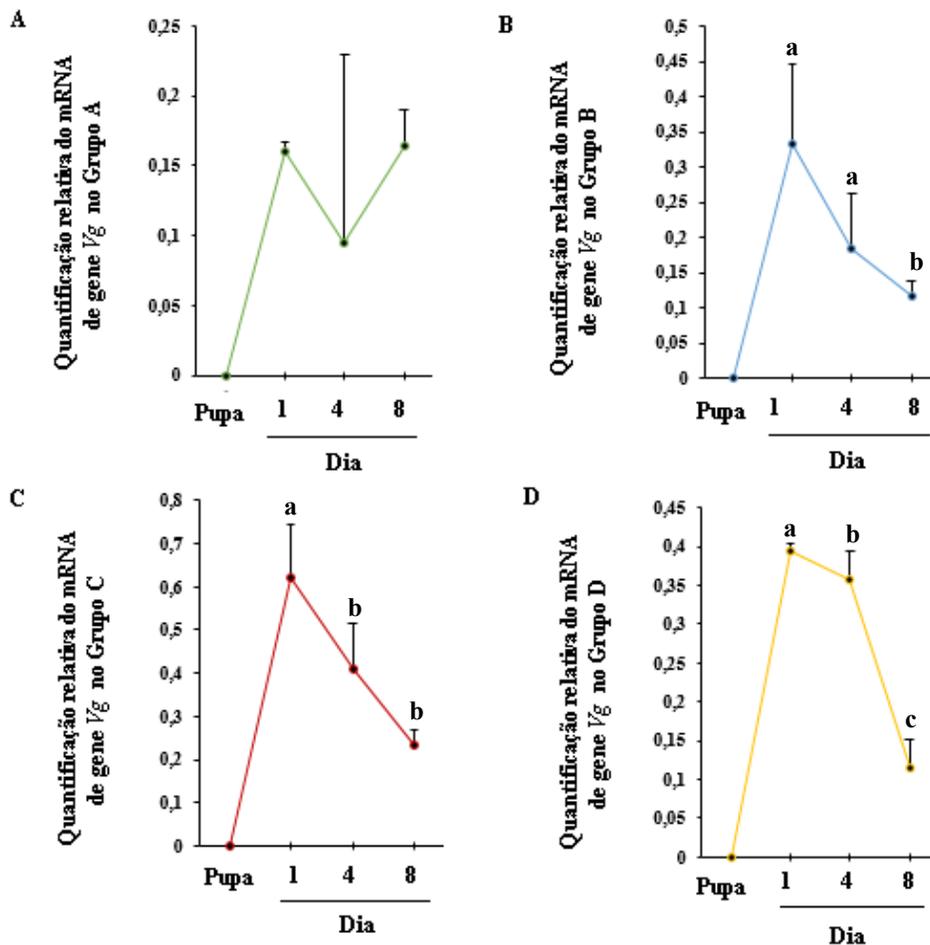
Fonte: Elaboração própria

Legenda: Comparativo dos níveis relativos de transcrição ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras) dos genes de *Vg* e *VgR* nas carcaças de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* dos grupos experimentais A, B, C, D e PU (de fêmeas, fêmeas com macho, fêmea com hospedeiro, fêmea com macho e hospedeiro e pupas fêmeas, respectivamente) durante

o período de 24 horas, quatro e oito dias de vida. Teste de Kruskal-Wallis com Dunn provaram as medianas sinalizadas nos dias com letras diferentes (*, a, b, c e d $p < 0.05$) são diferentes entre si. (A) Comparação dos grupos experimentais a partir da análise dos transcritos de *Vg* nas carcaças das fêmeas. (B) Comparação dos grupos experimentais a partir da análise dos transcritos de *VgR* nas carcaças das fêmeas.

No primeiro dia de vida nos grupos onde havia todas as variáveis havia mais transcritos de *Vg* nas carcaças das fêmeas (**Gráfico 9. B, C e D**).

Gráfico 9 - Comparativo da quantificação relativa do mRNA de gene de *Vg* nas carcaças de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* dos grupos experimentais agrupados por dias de experimento.



