Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Fisiologia reprodutiva de *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Pentatomidae)

Priscila Fortes

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2010

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Priscila Fortes
Engenheiro Agronomo

Fisiologia reprodutiva de *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Pentatomidae)

Orientador:
Prof. Dr. **FERNANDO LUÍS CÔNSOLI**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2010

DEDICO

Aos amados pais Pedro Fortes e Adélia Silva Fortes. Sem o incentivo e apoio de vocês jamais teria conseguido atingir esta meta;

Ao meu marido Lisandro Inakake de Souza e meu filho Cauã Fortes Inakake, amores da minha vida;

Aos meus irmãos Pedro, Patrícia e Paula pelo amor, incentivo e apoio;

Aos meus queridos sobrinhos Gabriel Fortes Lira e Marina Sansão Fortes, alegria da família.

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – Departamento de Entomologia e Acarologia, pela oportunidade de realização do curso;

Ao Prof. Dr. Fernando L. Cônsoli, pela orientação e aprendizado adquirido ao longo destes anos;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, pela concessão da bolsa;

Aos professores e funcionários do Departamento de Entomologia e Acarologia;

Ao professor Dr. José Albertino Bendassolli pela atenção e colaboração para a realização de parte do experimento em isótopo estável;

À Dra. Marinéia Lara Haddad e Rafael Mourão pelo auxílio nas análises estatísticas;

À equipe do Laboratório de Interação em Insetos: Aline Guidolin, Angelina Marcomini, Carolina Schultz Lopes, Daniela Pinheiro, Fábio Dossi, Gabriela Salvador, Guilherme Rossi, Izabela Salvador, Karina Luca; Luis Gustavo de Almeida, Simone Prado, Tiago Zucchi, pela amizade, apoio e convívio durante estes anos;

As minhas queridas amigas Adriana Marques, Ana Lia Parra-Pedrazzoli, Neide Graciano Zério, Sandra Regina Magro.

Aos colegas do curso de Pós-graduação em Entomologia, pelos momentos agradáveis que passamos juntos.

SUMÁRIO

RESUMO ... 11
ABSTRACT ... 13
1 INTRODUÇÃO ... 15
Referências ... 17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ... 21
2.1 Estratégias reprodutivas de insetos ... 21
2.1.1 Morfologia do aparelho reprodutor feminino ... 21
2.1.2 Acasalamento ... 22
2.1.3 Contribuição nutricional via cópula ... 24
2.2 Nutrição dos insetos ... 25
2.2.1 Alocação de recursos nutricionais ... 25
2.3 Simbiontes ... 27
Referências ... 30
3 DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO DO OVÁRIO DE *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) ... 39
Resumo ... 39
Abstract ... 39
3.1 Introdução ... 40
3.2 Material e Métodos ... 42
3.2.1 Coleta e manutenção de colônia estoque de *Nezara viridula* ... 42
3.2.2 Desenvolvimento morfológico do ovário de *Nezara viridula* ... 42
3.2.3 Alterações na composição bioquímica da hemolinfa de *Nezara viridula* ... 43
3.2.3.1 Coleta da hemolinfa ... 43
3.2.3.2 Avaliação quantitativa de proteínas da hemolinfa de fêmeas de *Nezara viridula* ... 43
3.2.3.3 Avaliação qualitativa de proteínas da hemolinfa de fêmeas de *Nezara viridula* ... 44
3.3 Resultados ... 45
3.3.1 Desenvolvimento morfológico do ovário de *Nezara viridula* ... 45
3.3.2.1 Avaliação quantitativa de proteínas da hemolinfa de fêmeas de *Nezara viridula* ... 51
3.3.2.2 Avaliação qualitativa de proteínas da hemolinfa de fêmeas de *Nezara viridula* ... 52
3.4 Discussão ... 53
3.5 Conclusões ... 56
Referências ... 56
4 A FREQÜÊNCIA DE CÓPULA AFETA A REPRODUÇÃO DE *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)? ... 63
Resumo ... 63
Abstract ... 63
4.1 Introdução ... 64
4.2 Material e Métodos ... 66
4.2.1 Efeito da freqüência de cópulas sobre a reprodução de *Nezara viridula* ... 66
4.3 Resultados ... 66
4.4 DISCUSSÃO ... 72
5 ALOCAÇÃO DE NUTRIENTES PARA A REPRODUÇÃO DE *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE): EFEITO DA NUTRIÇÃO DO IMATURO E ADULTO ... 79
Resumo ... 79
Abstract ... 80

5.1 Introdução.....80
5.2 Material e Métodos 82
5.2.1 Criação de *Nezara viridula* 82
5.2.2 Determinação da estratégia de alocação de nutrientes.....83
5.2.2.1 Alocação de nutrientes da fase imatura - Investimento "capital" 83
5.2.2.2 Alocação de nutrientes da fase adulta - Investimento "income" 83
5.2.2.3 Preparo e analise de amostras para determinação isotópica de N por espectrometria de massas.....84
5.2.3 Efeito da qualidade do alimento nas fases imatura e adulta na fisiologia e reprodução de fêmeas de *Nezara viridula* 85
5.2.3.1 Efeito da alimentação na reprodução de *Nezara. viridula*.....85
5.2.3.2 Efeito da alimentação na composição bioquímica da hemolinfa e desenvolvimento do ovário de *Nezara viridula* 86
5.2.3.2.1 Análise quantitativa e qualitativa das proteínas.....86
5.2.3.2.1.1 Coleta da hemolinfa 86
5.2.3.2.1.2 Avaliação quantitativa de proteínas da hemolinfa de fêmeas de *Nezara viridula* 87
5.2.3.2.1.3 Avaliação quantitativa das vitelogeninas na hemolinfa de fêmeas de *Nezara viridula*.....87
5.2.3.2.2 Efeito da maturação do ovário de *Nezara viridula* ao término do período de pré-cópula 88
5.3 Resultados.....88
5.3.1 Alocação de nutrientes em *Nezara viridula* – investimento "capital" vs. "income".....88
5.3.2 Efeito da qualidade do alimento nas diferentes fases do desenvolvimento na fisiologia, maturação do ovário e aptidão reprodutiva de fêmeas de *Nezara viridula*.....90
5.3.2.1 Efeito na fisiologia.....90
5.3.2.1.1 Avaliação quantitativa de proteínas da hemolinfa de fêmeas de *Nezara viridula* ...90
5.3.2.1.2 Avaliação quantitativa das vitelogeninas da hemolinfa de fêmeas de *Nezara viridula* 91
5.3.2.2 Efeito na maturação do ovário de *Nezara viridula*.....93
5.3.2.3 Efeito na aptidão reprodutiva de *Nezara viridula* 94
5.4 Discussão.....97
5.5 Conclusões.....99
Referências.....99
6 BACTERIOFAUNA FACULTATIVA ASSOCIADA À VESÍCULA SEMINAL DE MACHOS DE *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) E O SEU EFEITO NA FECUNDIDADE DE FÊMEAS 103
Resumo.....103
Abstract.....103
6.1 Introdução.....104
6.2 Material e Métodos 106
6.2.1 Criação de *Nezara viridula* 106
6.2.2 Determinação da ocorrência, freqüência e densidade de simbiontes em machos virgens e acasalados da população estoque e na população natural de *Nezara viridula* 106
6.2.3 Cultivo e isolamento de simbiontes associados à vesícula seminal de *Nezara viridula*.....108
6.2.4 Caracterização molecular dos simbiontes.....108
6.2.5 Análise filogenética 109

6.2.6 Efeito das bactérias simbionte associadas à vesícula seminal na reprodução de *Nezara viridula* 110
6.3 Resultados..... 110
6.3.1 Determinação da ocorrência, freqüência e intensidade de infecção da vesícula seminal de *Nezara viridula* por bactérias simbiontes..... 110
6.3.2 Freqüência de infecção, isolamento caracterização molecular de bactérias simbiontes associadas à vesícula seminal de *Nezara viridula* 111
6.4 Discussão 115
6.5 Conclusões..... 118
Referências 118

RESUMO

Fisiologia reprodutiva de *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Pentatomidae)

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a fisiologia reprodutiva de *Nezara viridula* (L, 1758) (Hemiptera: Pentatomidae) e os fatores que influenciam o seu processo reprodutivo, como a frequência de cópula, a associação a bactérias simbiontes e a utilização de recursos nutricionais. Análises da composição bioquímica da hemolinfa durante o processo de maturação reprodutiva das fêmeas indicaram que a concentração de proteína total aumentou gradativamente durante o período de maturação dos ovários, sendo que as proteínas ligadas ao desenvolvimento de oócitos, as vitelogeninas, tornaram-se disponíveis na hemolinfa a partir do décimo dia de idade, período que corresponde à fase de pré-cópula. O desenvolvimento e a maturação de oócitos ocorreram de forma gradativa em função do aumento das proteínas disponíveis na hemolinfa das fêmeas. A cópula não foi essencial para o desenvolvimento dos ovários, indicando a inexistência de estímulos fisiológicos associados à distensão da espermateca ou à transferência de moléculas associadas ao fluído seminal de machos. Entretanto, a freqüência com que as fêmeas copularam afetou a capacidade reprodutiva de *N. viridula*, sendo as fêmeas que copularam por duas vezes as mais fecundas em relação àquelas que copularam múltiplas vezes. Este fato também indica a existência de custos fisiológicos associados à cópula para fêmeas, sendo ainda evidente a inexistência de relação positiva entre os possíveis benefícios da transferência de nutrientes pelo macho a fêmea e o número de cópulas realizadas. Análises relacionadas à utilização de recursos nutricionais indicaram que o desenvolvimento do ovário de *N. viridula* é basicamente dependente de nutrientes adquiridos na fase adulta, sendo que a fecundidade de fêmeas oriundas de ninfas criadas em dieta de valor nutricional reduzido, foi recuperada quando adultos foram alimentados em dieta de valor nutricional adequado. Foi verificado ainda uma rica diversidade de bactérias associadas ao aparelho reprodutor masculino de *N. viridula*, com predominância da Enterobacteriaceae *Klebsiella sp*, a qual foi anteriormente relatada associada ao intestino de *N. viridula.* Fêmeas copuladas com machos infectados ou não por estas bactérias não apresentaram qualquer efeito em sua capacidade reprodutiva.