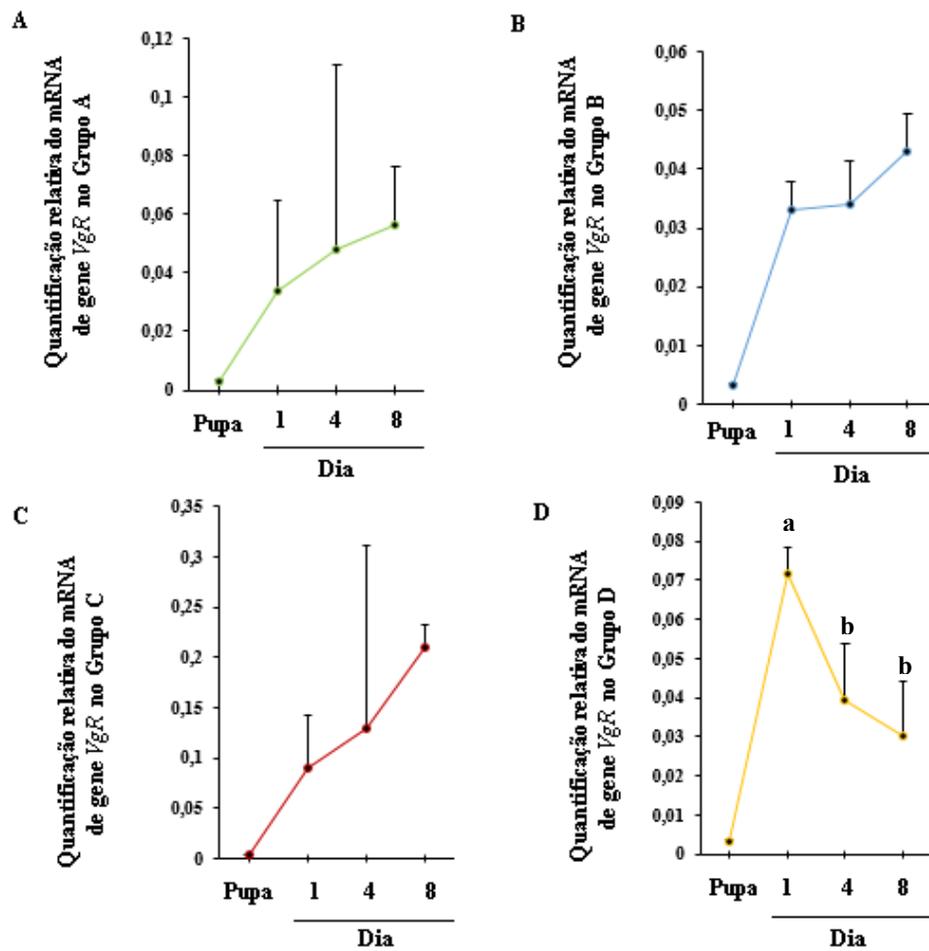
Fonte: Elaboração própria

Legenda: Comparativo (mediana + erro padrão das medianas de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras) da quantificação relativa de gene de *Vg* nas carcaças de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* dos grupos experimentais A, B, C e D (de fêmeas, fêmeas com macho, fêmea com hospedeiro e fêmea com macho e hospedeiro,

respectivamente) agrupados por dias de experimento. Teste de Kruskal-Wallis com Dunn provaram as medianas sinalizadas nos dias com letras diferentes (*, a, b, c e d $p < 0.05$) são diferentes entre si. (A) Comparação entre os dias de experimento no Grupo A e pupa. (B) Comparação entre os dias de experimento no Grupo B e pupa. (C) Comparação entre os dias de experimento no Grupo C e pupa. (D) Comparação entre os dias de experimento no Grupo D e pupa.

Assim como para os transcritos de *Vg* nas carcaças das fêmeas do grupo D, os receptores apresentam um padrão semelhante, apresentando uma maior quantidade no primeiro dia de vida e diminuindo com o tempo (Gráficos 9. D e 10. D).

Gráfico 10 - Comparativo da quantificação relativa do mRNA de gene de *VgR* nas carcaças de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* dos grupos experimentais agrupados por dias de experimento.



Fonte: Elaboração própria

Legenda: Comparativo (mediana + erro padrão das medianas de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras) da quantificação relativa de gene de *Vg* nos ovários de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* dos grupos experimentais A, B, C e D (de

fêmeas, fêmeas com macho, fêmea com hospedeiro e fêmea com macho e hospedeiro, respectivamente) agrupados por dias de experimento. Teste de Kruskal-Wallis com Dunn provaram as medianas sinalizadas nos dias com letras diferentes (*, a, b, c e d $p < 0.05$) são diferentes entre si. (A) Comparação entre os dias de experimento no Grupo A e pupa. (B) Comparação entre os dias de experimento no Grupo B e pupa. (C) Comparação entre os dias de experimento no Grupo C e pupa. (D) Comparação entre os dias de experimento no Grupo D e pupa.