Palavras-chave: Nutrição dos adultos; Reprodução; Freqüência de cópulas; Simbiontes

ABSTRACT

Reproductive physiology of *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Pentatomidae)

The objective of this research was to evaluate the reproductive physiology of *Nezara viridula* (L., 1758) (Hemiptera: Pentatomidae) and the factors that influence their reproductive process, such as mating frequency, association to symbiotic bacteria and the use of food resources. Analysis on biochemical composition of haemolymph during the reproductive maturation process of females indicated that the total protein concentration increased gradually during ovary maturation the proteins related to oocyte development, the vitellogenins, became available in the hemolymph from the tenth day of age, corresponding to the pre-copulation. Oocyte development and maturation occurred gradually due to the increase of protein available in hemolymph of females. Copulation was not requered for ovary development, indicating the absence of physiological stimuli associated with spermatheca distension or molecules with on male seminal fluids. However, the frequency females mated affected the reproductive capacity of *N. viridula*, to females that mated twice were the most fecund if compared to those mated multiple times. This also indicates that there are physiological cost associated with mating frequency, and that there is no positive relationship between the potential benefits from the transfer of nutrients from male to female and the number of mates performed. Analysis related to the use of food resources indicated that ovary development of *N. viridula* is basically dependent on nutrients acquired during adulthood. Fecundity of females obtained from nymphs reared on a low nutritional value diet was recovered when adults were fed on an adequate-nutritional diet. We further verified a rich diversity of bacteria associated with the male reproductive system of *N. viridula*, with predominance of the Enterobacteriaceae *Klebsiella sp*, which was previously reported associated with the gut of *N. viridula*. Females copulated by males infected or not by these bacteria did not show any effect on their reproductive capacity.

Keywords: Adult nutrition; Reproduction; Mating frequency; Symbionts

1 INTRODUÇÃO

A maximização do sucesso reprodutivo de fêmeas ocorre com a maior produção de ovos viáveis, enquanto a de machos é obtida com a fertilização do maior número possível de fêmeas (ARNQVIST; NILSSON, 2000). No entanto, são inúmeros os fatores envolvidos no processo reprodutivo e que afetam direta ou indiretamente a reprodução de machos e fêmeas, como a nutrição (FISCHER et al., 2004), a poliandria (ZEH; ZEH, 2001; GARCIA-GONZÁLES; SIMMONS, 2007) e a presença de simbiontes (MORAN; DUNBAR, 2006), entre outros.

É evidente que a nutrição é um dos principais fatores a afetar a reprodução em insetos. Os nutrientes a serem utilizados no processo de reprodução podem ter origem no processo de alimentação da fase imatura ou adulta, dependendo da estratégia reprodutiva do inseto. A utilização de nutrientes adquiridos exclusivamente na fase imatura de alimentação ou adulta não é definitiva, ocorrendo um gradiente entre estes extremos. Em muitos insetos, a capacidade de utilização de recursos nutricionais na fase adulta para sustentar processos ligados à reprodução está diretamente ligada à sua capacidade de se alimentar. Os insetos que utilizam reservas de nutrientes acumuladas por imaturos para sustentar seu processo reprodutivo são denominado de "capital breeders", enquanto aquelas que investem nutrientes adquiridos na fase adulta são denominadas de "income breeders". Os nutrientes adquiridos na fase adulta são normalmente derivados do seu alimento, mas podem também ter origem no processo de cópula, dada pela transferência de nutrientes associados ao fluído seminal de machos (BOGGS, 1997; JERVIS; FERNS, 2004; TAMMARU; HAUKIOJA, 2006). A interação de recursos nutricionais das fases imatura e adulta afeta diretamente o processo reprodutivo das fêmeas como o desenvolvimento dos ovários, a vitelogênese e a fecundidade (ADAMS, 1997).

A aquisição de nutrientes via cópula pode ser influenciada pelo número de cópulas realizadas pela fêmea, dada pela quantidade do complexo de proteínas produzido pelas glândulas acessórias do macho, que pode ser transferido à fêmea juntamente com o esperma, no momento da fecundação (WOLFNER, 2002). Este complexo de proteínas pode exercer efeitos diversos na fisiologia e comportamento das fêmeas, sendo que muitas servem de nutrientes para a sustentação de tecidos somáticos da fêmea, para a sustentação do processo de vitelogênese ou desenvolvimento do embrião (CHEN, 1984; WOLFNER, 1996; HAYASHI; HAMIMURA, 2002). No entanto, há custos associado à cópula, sendo que o tempo e a energia gastos durante a cópula (DALY, 1978; WATSON; ARQNVIST; STALLMAN, 1998) estão associados a riscos,

como o aumento da taxa de predação (ARNQVIST, 1997), a injúria física (HELVERSEN; HELVERSEN, 1991; CRUDGINGTON; SISA-JOTHY, 2000) podendo levar à infecção por parasita ou patógeno (HURST et al., 1995), uma vez que a cópula pode resultar na supressão da resposta imune, tornando o inseto mais susceptível a infecção por patógenos (ROLFF; SISA-JOTHY, 2002). A cópula também pode inibir a receptividade das fêmeas a outros machos (SNOOK, 1998). Estes custos associados com o acasalamento podem diminuir a longevidade e a fecundidade das fêmeas (ARNQVIST; NILSSON, 2000; OMKAR; MISHRA, 2005). De uma forma geral, mesmo com os riscos associados à realização de múltiplas cópulas, vários são os casos em que ocorre estreita relação entre o número de cópulas realizado pela fêmea e a fecundidade (MCLAIN; LANIER; MARSH, 1990; WARD; LANDOLT, 1995; HSU; WU, 2000)

Vários insetos apresentam relações de simbiose das mais diversas com microrganismos, que podem ser facultativas ou obrigatórias, resultando em interações neutras, mutualísticas ou patogênicas. As interações em que as associações são obrigatórias são normalmente relações de mutualismo, enquanto aquelas associações facultativas podem resultar em relações bastante variáveis, que podem afetar a aptidão biológica do hospedeiro, no caso, o inseto (DIXON, 1998; WERNEGREEN, 2002). Os simbiontes obrigatórios são sempre transmitidos verticalmente, existindo um alto grau de dependência entre hospedeiro e simbionte. Neste caso, hospedeiros dependem da disponibilização de nutrientes produzidos pelo simbionte, os quais são normalmente encontrados em concentrações inadequadas na sua dieta natural, influenciando, assim, o seu crescimento, desenvolvimento e reprodução (DOUGLAS, 1996; WERNEGREEN, 2002; MORAN; DUNBAR, 2006). Já os simbiontes facultativos podem ser transmitidos vertical ou horizontalmente, intra ou extracelulares, distribuindo-se por diferentes tecidos do hospedeiro. Podem influenciar o sistema imune de seus hospedeiros, tornando-os mais resistentes a parasitóides e patógenos, influencia a resistência do hospedeiro a fontes de estresse e o comportamento de seleção hospedeira, além de contribuir de forma negativa ou positiva para a capacidade reprodutiva dos mesmos (CHEN; MONTLOR; PURCELL, 2000; GOEBEL; GROSS, 2001; OLIVER et al., 2003).

Desta forma, estudos que permitam compreender a fisiologia reprodutiva de insetos são extremamente importantes para que melhor se entenda a sua bioecologia, utilizando-se dessas informações para melhor compreender os aspectos ligados à sua reprodução e, consequentemente, à sua capacidade de crescimento populacional, permitindo a utilização destes

conhecimentos no desenvolvimento ou na melhor aplicação de técnicas de controle do inseto ou no desenvolvimento de sistemas de criação eficientes, que visem à produção de agentes de controle biológico, por exemplo. Assim, a presente pesquisa buscou estudar os diversos fatores que afetam a reprodução de *Nezara viridula* (Hemipetra: Pentatomidae), para que estes conhecimentos possam ser aplicados ao desenvolvimento de programas de controle biológico ou de outras táticas de controle deste inseto praga.

Referências

ADAMS, T.S. Arthopoda-Insecta. In: ADAMS, T.S. (Ed). Reproductive biology of invertebrates. **Progress in Reproductive Endocrinology,** New York, v. 8, p. 277-338, 1997.

ARNQVIST, G. The evolution of water strider mating systems: causes and consequences of sexual conflicts. In: CHOE, J.C.; CRESPI, B.J. (Ed). **The Evolution of mating system in insects and arachnids.** Cambridge: University Press. v.1, 1997, p.146-163.

ARNQVIST, G.; NILSSON, T. The evolution of polyandry; multiple mating and female fitness in insects. **Animal Behavior**, London, v. 60, p. 145-164, 2000.

BOGGS, C.L. Dynamics of reproductive allocation from juvenile and adult feeding: radiotracer studies. **Ecology**, Washington, v. 78, p.192-202, 1997.

CHEN, D.Q.; MONTLOR, C.B.; PURCELL, A.H. Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrthosiphon pisun*, and the blue alfalfa aphid, *A. kondoi.* **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 95, p. 315-323, 2000.

CHEN, P.S. The functitional morphology and biochemistry of insect male accessory glands and their secretions. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 29, p. 233-255, 1984.

CRUDGINGTON, C.; SIVA-JOTHY, M.T. Genital damage, kicking and early death. **Nature**, London, v. 407, p. 855-856, 2000.

DALY, M. The cost of mating. **American Naturalist**, Chicago, v. 112, p. 771-774, 1978.

DIXON, A.F.G.**Aphid ecology**. London. : Chapman & Hall, 1998. 300 p.

DOUGLAS, A.E. Reproductive failure and the free amino acid pools in pea aphids (*Acyrthosiphon pisum*) lacking symbiotic bacteria. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 42, p. 247-255, 1996.

FISCHER, K.; O'BRIEN, D.M.; BOGGS, C.L. Allocation of larval and adult resources to reproduction in a fruit-feeding butterfly. **Functional Ecology**, Oxford, v.18, p. 656-663, 2004

GARCIA-GONZALES, F.; SIMMONS, L.W. Paternal Indirect genetic effects on offspring viability and the benefits of polyandry. **Current Biology**, London, v.17, p.32-36, 2007.

GOEBEL, W.; GROSS, R. Intracellular survival strategies of mutualistic and parasitic prokaryotes. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 9, n. 6, p. 267-273, 2001.

HAYASHI, F., KAMIMURA, Y. The potential for incorporation of male derived proteins into developing eggs in the leafhopper *Bothrogonia ferrginea*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 48, p. 153-159, 2002.

HELVERSEN, D.V.; HELVERSEN, O.V. Pre-mating sperm removal in the bush cricket *Metaplastes ornatus* Ramme 1931 (Orthoptera, Tettigonidae, Phaneropteridae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 28, p. 391-396, 1991.

HSU, M.H; WU, W.J. Effects of multiple mating on female reproductive output in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 37, p. 828–834, 2000.

HURST, G.D.D.; SHARPE, R.G.; BROOMFIELD, A.H.; WALKER, L.E.; MAJERUS, T.M.O.; ZAKHAROV, I.A.; MAJERUS, M.E.N. Sexually transmitted disease in a promiscuous insect, *Adalia bipunctata*. **Ecological Entomology**, London, v. 20, p. 230-236, 1995.

JERVIS, M.; FERNS, P. The timing of eggs maturation in insects: ovigeny index and initial egg load as measures of fitness and of resource allocation. **Oikos**, Copenhagen, v. 107, p. 449-460, 2004.

MCLAIN, D.K.; LANIER, D.L.; MARSH, N.B. 1990. Effects of female size, mate size, and number of copulations on fecundity, fertility, and longevity of *Nezara viridula* (Hemiptera :Pentatomidae). **Heredity**, London, v. 64, p. 161-167, 1990

MORAN, N.A.; DUNBAR, H.E. Sexual acquisition of beneficial symbionts in aphids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, n. 34, p. 12803-12806, 2006.

OLIVER, K.M.; RUSSELL, J.A.; MORAN, N.A.; HUNTER, M.S. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 100, n. 4, 1803-1807, 2003.

OMKAR; MISHRA, G. Mating in aphidophagous ladybirds: cost and benefits. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 129, n. 8, p. 432-436, 2005.

ROLFF, J.;SIVA-JOTHY, M.T. Copulation corrupts immunity: A mechanism for a cost of mating in insects. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v.99, n.15, p.9916-9918, 2002.

SNOOK, R. The risk of sperm competition and the evolution of sperm heteromorphism. **Animal Behaviour**, London, v. 56, p. 1497–1507, 1998.

TAMMARU, T.; HAUKIOJA, E. Capital breeders and income breeders among Lepidoptera: consequences to population dynamics. **Oikos**, Copenhagen, v. 77, p. 561-564, 2006.

WATSON, P.J.; ARQNVIST, G.; STALLMAN, R.R. Sexual conflict and the energetic cost of mating and mate choice in water striders. **American Naturalist**, Chicago, v. 151, p. 46-58, 1998.

WARD, K.E.; LANDOLT, P.J. Influence of Multiple Matings on Fecundity and Longevity of Female Cabbage Looper Moths (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 88, n.6, p. 768-772, 1995.

WERNEGREEN, J.J. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. **Nature**, London, v. 3, p. 850-860, 2002.

WOLFNER, M. Tokens of love: Functions and regulations of Drosophila male accessory gland products. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 27, n.3, p. 179-192, 1996.

WOLFNER, M. The gifts that keep on giving: physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in Drosophila. **Heredity**, London, v. 88, p. 85-93, 2002.

ZEH, J.A.; ZEH, D.W. Reproductive mode and the genetic benefits of polyandry. **Animal Behaviou**r, London, v. 61, p. 1051-1063, 2001.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estratégias reprodutivas de insetos

2.1.1 Morfologia do aparelho reprodutor feminino

O aparelho reprodutor feminino de insetos desempenha várias funções como a produção de ovos, recepção e armazenamento de espermatozóides e a coordenação de eventos envolvidos na oviposição (BÜNING, 1994; CHAPMAN, 1998; PAPAJ, 2000; SIMICZYJEW, 2003).

Os ovários de insetos podem ser divididos em dois tipos, panoístico e meroístico, baseando-se no destino de células germinativas no decorrer do desenvolvimento (NIJHOUT, 1994; CHAPMAN, 1998). Nos ovários panoísticos, todas as células germinativas podem se tornar oócitos, enquanto que nos meroísticos as divisões dos cistoblastos levam à formação de agrupamentos de células irmãs que permanecem conectadas por pontes citoplasmáticas. Os cistócitos sofrem diferenciação, dando origem aos trofócitos e oócitos (BÜNING, 1994; SIMICZYJEW, 2003).

Os ovários meroísticos podem ser classificados em duas categorias: politróficos e teletróficos. Os politróficos são caracterizados pela formação alternada de trofócitos e oócitos ao longo do ovaríolo, sendo que os trofócitos acompanham os oócitos ao longo do seu desenvolvimento no ovário. No caso dos ovários teletróficos, as células tróficas são mantidas numa câmara terminal, comunicando-se com os oócitos via cordão trófico (KING; BÜNING, 1985; BÜNING, 1994; GILLOT, 2005). Os representantes da ordem Hemiptera possuem ovário do tipo meroístico teletrófico, exibindo de 1 a 15 ovaríolos por ovário nas subordens Auchenorrhyncha e Sternorryncha, e cerca de 7 na subordem Heteroptera (BÜNING, 1985; 1994; HUMMEL; ZALOM; PENG, 2006).

De forma geral, o aparelho reprodutor feminino de insetos é formado por um par de ovários, sendo cada ovário formado por ovaríolos e um oviduto lateral, que convergirão formando o oviduto comum. Este continua posteriormente pela vagina, formada por células epiteliais, que se abre no exterior via gonóporo feminino ou vulva. Também há a espermateca, estrutura que recebe e armazena espermatozóides durante o intervalo entre a cópula e a fecundação dos oócitos. O número de ovaríolos é bastante variável entre os diferentes táxons,

ocorrendo de um ovaríolo funcional em pulgões vivíparos a mais de 2000 ovaríolos em rainhas de cupins (BÜNING, 1994).

Cada ovaríolo apresenta-se organizado em três regiões distintas, sendo: *i)* filamento terminal, localizado na extremidade anterior do ovaríolo, podendo unir-se aos demais filamentos dos ovaríolos, formando o filamento mediano, que sustenta o ovário na cavidade abdominal; *ii)* germário ou trofário, região apical do ovaríolo logo abaixo do filamento terminal, onde esta estrutura abriga células que darão origem aos trofócitos, oócitos e células foliculares, constituintes do folículo ovariano; *iii)* vitelário, região posterior ao trofário, na qual o oócito passa pelo processo de vitelogênese e coriogênese, compreendendo a maior porção do ovaríolo (BÜNING, 1994; SANTOS; GREGÓRIO, 2003).