6.3.3 Carcaças *versus* Ovários

Para avaliar a participação relativa dos diferentes tecidos analisados na vitelogênese, comparamos os níveis de transcritos de *vg* e *vgr* em ovários e carcaças. Nossos resultados indicam que há diferenças estatísticas ($p < 0,01$) nas comparações dos dois tecidos (carcaça e ovários), exceto para mediana de transcritos de *Vg* em pupas. De forma geral, os tecidos das carcaças apresentam uma maior quantidade de transcritos de *Vg*, enquanto os ovários demonstram uma predominância de transcritos de receptor de *Vg* (Tabela 2).

Tabela 2 - Mediana da quantificação relativa dos níveis de transcrição dos genes de *Vg* e *VgR* dos grupos experimentais nas carcaças e ovários e valor de *p* das comparações dos tecidos.

Grupos experimentais	Quantificação relativa de gene de <i>Vg</i> e <i>Vgr</i>		Valor de <i>p</i>
	Ovário	Carcaça	
	<i>Vg</i>	<i>Vg</i>	
Pupa	0.000168379	0.000143576	Inconclusivo
A	0.021240068	0.139180496	0.00000030
B	0.012564481	0.211524761	0.00000030
C	0.013103663	0.420599217	0.00053092
D	0.040992047	0.288494537	0.00002963
	<i>VgR</i>	<i>VgR</i>	
Pupa	0.134012874	0.00325846	0.00394775
A	0.249943227	0.04586242	0.00173489
B	0.161707407	0.039955827	0.00001944

C	0.460827464	0.14269851	0.01243865
D	0.375907394	0.0470561	0.00001461

Fonte: Elaboração própria

Legenda: Mediana da quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de gene de *Vg* e *VgR* nas carcaças e ovários de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* dos grupos experimentais A, B, C, D e PU (de fêmeas, fêmeas com macho, fêmea com hospedeiro, fêmea com macho e hospedeiro e pupas fêmeas, respectivamente). Teste de Kruskal-Wallis com Dunn provaram as distribuições são diferentes entre si.

7 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir das três abordagens metodológicas revelam *insights* significativos sobre a ação das variáveis macho e hospedeiro na ativação dos ovários das fêmeas de *Z. subfasciatus*. No contexto das variáveis analisadas, a presença simultânea de macho e hospedeiro emerge como crucial para a atividade de postura e fecundidade. Analisando a oviposição diária, apenas o grupo D, com disponibilidade de hospedeiro e macho, apresenta um pico de oviposição no segundo dia, e demonstra fecundidade desde o primeiro dia de vida adulta. As análises morfológicas indicam que as fêmeas sob a influência de macho e hospedeiro apresentam menor retenção de oócitos nos ovários. Quanto à transcrição, a expressão de *Vg* e *VgR* nos ovários e carcaças destaca a produção/endocitose dessas moléculas nos primeiros dias de vida adulta, independentemente das condições ambientais. Variações dos níveis de transcritos de *Vg* nos ovários indicam diferenças significativas, com as fêmeas do grupo que possuía macho e hospedeiro apresentando os maiores níveis de expressão de *Vg*. Já em carcaça, a maior expressão de *Vg* aconteceu nas fêmeas do grupo que se encontrava sob a influência do feijão e logo no primeiro dia de vida adulta.

Quanto ao perfil de oviposição e fecundidade das fêmeas de *Z. subfasciatus* sujeitas a variáveis, observa-se que a presença simultânea do macho e do hospedeiro é crucial para a fecundidade, mas cada fator isoladamente não estimula a atividade de postura de ovos. Nesse sentido, Pimbert e Pierre (1983) em seu experimento com vagens e sementes de feijão *P. vulgaris*, relata que o hospedeiro e sua vagem podem influenciar a atividade de postura, mas certamente induz a oôgenese nas fêmeas. Credland *et. al.* (1988) em um experimento que utilizou extrato de feijão fradinho e com outro modelo de inseto, também fitófago, *C. maculatus*, já relata que o acasalamento e o hospedeiro geralmente não são suficientes para induzir a atividade de postura de ovos, embora geralmente desempenhe um papel importante na estimulação da oôgenese. Estes resultados podem explicar a presença de oócitos em desenvolvimento nos ovários das fêmeas nos primeiros dias de vida, sobretudo dos grupos B e D (fêmeas com hospedeiro e fêmea com macho e hospedeiro, respectivamente), onde, consideravelmente, decai no oitavo dia de vida.

Analisando os dados de oviposição diária dos grupos, no decorrer dos 10 dias, as fêmeas dos grupos A, B e C (cujas variáveis estavam isoladas) apresentaram uma oviposição diária difusa se estendendo além do período de oviposição de 6 dias em condições laboratoriais proposto por Sari (2003), condições controladas de umidade e temperatura, como as executadas neste trabalho.