2.1.2 Acasalamento

Assim como em outros organismos em que ocorre a fecundação interna, a cópula nos insetos consiste na transferência de esperma para as fêmeas, trazendo ainda como benefícios a transferência de nutrientes e água (HOLLANDER; GWYNNE, 2009). Cada cópula oferece uma oportunidade para machos deixarem seus descendentes; com isso, a aptidão biológica dos machos está relacionada ao número de fêmeas inseminadas durante sua vida, sendo o seu sucesso reprodutivo proporcional à sua freqüência de cópulas. Já o sucesso reprodutivo de fêmeas é alcançado pela maior produção de ovos viáveis, que pode ou não ser influenciada pelo número de cópulas realizado. No entanto, devido à existência de custos biológicos associados à cópula e reprodução, os benefícios da realização de cópulas múltiplas no sucesso reprodutivo nem sempre são verdadeiros para as fêmeas (ARNQUVIST; NILSSON, 2000; JENNIONS; PETRIE, 2000).

É comum a observação de múltiplas cópulas em fêmeas de insetos, ligadas ou não à poliandria. Estudos sobre as possíveis funções da ocorrência de múltiplas cópulas em fêmeas produziram grande número de informações que demonstram o seu efeito na aptidão biológica de fêmeas. Variações na freqüência de cópulas geralmente demonstram que múltiplas cópulas aumentam a fecundidade de fêmeas, apesar de alguns relatos abordarem os efeitos negativos dessa atividade sexual freqüente (RIDLEY, 1988; OMKAR, 2005).

Existem várias estratégias para se evitar a competição em espécies que realizam múltiplas cópulas. O período de duração da cópula pode ser estratégico no processo de competição entre

machos, já que cópulas prolongadas limitam o acesso de outros machos àquela fêmea e permitem a transferência do volume máximo de espermatozóides e de substâncias associadas à vesícula seminal, levando ao completo preenchimento da espermateca, evitando, assim, que a fêmea se torne receptiva novamente (WANG; MILLAR, 1997; MCLAIN, 1998; RUTOWSKI, 1998). Entretanto, assim como demonstrado para *Nezara viridula* e *Nezara antennata* (Heteroptera: Pentatomidae), a realização de uma segunda cópula pode se fazer necessária devido à perda de fluído seminal durante o próprio processo copulatório (KON; NUMATA, 1993). Por isso, a realização de múltiplas cópulas é necessária na maioria dos insetos, podendo influenciar a fertilidade das fêmeas (RIDLEY, 1988; MCLAIN, 1998; TORRES; ZANUNCIO, 2001).

No entanto, o acasalamento envolve custo para as fêmeas, sendo que o tempo e a energia gastos durante a cópula (DALY, 1978; WATSON; ARQNVIST; STALLMAN, 1998) estão associados a riscos, como o aumento da taxa de predação (SHINE; O'CONNER; MASON, 2000), redução na alimentação (ROWE, 1992) ou oportunidade de oviposição (SAKURAI; KASUYA, 2008), podendo reduzir a longevidade e a fecundidade (MÜHLHAÜSER; BLANCKENHORN, 2002; BATEMAN; FERGUSON; YERMAN, 2006; RÖNN; KATVALA; ARNQVIST, 2006), além de causar injúria física (HELVERSEN; HELVERSEN, 1991).

Há evidencias que a cópula suprime a atividade antibacteriana (MCKEAN; NUNNEY, 2001) e o sitema imune do inseto (BREY, P.T.; HULTMARK. 1998), consequentemente aumenta o potencial de sucesso de transmissão de doenças sexualmente transmissíveis. A cópula induz baixa regulação da função imune podendo ser uma porta de entrada de patógenos (HURST et al., 1995; ROLFF; SIVA-JOTHY, 2002)

O sucesso reprodutivo de fêmeas também envolve a seleção de parceiros com alta aptidão biológica. Diversas características estão envolvidas no processo de seleção sexual das fêmeas, sendo que o tamanho dos machos tem sido normalmente relacionado como um dos principais atributos no processo de seleção por parceiros (MCLAIN; LANIER; MARSH, 1990). Para *N. viridula,* machos maiores liberam maior quantidade de feromônio (MCLAIN, 1980) e são mais competitivos e agressivos em relação aos menores, tendo maior probabilidade de fecundar as fêmeas (MCLAIN, 1980; 1985). Insetos maiores também transferem maior quantidade de nutrientes durante a cópula, influenciando a fecundidade de fêmeas (GWYNNE, 1984; KASULE 1986).

Ainda, um dos fatores relacionados com a fecundidade das fêmeas é a sanidade dos machos. Machos doentes podem transmitir às fêmeas infecções via cópula, comprometendo o sucesso reprodutivo e a saúde das mesmas. Na maioria dos insetos, cópulas com machos infectados afetam negativamente a fecundidade e fertilidade de fêmeas (JAENIKE, 1988; ZUK, 1988).

2.1.3 Contribuição nutricional via cópula

Durante a cópula os machos transferem fluido seminal contendo esperma e uma variedade de peptídeos especializados produzidos por glândulas acessórias (CHEN, 1984; WOLFNER, 2002). Numerosos estudos demonstraram que as glândulas acessórias possuem papel essencial na reprodução de insetos. Análises quantitativas da secreção do macho de *Menida scotti* (Heteroptera: Pentatomidae) indicaram altas concentrações de proteínas e lipídeos na secreção dos bulbos ejaculatórios e das glândulas acessórias, tendo valores bastante elevados quando comparados àqueles encontrados na hemolinfa do inseto, evidenciando que as secreções do macho têm alto valor nutricional (KOSHIYAMA et al., 1996).

Diversos efeitos na fisiologia e comportamento das fêmeas podem ser induzidos pelas substâncias transferidas juntamente com o esperma (HINTON, 1974). O complexo de proteínas penetra na hemolinfa após a cópula e influencia os sistemas nervoso e endócrino, promovendo a elevação da oviposição e diminuindo a taxa de recopula pela inibição da receptividade sexual (CHEN, 1984). Também podem estar envolvidas na competição de esperma entre machos, tendo efeito negativo no esperma do macho armazenado na cópula precedente (HARSHAMAN; PROUT, 1994; CLARK et al., 1995).

Em *Aedes*, as secreções das glândulas acessórias desencadeiam várias reações fisiológicas, como a indução de monogamia estimula a oviposição, aumenta a fertilidade e longevidade (RAMALINGAM; CRAIG, 1978). Em *Drosophila*, grânulos da secreção auxiliam na mobilidade do espermatozóide no canal genital das fêmeas, servindo de substrato energético para manter a atividade do espermatozóide, além de auxiliar sua penetração no ovo (BAIRATI, 1966).

O complexo de proteínas transferido para as fêmeas aumenta a reprodução e também pode ser utilizado como componente nutritivo para a manutenção de tecidos somáticos. Essas proteínas

influenciam a fecundidade quando as fêmeas estão sob estresse nutricional (BUTLIN; WOODHATCH; HEWITT, 1987; BOGGS, 1990; WHEELER, 1996), e a fertilidade (KLOWDEN, 1999). Fêmeas de *Isophya kraussi* (Orthoptera: Tettigoniidae) podem utilizar o fluido seminal como dieta para a manutenção do corpo até encontrar outra fonte alimentar (VOIGT et al., 2006). A reserva de energia que o espermatozóide de *I. kraussi* possui é considerada o dobro daquela gasta diariamente pela fêmea. Durante o intervalo entre cópulas (2 dias), fêmeas podem se nutrir exclusivamente de espermatozóides, os quais fornecem energia suficiente para a produção de ovos e também para a manutenção da homeostase do corpo (VOIGT et al., 2006).

Estudos realizados com *Ellychnia corrusca* (Coleoptera: Lampyridae) e *Photinus ignitus* (Coleoptera: Lampyridae) demonstraram que as proteínas transferidas pelos machos durante a cópula foram alocadas de forma distinta nestas espécies. Fêmeas de *P. ignitus* alocaram a maior parte das proteínas transferidas pelo macho para a maturação de oócitos dentro de dois dias após a cópula, enquanto que *E. corrusca* destinou a maioria das proteínas ao tecido adiposo. Para as fêmeas que não se alimentam e tem longevidade curta, os recursos nutricionais advindos dos machos são alocados para a produção de ovos, enquanto fêmeas que se alimentam e são mais longevas destinam grande parte desses recursos para a manutenção do metabolismo básico e tecidos somáticos (ROONEY; LEWIS, 1999).

2.2 Nutrição dos insetos

2.2.1 Alocação de recursos nutricionais

Os insetos possuem diferentes estratégias de reprodução relacionadas ao desenvolvimento ovariano e às decisões de alocação dos recursos nutricionais adquiridos ao longo do desenvolvimento pré-imaginal e imaginal. Assim, existem dois extremos que ilustram essas diferentes estratégias reprodutivas, a pró-ovigenia e a sinovigenia, existindo, é claro, aquelas espécies que se distribuem em um gradiente entre esses dois extremos e que podem ser categorizadas pela determinação do índice de ovigenia (JERVIS; FERNS, 2004).