Este fato pode ser explicado pelos resultados publicados por Sperandio e Zucoloto (2009) para os grupos onde havia a presença do hospedeiro. Estes autores observaram que as fêmeas podem, por dia, buscar sítios de oviposição e, não encontrando, propuseram que há a reabsorção desses ovos que já estavam prontos para a postura. Isto pode explicar a diferença morfológica dos ovários das fêmeas analisadas sob a ótica de retenção de oócitos no cálix de todos os grupos nos dois últimos dias analisados, apesar das condições ambientais, pois as pupas fêmeas não apresentaram oócitos em desenvolvimento. Além disso, o pico de postura nas primeiras 24 horas de experimento apresentado pelos grupos A e B (onde não havia sementes) pode ser explicado por Pimbert e Pierre (1983), que indicam que algumas poucas horas de contato com a própria semente sobre a que emergiu a fêmea podem induzir a oviposição no primeiro dia de vida. O comportamento de oviposição diário do grupo D, onde havia a disponibilidade de hospedeiro e macho, é encontrado também nos trabalhos de Sari (2003), Howe e Currie (1964), onde, em condições laboratoriais, fêmeas de *Z. subfasciatus* apresentam um pico de postura no segundo dia de vida adulta e o seu período de oviposição dura em média seis dias, decaindo consideravelmente, após o sétimo dia.

Também por haver disponibilidade de hospedeiro e de parceiro sexual, o único grupo que apresentou fecundidade foi o grupo D. A média de emergentes desse grupo foi próxima da média de posturas de ovos o que pode ser explicado pelo estudo conduzido por Howe e Currie (1964) que demonstra que, em condições controladas de umidade (superior a 70%) e temperatura (superior a 27°C), há uma elevada probabilidade de emergência de indivíduos. Além disso, observou-se que no primeiro dia de experimento havia a presença de ovos e posteriormente de emergentes, indicando que com poucas horas de experimento houve acasalamento e fecundação, fato que foi relatado também em outros coleópteros (HOWE; CURRIE, 1964).

Para fêmeas de *Z. subfasciatus*, e até mesmo outros insetos da mesma subfamília Bruchinae, não há trabalhos morfológicos que envolvam marcação molecular de ovários meroísticos telotróficos nos parâmetros desenvolvidos aqui. O desenvolvimento de oócito sub-primário e primário foi encontrado em todos os grupos, sobretudo nas fêmeas com até 24 horas de vida, o que já é um indicativo de que, nessa idade, já há endocitose de Vg mediada pela ação de VgR, nos ovários dessas fêmeas (WU, 2021). Assim, este resultado difere do encontrado na morfologia dos ovários das pupas. Ademais, nota-se que das fêmeas utilizadas para a análise morfológica, aquelas que estiveram sob a influência das duas variáveis (macho e hospedeiro), condição ideal para a reprodução, possuíam mais oócitos em desenvolvimento em seus ovários, e menos

retenção de oócitos nos ovários. Ou seja, nessas condições, a ativação ovariana diminui com o tempo. Nas demais condições estudadas, as análises morfológicas indicam uma maior retenção no cálix e presença de oócitos nos ovaríolos das fêmeas sob a influência do macho, o que pode corresponder à uma adaptação ao “ambiente desfavorável” (sem uma das variáveis); uma estratégia reprodutiva, permitindo um controle mais eficaz do tempo de oviposição ou para garantir a maturação adequada dos ovos antes da postura; falta de sítio de oviposição; um comportamento de acasalamento que necessita de substâncias estimuladoras de oviposição sintetizadas por glândulas acessórias e transferidas para a fêmea durante a cópula; bem como fatores fisiológicos como condições hormonais ou alterações no ciclo reprodutivo (TEIXEIRA *et al.*, 2009; SOLLER *et al.*, 1999; CORDERO, 1995).

No que se refere às análises de transcrição, os transcritos de *Vg* e *VgR* identificados nos ovários e na carcaça das fêmeas indicam, inicialmente, a produção e/ou endocitose de *Vg*, bem como dos receptores de *Vg*, nos primeiros dias de vida adulta das fêmeas, independentemente das condições ambientais. Enquanto isso, os níveis de transcrição de *Vg* em pupas são praticamente indetectáveis. Além disso, destaca-se que o gene para o receptor de *Vg* também manifesta expressão em todas as condições, inclusive em pupas.