A pró-ovigenia ocorre naqueles insetos em que as fêmeas emergem com o complemento total de oócitos, os quais estão prontos para fertilização e deposição, como são os casos de

Callosobruchus maculatus (Coleoptera: Bruchidae) e *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). Neste caso, o desenvolvimento do ovário e a capacidade reprodutiva destes insetos estarão ligados à nutrição da fase imatura e à alocação dos nutrientes para o desenvolvimento ovariano durante o processo de metamorfose (YANAGI; MIYATAKE, 2003). Durante a metamorfose, excedentes de nutrientes adquiridos durante o estágio imaturo são realocados e os adultos emergem com certo nível de reserva advinda da fase juvenil. A qualidade, quantidade e alocação de reservas nutricionais da fase pré-imaginal para a produção de ovos e sobrevivência de adultos são aspectos chaves para os insetos (BOGGS, 1997a, b). Desta forma, a fecundidade de insetos pro-ovigênicos independe da nutrição do adulto (YANAGI; MIYATAKE, 2003).

A sinovigenia é comum aos insetos em que as fêmeas emergem sem ou com poucos oócitos desenvolvidos, ocorrendo o amadurecimento gradual dos mesmos, dependendo da qualidade e quantidade de nutrientes adquiridos pela alimentação na fase adulta (KARLSSON, 1994; BOGGS 1997b; OBERHAUSER, 1997).

Assim como nos demais insetos que necessitam adquirir nutrientes via alimentação na fase adulta para a sustentação do processo reprodutivo, a qualidade e quantidade das fontes nutricionais para Heteroptera influenciam diretamente os processos de síntese de vitelogeninas (vitelogênese) e oogênese (ADAMS, 1997; DAVEY, 1997). A nutrição nos estágios imaturo e adulto impacta o desenvolvimento reprodutivo e a fisiologia dos insetos. Fontes nutricionais nos estágios imaturos e adultos podem ser utilizadas para a produção de ovos por todo o período reprodutivo das fêmeas. O custo de produção de ovos em insetos pode ser visto como dois componentes distintos, tendo custo para a maturação dos ovos (oogênese) e o custo da oviposição (YANAGI; MIYATAKE, 2003; RÖNN; KATVALA; ARNQVIST, 2006). Nutrientes alocados na fase imatura de fêmeas de *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae) foram os mais importantes para a produção de ovos logo após a emergência deste inseto. Entretanto, as reservas oriundas da fase larval para a produção de ovos diminuíram em dias subseqüentes, e os adultos utilizaram nutrientes adquiridos via alimentação durante a fase adulta (RIVERO; GIRON; CASAS, 2001).

Para *Podisus maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae), a fonte nutricional de ninfas tem papel importante no desenvolvimento dos ovários, principalmente na formação dos folículos pré-vitelogênicos. A fonte alimentar dos adultos torna-se importante durante o processo de vitelogênese, enquanto todo o processo reprodutivo, incluindo a fecundidade e sobrevivência dos

descendentes, é afetado pela interação dos recursos nutricionais das fases imatura e adulta (WHEELER, 1996; WITTMEYER; COUDRON, 2001). Para *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae), o regime alimentar influenciou os parâmetros biológicos do predador. A qualidade do alimento na fase adulta foi mais importante em relação à fase ninfal. *M. caliginosus* criados em dieta artificial na fase ninfal e transferidos posteriormente para dieta natural, ovos de *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), após a emergência, produziram quatro vezes mais ovos em relação aos adultos mantidos em dieta artificial. Fêmeas alimentadas com ovos de *E. kuehniella* apresentaram maior número de oócitos em relação àquelas alimentadas com dieta artificial (VANDEKERKHOVE et al., 2006).

2.3 Simbiontes

Muitas espécies de insetos em várias ordens dependem obrigatoriamente do mutualismo com microrganismos, principalmente bactérias (MORAN; BAUMANN, 2000). Esta associação de mutualismo, intracelular na maioria das vezes, é chamada de primária (P) ou obrigatória, já que são necessárias à sobrevivência e reprodução de seu hospedeiro. Endossimbiontes primários de insetos ocorrem em células especializadas do hospedeiro, chamadas de bacteriócitos ou micetócitos, que podem formar uma estrutura única, denominada bacterioma ou micetoma, composta de uma região celular e outra sincicial, e que se localiza na cavidade hemocélica do inseto hospedeiro (WERNEGREEN, 2002). Os simbiontes primários são transmitidos verticalmente, existindo alta dependência entre hospedeiro e simbionte, como as associações afídeos-*Buchnera* e a mosca tsé-tsé-*Wigglesworthia.* Esses simbiontes apresentam adaptações particulares, sendo normalmente associados a processos metabólicos como a síntese de nutrientes essenciais e reciclagem de nitrogênio, compensando, desta forma, as deficiências nutricionais da dieta natural de seus hospedeiros, assim como indicam as análises recentes do genoma dos mesmos (DOUGLAS, 1996; WERNEGREEN, 2002; TAMAS et al., 2002; MORAN, 2003).

Existem também aqueles simbiontes denominados secundários (S), que estão associados facultativamente aos seus hospedeiros. Os simbiontes secundários podem ser encontrados em diversos órgãos dos insetos, habitando ou não o ambiente intracelular, sendo transmitidos de forma vertical ou horizontal (WERREN, 1997; WERREN; WINDSOR, 2000).

Existem mecanismos distintos de transmissão de simbiontes que envolvem rotas internas e externas de transmissão, garantindo a associação permanente entre hospedeiro-simbionte. Na maioria das espécies, os simbiontes são transmitidos verticalmente, por via transovariana, i) infectando células germinativas imaturas, como oogônia ou oócitos pré-vitelogênicos, ii) invadindo oócitos em estágio avançado de maturação, e, nas formas partenogenéticas, como afídeos, iii) infectando o ovo durante a embriogênese (AL-KHALIFA, 1984; GUTZEIT; ZISSLER; PEROMDINI, 1985; SACCHI et al., 1985; ZELAZOWSKA; BILINSKI, 1999). Em ninfas de Anoplura, os bacteriócitos se distribuem entre as células epiteliais do intestino médio e na base dos ovaríolos, em contato com os ovidutos laterias, sendo transferidos para os oócitos durante a oogênese (SACCHI et al., 2000). Para outros grupos de insetos, os simbiontes migram do bacteriócito e penetram as células germinativas. No caso de afídeos sexuados, por exemplo, acredita-se que o simbionte primário *Buchnera aphidicola* invada os ovos pouco antes da oviposição via cordão trófico (BAUMANN, 2005). Para *Diaphorina citri* (Hemiptera: Psyllidae), a migração de simbiontes está relacionada ao início do ciclo oogênico, ocorrendo a invasão no oócito nas etapas de pré-vitelogênese e vitelogênese, podendo invadir o ovário (vitelário e trofário) individualmente ou por meio de bacteriócitos (DOSSI, 2008).

Para simbiontes extracelulares, como aqueles presentes no lúmen do intestino médio (Reduvidae) ou nos cecos gástricos (Pentatomidae, Plataspidae e Alydidae), a sua transmissão também envolve mecanismos específicos. Em *Megacopta punctatissima* (Heteroptera: Plataspidae), fêmeas depositam seus ovos juntamente com cápsulas fecais contendo simbiontes que habitam o trato digestivo deste inseto. Estas cápsulas são depositadas junto à base dos ovos e são repletas de bactérias pertencentes à subdivisão γ das proteobactérias, que colonizarão o intestino de ninfas recém-eclodidas após a utilização das cápsulas como substrato alimentar pelas mesmas (FUKATSU; HOSOKAWA, 2002). Para o pentatomideo *N. viridula*, os simbiontes do trato digestivo são transferidos para seus descendentes também via alimentação de ninfas recém-eclodidas. Neste caso, os simbiontes são espalhados sobre a superfície externa dos ovos, ficando acessíveis às ninfas durante o comportamento gregário do primeiro ínstar, quando então são ingeridos pelas mesmas (PRADO; RUBINOFF; ALMEIDA, 2006). Provavelmente, simbiontes extracelulares localizados no trato digestivo destes percevejos tenham desenvolvido mecanismos extracelulares de transmissão, ao contrário da transmissão transovariana encontrada em simbiontes intracelulares de outros insetos (KIKUCHI et al., 2009). Para *Riptortus clavatus*

(Hemiptera: Alydidae) e *Leptocorisa chinensis* (Hemiptera: Alydidae), os simbiontes dominantes no trato digestivo não são transmitidos verticalmente pelas fêmeas, sendo adquiridos no ambiente (solo), a cada geração, durante o primeiro ínstar (KIKUCHI et al., 2005, 2007). Ainda podem ser encontrados aqueles simbiontes que são transferidos durante a cópula e que se alojam nas estruturas reprodutivas dos adultos, estabelecendo relações patogênicas, as quais resultam na redução da fertilidade e longevidade dos adultos (MORAN; DUNBAR, 2006).

O comportamento e a biologia dos insetos na fase imatura podem ser afetados pelos simbiontes. Ninfas recém-eclodidas de *M. punctatissima* mudam o comportamento quando eclodem de ovos que não possuem cápsulas de simbiontes associadas. As ninfas não permanecem agregadas durante o primeiro ínstar, e os aspectos biológicos são afetados de forma negativa, com prolongamento da fase ninfal, aumento da taxa de mortalidade e formação de adultos estéreis (FUKATSU; HOSOKAWA, 2002; HOSOKAWA et al., 2008). O comportamento de agregação está relacionado com a defesa contra dessecação e a predação por inimigos naturais, o desenvolvimento rápido e a redução da mortalidade (KIRITANI, 1964; LOCKWOOD; STORY, 1986), além de ser necessário para a aquisição de simbiontes presentes na superfície dos ovos (PRADO et al., 2009). O efeito dos simbiontes sobre os hospedeiros pode estar relacionado com a origem polifilética das bactérias associadas aos Pentatomidae (PRADO; ALMEIDA, 2009). Essa associação está baseada em um único modo de transmissão, o qual inclui uma curta fase na qual o simbionte está fora de seu hospedeiro. O fato dos simbiontes não serem essenciais para seus hospedeiros não significa que os mesmos não sejam importantes. Para *Parastrachia japonensis* (Hemiptera: Parastrachiidae), os simbiontes exercem um importante papel nutricional e ainda participam da proteção contra condições adversas (KASHIMA; NAKAMURA; TOJO, 2006).

A associação inseto-simbionte secundário pode ser benéfica ou prejudicial ao hospedeiro. Algumas dessas associações facultativas influenciam diretamente a reprodução do hospedeiro, como, por exemplo, a α-proteobactéria *Wolbachia*, de ocorrência comum entre os invertebrados, e o bacterioidete *Cardinium*, comum a ácaros, homópteros e seus inimigos naturais, os quais afetam o modo de reprodução de seus hospedeiros (WERREN, 1997; WERREN; WINDSOR, 2000; ZCHORI-FEIN et al., 2001; ZCHORI-FEIN; PERLMAN, 2004).

Referências

ADAMS, T.S. Arthopoda-Insecta. In: ADAMS, T.S. (Ed). Reproductive Biology of Invertebrates. **Progress in Reproductive Endocrinology,**, New York, v. 8, p. 277-338, 1997.

AL-KHALIFA, M.S. The transovarial transmission of symbionts in the grain weevil, *Sitophilus granaries.* **Journal Invertebrate Pathology,** New York, v.44, p. 106-108, 1984.

ARNQVIST, G.; NILSSON, T. The evolution of polyandry; multiple mating and female fitness in insects. **Animal Behaviour**, London, v. 60, p. 145-164, 2000.

BAIRATI, A. Filamentous strutures in spermatic fluid of *Drosophila melanogaster* Meig. **Journal of Microscopy**, Oxford, v.5, p. 265-268, 1966.

BATEMAN, P.W.; FERGUSON, J.W.H.; YERMAN, C.A. Courtship and copulation, but not ejaculate, reduce the longevity of female field crickets (*Gryllus bimacullarus*). **Journal of Zoology**, London, v. 268, p.341-346, 2006.

BAUMANN, P. Biology of bacteriocyte-associated andosymbionts of plant sap-sucking insects. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 155-189, 2005.

BOGGS, C.L. Dynamics of reproductive allocation from juvenile and adult feeding: radiotracer studies. **Ecology**, Washington, v. 78, p. 192-202, 1997a.

BOGGS, C.L. Reproductive allocation from reserves and income in butterfly species with differing adult diets. **Ecology**, Washington, v.78, p.181-191, 1997b.

BOGGS, C.L. A general model of the role of male-donated nutrients in female insects' reproduction. **American Naturalist**, Chicago, v. 136, p. 598-617, 1990.

BREY, P.T.; HULTMARK, D. **Molecular mechanisms of immune responses in insect**. , London: Chapman & Hall, 1998. 325p.

BÜNING, J. Morphology, ultrastructure, and germ cell cluster formation in ovarioles of aphids. **Journal of Morphology**, Philadelphia, v. 186, p. 209-221, 1985.

BÜNING, J. The ovary of Ectognatha, the Insecta.s.str. In BÜNING, j. (Ed.). **The insect ovary:** ultrastructure, previtellogenic growth and evolution. London: Chapman & Hall, 1994. p. 281-299.

BUTLIN, R.K.; WOODHATCH, C.W.; HEWITT, G.M. Male spermatophore investiment increase female fecundity in a grasshopper. **Evolution**, Lanham, v. 41, p. 221-225, 1987.

CHAPMAN, R.F. **The insects:** structure and function. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 749p.

CHEN, P.S. The functitional morphology and biochemistry of insect male accessory glands and their secretions. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 29, p. 233-255, 1984.

CLARK, A.G.; AGUADE, M. PROUT; T., HARSHAMAN, L.G.; LANGELY, C.G. Variation in sperm displacement and its association with accessory gland protein loci in *Drosophila melanogaster.* **Genetics**, Austin, v. 139, p. 189-201, 1995.

DALY, M. The cost of mating. **American Naturalist**, Chicago, v. 112, p. 771-774, 1978.

DAVEY, K.G. Hormonal controls of reproduction in female Heteroptera. **Archives of insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 35, p. 443-453, 1997.

DOSSI, F. C.A. **Ultraestrutura do aparelho reprodutor feminino e mecanismos de transmissão transovariana de endossimbiontes de *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Psyllidae)**. 2008. 91p. Dissertação (Mestre em Ciências)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2008.

DOUGLAS, A.E. Reproductive failure and the free amino acid pools in pea aphids (*Acyrthosiphon pisum*) lacking symbiotic bacteria. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 42, p. 247-255, 1996.

FUKATSU, T.; HOSOKAWA, T. Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stink-bug, *Megacopta punctatissima.* **Applied and Environmental. Microbiology**, Washington, v. 68, p. 389-396, 2002.

GILLOT, C. **Entomology.** 3 rd ed. Berlin: Springer, 2005. 835p.

GUTZEIT, H.O.; ZISSLER, D.; PERONDINI, A.L.P. Intracellular translocation of symbiotic bacteroids during the late oogenesis and early embryogenesis of *Bradysia tritici* (syn. *Sciara ocellaris*) (Diptera: Sciaridae). **Differentiaton**, London, v. 29, p. 223-229, 1985.

GWYNNE, D.T. Sexual selection and sexual differences in Mormon crickets (Orthoptera: Tettigoniidae, *Anabrus simplex*). **Evolution**, Lanham, v. 38, p. 1011-1022, 1984.

HARSHAMAN, L.G.; PROUT, T. 1994. Sperm displacement without sperm transfer in *Drosophila melanogaster*. **Evolution**, Lanham, v. 48, p. 758-766, 1994.

HELVERSEN, D.V.; HELVERSEN, O.V. Pre-mating sperm removal in the bush cricket *Metaplastes ornatus* Ramme 1931 (Orthoptera, Tettigonidae, Phaneropteridae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, Berlin, v. 28, p. 391-396, 1991.

HINTON, H.E. Accessory function of seminal fluid. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 11, p. 19-25, 1974.

HOLLANDE, M.D.; GWYNNE, D.T. Female fitness consequences of male harassment and copulation in seed beetles, *Callosobruchus maculates*. **Animal Behaviour**, London, v.78, p. 1061-1070, 2009.

HOSOKAWA, T.; KIKUCHI, Y.; SHIMADA, M.; FUKATSU, T. Symbiont acquisition alters behavior of stinkbug nymphs. **Biology Letters**, London, v. 4, p. 45-48, 2008.

HUMMEL, N.A.; ZALOM, F.G.; PENG, C.Y.S. Anatomy and Histology of Reproductive organs of Female *Homalodisca coagulata* (Hemiptera: Cicadellidae: Proconiini), with Special Emphasis on Categorization of Vitellogenic Oocytes. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 99, n.5, 2006.

HURST, G.D.D.; SHARPE, R.G.; BROOMFIELD, A.H.; WALKER, L.E.; MAJERUS, T.M.O.; ZAKHAROV, I.A.; MAJERUS, M.E.N. 1995. Sexuallly transmitted disease in a promiscuous insect, *Adalia bipunctata*. **Ecological Entomology**, London, v. 20, p. 230-236, 1995.

JAENIKE, J. Parasitism and male mating success in *Drosophila testacea.* **American Naturalist**, Chicago, v. 131, p. 774-780, 1988.

JENNIONS, M.D.; PETRIE, M. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 75, p. 21-64, 2000.

JERVIS, M.; FERNS, P. The timing of eggs maturation in insects: ovigeny index and initial egg load as measures of fitness and of resource allocation. **Oikos**, Copenhagen, v. 107, p. 449-460, 2004.

KARLSSON, B. Feeding habits and change of body composition with age in three nymphalid butterfly species. **Oikos**, Copenhagen, v. 69, p. 224-230, 1994.

KASHIMA, T.; NAKAMURA, T.; TOJO, F. Uric acid recycling in the shield bug, *Parastrachia japonensis* (Hemiptera: Parastrachiidae), during diapause. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 52, p. 816–825, 2006.