A influência do macho e/ou do hospedeiro nos altos níveis de mRNA para *Vg* nos ovários (grupos C e D) pode indicar uma síntese local pelas células epiteliais do folículo, bem como uma expressão de *Vg* sujeita a diferentes controles em diferentes sítios de síntese, como pode ocorrer em drosófilas (ISAAC; BOWNES, 1982), bem como a presença de substâncias estimuladoras de ovulação transferidas pelos machos (CORDERO, 1995). Há trabalhos que mostram resultados que envolvem a flexibilidade fisiológica das fêmeas de *Z. subfasciatus* em colocar ovos de diferentes tamanhos de acordo com o ambiente (TEIXEIRA *et al.*, 2009; CORRÊA *et al.*, 2020), o que envolve endocitose de material nutridor, mas pouco se sabe dos locais de síntese de *Vg* nesses insetos. Além disso, apesar de possuírem uma alimentação facultativa (CORRÊA *et al.*, 2020), a influência do hospedeiro nos altos níveis de *Vg* e seu receptor nas carcaças pode também ser um indicativo da existência de mais um sítio de síntese e/ou processamento dessa proteína, assim como em *Dermacentor variabilis*, onde os trofócitos do corpo gorduroso, as células do intestino médio e os oócitos estão envolvidos na síntese e/ou processamento de *Vg*, e a alimentação é o sinal associado ao início da síntese e/ou processamento de *Vg* também (ROSELL; COONS, 1992).

Ao comparar os tecidos das carcaças e ovários, como esperado (Wu *et al.*, 2021; IZUMI *et al.*, 1994), observa-se uma maior quantidade de transcritos de *Vg* nas carcaças, enquanto os ovários demonstram uma predominância de transcritos do receptor de *Vg* (*VgR*). É chamativa, porém, a expressão de *VgR* em carcaças de fêmeas em presença de hospedeiro é maior. O papel fisiológico da *Vg* pode ir além da ativação dos ovários, pois há relatos do envolvimento da *Vg* na organização social de abelhas operárias e até mesmo em zangões (TUFAIL *et al.*, 2014). Portanto, a importante expressão de *VgR* nas carcaças pode ser um indicativo não só da produção e/ou endocitose de *Vg* para a ativação ovariana; ela pode estar sendo incorporada por outros tecidos dessa região corporal analisada e utilizada para fins diversos.

8 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, é possível inferir que a hipótese inicial de que tanto a presença do hospedeiro quanto a do macho são necessárias para a ativação do ovário adulto de fêmeas de *Z. subfasciatus* encontra suporte em alguns aspectos, mas também é desafiada por outras observações.

Os achados indicam que a presença simultânea do macho e do hospedeiro desempenha um papel crucial na oviposição e na fecundidade, embora, de forma isolada, não sejam suficientes para influenciar a atividade de postura.

As fêmeas estão aptas para a reprodução no primeiro dia de vida adulta e mostram um período concentrado de oviposição nos primeiros 6 dias de vida.

O desenvolvimento de oócito sub-primário e primário é um indicativo de que no início da vida adulta já acontece endocitose de Vg mediada pela ação de VgR, nos ovários, o que não acontece em pupas. As análises morfológicas indicam que a ativação ovariana diminui com o tempo.

A vitelogênese (expressão de Vg em carcaça e do receptor de Vg em ovários) é promovida pela presença de hospedeiro.

A presença do macho estimula a síntese de Vg nos ovários.

Em resumo, a vitelogênese é rapidamente promovida pela presença de hospedeiro, porém, a oviposição é estimulada pela presença de hospedeiro e do macho.