KASULE, F.K. Repetitive mating and female fitness in *Dysdercus cardinalis* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). **Zoological Journal of the Linnean Society,** London, v. 88, p. 191-199, 1986.

KING, R.C.; BUNING, J. The origin and functioning of insect oocytes and nurse cells. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology:** embryogenesis and reproduction. Oxford: Pergamon Press, 1985. v.1, p. 37-82.

KIKUCHI, Y.; MENG X.Y.; FUKATSU, T. Gut symbiotic bacteria of the genus *Burkholderia* in the broad-headed bugs *Riptortus clavatus* and *Leptocorisa chinensis* (Heteroptera: Alydidae). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 4035–4043, 2005.

KIKUCHI, Y.; HOSOKAWA, T.; FUKATSU, T. Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires beneficial gut symbiont from environment every generation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p. 4308-4316, 2007.

KIKUCHI, Y.; HOSOKAWA, T.; NIKOH, N.; MENG, X.Y.; KAMAGATA, Y.; FUKATSU, T. Host-symbiont co-speciation and reductive genome evolution in gut symbiotic bacteria of acanthosomatid stinkbugs. **BMC Biology**, v. 7, n.2, p.1-22, 2009.

KIRITANI, K. The effect of colony size upon the survival of larvae of the southern green stink bug, *Nezara viridula.* **Japanese Journal of Applied Entomology**, Tokyo, v. 8, p. 45-53, 1964.

KLOWDEN, M.J. The check is in the male: male mosquitoes affect female physiology and behavior. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno, v. 15, p. 213-220, 1999.

KON, M.; OE, A.; NUMATA, H. Intra–and interspecific copulation in the two congeneric green stink bug, *Nezara antennata* and *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae), with reference to postcopulatory changes in the spermatheca. **Ethology**, Berlin, v. 11, p. 83-89, 1993.

KOSHIYAMA, Y.; TSUMUKI, H.; FUJISAKI, K.; NAKASUJI, F. Nutritional Contribution to Females of ^{14}C-labeled Male Secretions Transferred during Mating in *Menida scotti* (Heteroptera: Pentatomidae). **Population Ecology**, Tokyo, v. 38, n. 1, p. 51-56, 1996.

LOCKWOOD, J.A.; STORY, R.N. Adaptive functions of nymphal aggregation in the southern grren stink bug, *Nezara viridula* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae). **Environmental Entomology**, College Park, v.15, p. 739-749, 1986.

MCLAIN, D.K. Female choice and the adaptative significance of prolonged copulation in *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). **Pyche**, cidade, v. 87, p. 325-326, 1980.

MCLAIN, D.K. Male size, sperm competition, and the intensity of sexual selection in the southern green stink bug, *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 78, p. 86-89, 1985.

MCLAIN, D.K. Non-genetic benefits of mate choice: fecundity enhancement and sex sons. **Animal Behaviour**, London, v. 55, p. 1191-1201, 1998.

MCLAIN, D.K.; LANIER, D.L.; MARSH, N.B. Effects of female size, mate size, and number of copulations on fecundity, fertility, and longevity of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). **Heredity**, London, v. 64, p. 161-167, 1990.

MCKEAN, K.A; NUNNEY, L. Increased sexual activity reduces male immune function in *Drosophila melanogaster.***Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, n. 14, p 7904-7909, 2001.

MORAN, N.A., BAUMANN, P. Bacterila endosymbionts in animals. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 3, p. 270-275, 2000.

MORAN, N.A. 2003. Tracing the evolution of gene loss in obligate bacterial symbionts. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 6, n. 5, p. 512-516, 2003.

MORAN, N.A.; DUNBAR, H.E.. Sexual acquisition of beneficial symbionts in aphids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, n. 34, p. 12803-12806, 2006.

MÜHLHAÜSER, C.; BLANCKENHORN, W.U. The costs of avoiding matings in the dung fly *Sepsis cynipsea.* **Behavioral Ecology**, Carry, v.13, n. 3, p. 359–365, 2002.

NIJHOUT, H.F. **Insect Hormones**. Princeton University Press, Princeton, 1994.

OBERHAUSER, K.S. Fecundity, lifespan and egg mass in butterflies: effects of male-derived and female size. **Functional Ecology**, Oxford, v. 11, p. 166-175, 1997.

OMKAR, M. G. Mating in aphidophagous ladybirds: costs and benefits. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 129, n. 8, p. 432-436, 2005.

PAPAJ, D.R. Ovarian Dynamics and Host Use. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 45, p. 423-448, 2000.

PRADO, S.S.; RUBINOFF, D.; ALMEIDA, R.P.P. Vertical transmission of a Pentatomid caeca-associated symbiont. **Annals of Entomological Society of America,** College Park, v. 99, n. 3, p. 577-585, 2006.

PRADO, S.S.; ALMEIDA, R.P.P. Role of symbiotic gut bactéria in the development of *Acrosternum hilare* and *Murgantia histrionica.* **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 132, p.21-29, 2009.

PRADO, S.S.; GOLDEN, M.; FOLLETT, P.A.; DAUGHERTY, M.P; ALMEIDA, R.P.P. Demography of Gut Symbiotic and Aposymbiotic *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 38, p. 103-109, 2009.

RAMALINGAM S.; CRAIG JR, G.B. Fine structure of the male accessory glands in *Aedes triseriatus.* **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 24, p. 251-259, 1978.

RIDLEY, M. Mating frequency and fecundity in insects. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 63, p. 509-549, 1988.

RIVERO, A.; GIRON, D.; CASAS, J. Lifetime allocation of juvenile and adult nutritional resources to egg production in a holometabolous insect. **Proceedings of the Royal Society of London**. Série B, London, v. 268, p. 1231-1237, 2001.

ROLFF, J.;SIVA-JOTHY, M.T. Copulation corrupts immunity: A mechanism for a cost of mating in insects. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, v.99, n.15, p. 9916-9918, 2002.

RÖNN, J.; KATVALA, M.; ARNQVIST, G. The costs of mating and egg production in C*allosobruchus* seed beetles. **Animal Behaviour**, London, v. 72, p. 335-342, 2006.

ROONEY, J. LEWIS, S.M. Differential allocation of male-derived nutrients in two lampyrid beetles with contrasting life-history characteristics. **Behavioral Ecology**, Cary, v. 10, n. 1, p. 97-104, 1999.

ROWE, L. Convenience polyandry in a water stride: foraging conflicts and female control of copulation frequency and guarding duration. **Animal Behaviour**, London, v. 44, p. 189-202, 1992.

RUTOWSKI, R.L. Mating strategies in butterflies. **Scientific American**, New York, v. 279, p. 46-51, 1998.

SACCHI, L.; GRIGOLO, A.; LAUDANI, U.; RICEVUTI, G.; DAELESSI, F. Behavior of symbionts during oogenesis and early stages of development in the german cochroach, *Blattella germanica* (Blattodea). **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 4, p. 139-152, 1985.

SACCHI,L. NALEPA, C.A.; LENZ, M.; BANDI, C.; CORONA, S.; GRIGOLO, A.; BIGLIARDI, E. Transovarial transmisión of symbiotic bacteria in *Mastotermes darwiniensis* (Isoptera: Masttotermitidae): Ultrastructural aspects and phylogenetic implications. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 93, n. 6, p. 1308-1313, 2000.

SAKURAI, G; KASUYA, E. The cost of harassment in the adzuki bean beetle. **Animal Behaviour**, London, v. 75, p. 1367-1373, 2008.

SANTOS, D.C.; GREGÓRIO, E.A. Deposition of the eggshell layers in the Sugar Cane Borer (Lepidoptera: Pyralidae): ultrastructural aspects. **Acta Microscopica**, Caracas, v. 12, n.1, p. 37-41, 2003.

SHINE, R., O'CONNER, D., MASON, R. T. Sexual conflict in the snake den. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 48, p. 392-401, 2000.

SIMICZYJEW, B. Germ cell cluster differentiation in polytrofic ovarioles of hanging-flies (Mecoptera: bittacidae). **Zoologica Poloniae**, Lemberg, v. 48, p.71-79, 2003.

TAMAS, I.; KLASSON, L.; CANBÄCK, B.; NÄSLUND, A.K.; ERIKSSON, A.S.; WERNEGREEN, J.J.; SANDSTRÖM, J.P.; MORAN, N.A.; ANDERSSON, S.G.E. 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. **Science**, Washington, v.296, n. 5577, p. 2376-2379, 2002.

TORRES, J.B.; ZANUNCIO, J.C. Effects of sequencial mating by males on reproductive output of the stinkbug predator, *Podisus nigrispinus.* **Biological Control**, Orlando, v. 46, p. 469-480, 2001.

VANDEKERKHOVE, B.; VAN BAAL, E.; BOLCKMANS, K.; DE CLERCQ, P. Effect of diet and mating on development and oviposition n the polyphagous predator *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae). **Biological Control**, Orlando, v. 39, p. 532-538, 2006

VOIGT, C.C.; LEHMANN, G.U.C.; MICHENER, R.H.; JOACHIMSKI, M.M. Nuptial feeding is reflected in tissue nitrogen isotope ratios of female katydids. **Functional Ecology**, Oxford, v. 20, p. 656-661, 2006.