REFERÊNCIAS

- BOCAK, L. *et al.* Building the Coleoptera tree-of-life for > 8000 species: composition of public DNA data and fit with Linnaean classification. **Systematic Entomology**, Reino Unido, v. 39, n. 1, p. 97-110, 2014.
- BOUCHARD, P. *et al.* Family-group names in Coleoptera (Insecta). **Zoo Keys**, Bulgaria, n. 88, p.1, 2011.
- CHAPMAN, R. F. The insects: Structure and function. Fifth edition. **Cambridge Univ. Press, Cambridge**, Reino Unido, 929 p, 2013.
- CORDERO, C. Ejaculate substances that affect female insect reproductive physiology and behavior: honest or arbitrary traits? **Journal of Theoretical Biology**, Inglaterra, v. 174, n. 4, p. 453-461, 1995.
- CORRÊA, C. P. *et al.* Adult feeding and host type modulate the life history traits of the capital breeder *Zabrotes subfasciatus*. **Physiological Entomology**, Brasil, v. 45, n. 2-3, p. 120-128, 2020.
- CREDLAND, P. F.; DENDY, J. Intra specific variation in bionomic characters of the Mexican bean weevil, *Zabrotes subfasciatus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Holanda, 65: 39-47, 1992.
- CREDLAND, P. F.; WRIGHT, Andrew W. The effect of artificial substrates and host extracts on oviposition by *Callosobruchus maculatus* (F.)(Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, Reino Unido, v. 24, n. 3, p. 157-164, 1988.
- DENDY, J.; CREDLAND, P. F. Development, fecundity and egg dispersion of *Zabrotes subfasciatus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Holanda, 59: 9-17, 1991.
- ENGELMANN, F. Endocrine control of reproduction in insects. **Annual Review of Entomology**, Los Angeles, v. 13, n. 1, p. 1-26, 1968.
- EGGLETON, P. The State of the World's Insects. **Annual Review of Environment and Resources**, Reino Unido, v. 45, p. 61-82, 2020.
- FRUTTERO, L.; *et al.* Lipids in insect oocytes: from the storage pathways to their multiple functions. **Oocytes: maternal information and functions**, Estados Unidos, p. 403-434, 2017.
- HAGSTRUM, D. W.; *et al.* Evolution of stored-product entomology: protecting the world food supply. **Annual review of entomology**, Estados Unidos, v. 62, p. 379-397, 2017.
- HOWE, R.W.; CURRIE, J. E. Some laboratory observations on the rates of development, mortality and oviposition of several species of Bruchidae breeding in stored pulses. **Bulletin of Entomological Research**, Reino Unido, 55: 437-477, 1964.

HURD, H. Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. **Annual review of entomology**, Reino Unido, v. 48, n. 1, p. 141-161, 2003

ISAAC, P. G.; BOWNES, M. Ovarian and fat-body vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. **European journal of biochemistry**, Escócia v. 123, n. 3, p. 527-534, 1982.

IZUMI, S. *et al.* Yolk proteins from insect eggs: structure, biosynthesis and programmed degradation during embryogenesis. **Journal of insect physiology**, Japão, v. 40, n. 9, p. 735-746, 1994.

JOHNSON, Andrew. File:*Zabrotes subfasciatus* 4x 50.jpg - Wikimedia Commons. 10 dez. 2019. Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Zabrotes_subfasciatus_4x_50.jpg. Acesso em: 2 out. 2023.

JERVIS, Mark A.; *et al.* Egg maturation strategy and survival trade-offs in holometabolous insects: a comparative approach. **Biological Journal of the Linnean Society**, Estados Unidos, v. 90, n. 2, p. 293-302, 2007

JONES, P. L.; *et al.* Learning in insect pollinators and herbivores. **Annual Review of Entomology**, Estados Unidos, v. 62, p. 53-71, 2017.

KAUR, D.; *et al.* Morphological and reproductive dimorphism in *Zabrotes subfasciatus* (Boh.). **Proceedings of the seventh international working conference on stored-product protection**, Estados Unidos, p. 1821-1832, 1999.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. **Journal of the American Statistical Association**, Estados Unidos, v. 47, n. 260, p. 583, dez. 1952.

LOCKWOOD, J. A. Insects as weapons of war, terror, and torture. **Annual review of entomology**, Estados Unidos, v. 57, p. 205-227, 2012.

LORINI, I.; *et al.* Manejo integrado de pragas de grãos e sementes armazenadas. **CEP**, Brasília, v. 86001, p. 970, 2015.

LUO, W. *et al.* Juvenile hormone signaling promotes ovulation and maintains egg shape by inducing expression of extracellular matrix genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Estados Unidos, v. 118, n. 39, 2021.

MCKENNA, D. D. *et al.* The evolution and genomic basis of beetle diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Estados Unidos, v. 116, n. 49, p. 24729-24737, 2019.

MEIK, J.; DOBIE, P. The ability of *Zabrotes subfasciatus* to attack cowpeas. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Holanda, 42: 151-158, 1986.

- NORIEGA, F. G. Juvenile hormone biosynthesis in insects: what is new, what do we know, and what questions remain? **International scholarly research notices**, Estados Unidos, v. 2014, 2014.
- PAJNI, H. R. Some aspects of biosystematics of Bruchidae (Coleoptera). Proceedings: **Animal Sciences**, India, v. 96, n. 5, p. 509-515, 1987.
- PIMBERT, M.; PIERRE, D. Ecophysiological aspects of bruchid reproduction. I. The influence of pod maturity and seeds of *Phaseolus vulgaris* and the influence of insemination on the reproductive activity of *Zabrotes subfasciatus*. **Ecological Entomology**, Reino Unido, v.8, p. 87-94, 1983.
- PIMBERT, M; POUZAT, J. Analyse em olfactomètre tubulaire, de l'influence de différents stimulus olfactifs darts La recherche Du partenaire sexual par *Zabrotes subfasciatus*. **Entomologia experimentalis et applicata**, Holanda, v. 45, p. 23-27, 1987.
- PIMBERT, M; POUZAT, J. Electroantennogram responses of *Zabrotes subfasciatus* to odours of the sexual partner. **Entomologia experimentalis et applicata**, Holanda, v. 47, n. 1, p. 49-53, 1988.
- PHILLIPS, T. W.; *et al.* Biorational approaches to managing stored-product insects. **Annual review of entomology**, Estados Unidos, v. 55, p. 375-397, 2010.
- REINHARDT, K.; *et al.* Biology of the bed bugs (Cimicidae). **Annual review of entomology**, Estados Unidos, v. 52, p. 351-374, 2007.
- RODRIGUES P.A *et al.* Transcriptional signature of host shift in the seed beetle *Zabrotes subfasciatus*. **Genetics and Molecular Biology**, Brasil, (in press), 2023.
- ROSELL, R.; COONS, L. B. The role of the fat body, midgut and ovary in vitellogenin production and vitellogenesis in the female tick, *Dermacentor variabilis*. **International journal for parasitology**, Austrália, v. 22, n. 3, p. 341-349, 1992.
- ROY, S. *et al.* Regulatory pathways controlling female insect reproduction. **Annual review of entomology**, Estados Unidos, v. 63, p. 489-511, 2018.
- SARI T, L. *et al.* Aspectos biológicos de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera, Bruchidae) em *Phaseolus vulgaris* L., cv. Carioca (Fabaceae), sob condições de laboratório. **Revista Brasileira de Entomologia**, Brasil, v. 47, p. 621-624, 2003.
- SOLLER, M. *et al.* Control of oocyte maturation in sexually mature *Drosophila* females. **Developmental biology**, Estados Unidos, v. 208, n. 2, p. 337-351, 1999.
- SOUTHGATE, B. J. Biology of the Bruchidae. **Annual review of entomology**, Estados Unidos, v. 24, n. 1, p. 449-473, 1979.

SWEVER, L. *et al.* 1.3 Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. **Comprehensive Molecular Insect Science, Elsevier**, Estados Unidos, v.1, p. 87-155, 2005.

SPERANDIO, L. AA; ZUCOLOTO, F. S. Comportamento de ovoposição de fêmeas selvagens de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera, Chrysomelidae) privadas do hospedeiro *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae). **Iheringia. Série Zoologia**, Brasil, v. 99, n.4, p. 403-408, 2009.

TEIXEIRA, I. R. V.; ZUCOLOTO, F. S. Seed suitability and oviposition behaviour of wild and selected populations of *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae) on different hosts. **Journal of Stored Products Research**, Brasil, v. 39, n.2, p. 131-140, 2003.

TEIXEIRA, I. R. V. *et al.* Host preference of the bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. **Insect Science**, Brasil, v. 15, n. 4, p. 335-341, 2008.

TEIXEIRA, I. R. V. *et al.* Females of the weevil *Zabrotes subfasciatus* manipulate the size and number of eggs according to the host seed availability. **Physiological Entomology**, Brasil, v. 34, n.3, p. 246-250, 2009.

TEIXEIRA, I. R. V.; ZUCOLOTO, F. S. Intraspecific competition in *Zabrotes subfasciatus*: Physiological and behavioral adaptations to different amounts of host. **Insect Science**, Brasil, v. 19, n. 1, p. 102–111, fev. 2012.

TUFAIL, M. *et al.* Regulation of vitellogenin genes in insects. **Entomological Science**, Japão, v. 17, n. 3, p. 269-282, 2014.

WU, Z. *et al.* Regulatory mechanisms of vitellogenesis in insects. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, China, v. 8, p. 593613, 2021.

XU, H. *et al.* An inventory of invasive alien species in China. **Neo Biota**, China, v. 15, p. 1, 2012.

ZHOU, X.; *et al.* Effect of temperature and photoperiod on juvenile hormone biosynthesis and sexual maturation in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*: implications for life history traits. **Insect biochemistry and molecular biology**, Estados Unidos, v. 30, n. 8-9, p. 863-868, 2000.

	$\bar{X} =$									
	2,44	7,06	6,50	5,50	4,44	4,00	1,83	1,11	0,56	0,22
D	DP=									
	2,68	3,57	1,34	1,04	1,25	2,09	1,34	1,68	0,98	0,55

Fonte: Elaboração própria

Legenda: Valores de média e desvio padrão da distribuição de ovos dos grupos experimentais. Grupo A: Fêmeas sem a presença de machos, nem hospedeiro; Grupo B: Fêmeas com a presença de machos, sem hospedeiro; Grupo C: Fêmeas com a presença de hospedeiro, sem machos; Grupo D: Fêmeas com a presença de machos e hospedeiro.

Tabela A 3 – Valores estatísticos referentes ao gráfico 3

		Dias									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Emergentes do Grupo D	$\bar{X} =$	2,27	6,38	5,33	5,44	4,38	3,66	1,61	1,00	0,27	0,05
	DP=	2,76	2,00	0,97	1,14	1,14	1,97	1,24	1,41	0,57	0,23
<i>p</i>		0.674	0.264	0.072	0.749	0.868	0.317	0.331	0.495	0.056	0.187
df		17	17	17	17	17	17	17	17	17	17

Fonte: Elaboração própria

Legenda: Valores de média, desvio padrão e valor de *p* de teste T na comparação entre oviposição e indivíduos emergentes do grupo experimental D de Fêmeas com a presença de machos e hospedeiro.

APÊNDICE B – Tabelas referentes à análise morfológica de ovários

Tabela B 1- Valores estatísticos referentes ao gráfico 4

Grupos	df	<i>p</i>
A	2	< .001
B	2	0.068
C	2	0.049
D	2	0.015

Fonte: Elaboração própria

Legenda: Valores de *p* obtidos por teste Kruskal-Wallis do comparativo dos valores de presença e retenção de oócitos nos ovários das fêmeas dos grupos experimentais. Grupo A: Fêmeas sem a presença de machos, nem hospedeiro; Grupo B: Fêmeas com a presença de machos, sem hospedeiro; Grupo C: Fêmeas com a presença de hospedeiro, sem machos; Grupo D: Fêmeas com a presença de machos e hospedeiro

APÊNDICE C – Tabelas referentes análise de transcrição dos genes *vg* e *vgR*

Tabela C 1- Valores estatísticos referentes ao gráfico 5

Grupo	Q2 VGR	df	<i>p</i>	Q2 VG	df	<i>p</i>
A1	0.143595623	5	0.04978707	0.014383007	5	0.35937394
B1	0.06670164	5				
C1	0.41797834	5				
D1	0.20486247	5				
A4	0.086016791	5	0.03940281	0.015227241	5	0.58733276
B4	0.185365421	5				
C4	0.622961171	5				
D4	0.249141784	5				
A8	0.520217268	5	0.16414296	0.034109955	5	0.00322494
B8	0.233055161	5				
C8	0.341542881	5				
D8	0.673717929	5				
Pu	0.134012874	5	-	0.000168379	5	-

Fonte: Elaboração própria

Legenda: Valores de *p* obtidos por teste Kruskal-Wallis, valores do grau de liberdade (df) e segundo quartil (Q2) (de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras) da quantificação relativa de gene de *Vg* e *VgR* nos ovários de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* dos grupos experimentais obtidos da PCR real time para cada um dos grupos experimentais por dia de experimento (1, 4 e 8). Grupo A: Fêmeas sem a presença de machos, nem hospedeiro; Grupo B: Fêmeas com a presença de machos, sem hospedeiro; Grupo C: Fêmeas com a presença de hospedeiro, sem machos; Grupo D: Fêmeas com a presença de machos e hospedeiro; PU: pupas.

Tabela C 2- Valores estatísticos referentes ao gráfico 8

Grupo	Q2 VGR	df	<i>p</i>	Q2 VG	df	<i>p</i>
A1	0.033708339	5	0.53175153	0.159274887	5	0.02975911
B1	0.038442804	5				
C1	0.089257928	5				
D1	0.071512359	5				
A4	0.047618689	5	0.03210972	0.094682475	5	0.73779183
B4	0.039432947	5				
C4	0.129619579	5				
D4	0.039332771	5				
A8	0.056260231	5	0.00309559	0.163584127	5	0.16607403
B8	0.04199173	5				
C8	0.209218023	5				
D8	0.030323169	5				
Pu	0.00325846	5	-	0.000143576	5	-

Fonte: Elaboração própria

Legenda: Valores de p obtidos por teste Kruskal-Wallis, valores do grau de liberdade (df) e segundo quartil (Q2) (de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras) da quantificação relativa de gene de Vg e VgR nas carcaças de fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* dos grupos experimentais obtidos da PCR real time para cada um dos grupos experimentais por dia de experimento (1, 4 e 8). Grupo A: Fêmeas sem a presença de machos, nem hospedeiro; Grupo B: Fêmeas com a presença de machos, sem hospedeiro; Grupo C: Fêmeas com a presença de hospedeiro, sem machos; Grupo D: Fêmeas com a presença de machos e hospedeiro; PU: pupas.