WANG, Q.; MILLAR, J.G. Reproductive behavior of *Thyanta pallidovirens* (Heteroptera: Pentatomidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 90, p. 380-388, 1997.

WATSON, P.J.; ARQNVIST, G.; STALLMAN, R.R. Sexual conflict and the energetic cost of mating and mate choice in water striders. **American Naturalist**, Chicago, v. 151, p. 46-58, 1998.

WHEELER, N. Mate quality affects reproductive effort in a paternally investing species. **American Naturalist**, Chicago, v. 148, p. 1075-1088, 1996.

WERREN JH. Biology of *Wolbachia*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 42, p. 587-609, 1997.

WERREN, J.H.; WINDSOR, D.M. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? **Proceedings of the Royal Society of London. Series B,** London, v. 267, p. 1277-1285, 2000.

WERNEGREEN, J.J. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. **Nature Reviews Genetic**, London, v. 3, p. 850-860, 2002.

WITTMEYER, J.L.; COUDRON,T.A. Life table parameters, reproductive rate, intrinsic rate of increase and realized costs of rearing *Podisus maculiventris* (Say) (Heteroptera: Pentatomidae) on an artificial diet. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 94, p. 532-538, 2001.

WOLFNER, M. The gifts that keep on giving: physiological functions and evolutionary dynamics of male seminal proteins in Drosophila. **Heredity**, London, v. 88, p. 85-93, 2002.

YAMAGI, S.; MIYATAKE. Costs of mating and egg production in female *Callosobruchus chinensis*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 14, p. 115-126, 2003.
ZCHORI-FEIN, E; GOTTLIEB, Y.; KELLY, S.E; BROWN, J.K.; WILSON, J.M.; KARR, T.L.; HUNTER, M.S. A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, p. 12555–12560, 2001.

ZCHORI-FEIN E, PERLMAN, S.J. Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 2009–2016, 2004.

ZELAZOWSKA, M.; BILINSKI, S.M. Distribution and transmission of endosymbiotic microorganisms in the oocytes of the pig louse, *Haematopinus suis* (L.).(Insecta: Phthraptera). **Protoplasma**, Leipzig, v. 209, p.207-213, 1999.

ZUK, M. Parasite load, body size, and age of wild-caught male field crickets (Orthoptera: Gryllidae): effects on sexual selection. **Evolution**, Lanham, v. 42, p. 969-976, 1988.

3 DESENVOLVIMENTO E MATURAÇÃO DO OVÁRIO DE *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

Resumo

O desenvolvimento e a maturação do ovário de fêmeas de *Nezara viridula* (L., 1758) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) foram avaliados observando-se alterações na composição bioquímica da hemolinfa, dada pela síntese de proteínas relacionadas à reprodução, e na morfologia do ovário deste percevejo. Para tanto, foram feitas análises quantitativas e qualitativas de proteínas e observações das alterações estruturais do ovário desse percevejo ao longo dos períodos pré-reprodutivo e reprodutivo. A concentração de proteínas totais na hemolinfa de fêmeas aumentou gradativamente até o término do período de pré-cópula, mantendo-se inalterada após o mesmo. As vitelogeninas, proteínas ligadas à reprodução, surgiram na hemolinfa apenas após o décimo dia de vida, o qual marca o término do período de pré-cópula desse inseto. A concentração de proteínas totais na hemolinfa após a cópula foi sempre inferior em fêmeas acasaladas em relação às virgens, apesar dos níveis de vitelogeninas da hemolinfa terem se mantido semelhantes ao longo do período de observação. No entanto, a concentração das vitelogeninas na hemolinfa de fêmeas virgens foi decrescente após o décimo sétimo dia de vida em relação às fêmeas acasaladas. O desenvolvimento e a maturação de oócitos ocorreram de forma gradativa em função da idade. Fêmeas com 10 dias de idade apresentaram oócitos corionados, prontos para serem fertilizados. A cópula não estimulou o desenvolvimento de oócitos em *N. viridula*, mas a sua ausência parece ter estimulado a reabsorção de oócitos após o décimo sétimo dia de vida.

Palavras-chave: Vitelogênese; Reprodução; Oócitos; Ovário

DEVELOPMENT AND MATURATION OF THE OVARY OF *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

Abstract

The development and maturation of the ovary of female stinkbugs of *Nezara viridula* (L., 1758) (Hemiptera: Pentatomidae) were evaluated by assessing the ovary morphology and alterations in the biochemical composition of the hemolymph regarding protein synthesis related to reproduction. Quantitative and qualitative protein analyses and morphological changes in the ovary were observed during the pre-reproductive and reproductive stages. The total concentration of proteins in female hemolymph gradually increased up to the end of the pre-mating stage, remaining unaltered thereafter. The vitellogenins, proteins linked to reproduction, only appeared in the hemolymph 10 days after adult emergence and signal the end of the pre-mating stage of *N. viridula*. Total protein concentration in the hemolymph after mating was always lower in mated females compared to virgins even though vitellogenin levels in the hemolymph were similar throughout the observation period. However, vitellogenin concentration in the hemolymph of virgin females decreased after the seventeenth day after emergence compared mated females.

Oocyte development and maturation were gradual and age dependent. Ten-day-old females had chorionated oocytes which were ready for fertilization. Mating did not stimulate oocyte development in female *N. viridula,* but its absence appear to have stimulated oocyte resorption in 17-day-old females.

Keywords: Vitellogenesi; Reproduction; Oocytes; Ovary

3.1 Introdução

Em insetos, a vitelogênese é basicamente um processo heterossintético, ocorrendo primordialmente no tecido adiposo, que sintetiza o principal componente do vitelo, as proteínas denominadas de vitelogeninas. Os produtos sintetizados pelo tecido adiposo exigem a especialização de oócitos para a absorção necessária das proteínas extra-ovarianas produzidas e liberadas na hemolinfa pelo tecido adiposo. A absorção de nutrientes pelos oócitos é dada por processos de endocitose mediados por receptores específicos. Assim, o processo de vitelogênese pode ser divido nas fases de síntese e de absorção, ambas sob regulação hormonal (RAIKHEL; DHADIALLA, 1992; RAIKHEL; BROWN; BELLES, 2005; SWEVER et al., 2005; ZIEGLER; VAN ANTWERPEN, 2006).

As vitelogeninas fazem parte de um grupo de proteínas que são sintetizadas fora do ovário e originam as principais proteínas presentes no ovo, as vitelinas (HAGEDORN; KUNKEL, 1979; SWEVER et al. 2005). As vitelinas de insetos desempenham importante papel nutritivo durante a embriogênese, atuando como fonte de aminoácidos, lipídeos e carboidratos para o embrião em desenvolvimento (MASUDA; OLIVEIRA, 1985).

O processo de vitelogênese é regulado por hormônios, como o hormônio juvenil (ENGELMANN; 1979; WYATT, 1988), os ecdisteróides (HAGEDORN; KUNKEL, 1979) HAGEDORN, 1985) e os hormônios neurossecretores (RAABE, 1986). Os ecdisteróides e o hormônio juvenil também são os principais hormônios relacionados com o desenvolvimento de insetos (RIDDIFORD et al., 2003). Em Heteroptera, a vitelogênese é primariamente regulada pelo hormônio juvenil, sendo discreta a ação dos ecdisteróides (DITTMANN; BICZKOWSKI, 1995; DAVEY, 1997). O hormônio juvenil regula a síntese de vitelogenina pelo tecido adiposo, assim como a absorção de vitelogeninas disponíveis na hemolinfa pelo oócito em desenvolvimento (MARTINEZ; GARCERA, 1987; HIRAI, et al., 1998).

No entanto, o processo de desenvolvimento ovariano de insetos está relacionado com a estratégia de reprodução dos mesmos. Insetos apresentam diferentes estratégias reprodutivas dependendo das decisões de alocação e utilização de nutrientes adquiridos nas fases pré-imaginal e imaginal (ALCOCK; GWYNNE, 1991; HUFFAKER; GUTIERREZ, 1999; JERVIS; BOGGS; FERNS, 2005). Assim, insetos podem decidir por investir os recursos nutricionais adquiridos na fase imatura para o desenvolvimento do soma e de reserva nutritivas, exigindo a aquisição de nutrientes na fase adulta para a sustentação das atividades reprodutivas. Estes insetos são classificados como sinovigênicos. O desenvolvimento de ovos após a emergência de fêmeas pode ser decorrente da utilização de reservas nutritivas adquiridas na fase imatura, as quais se encontram armazenadas no tecido adiposo, mas principalmente de nutrientes adquiridos via alimentação. Portanto, a qualidade e quantidade de nutrientes adquiridos pela alimentação na fase adulta são de extrema importância para o desenvolvimento e maturação de oócitos (KARLSSON, 1994; BOGGS, 1997; OBERHAUSER, 1997). Neste contexto, insetos da ordem Heteroptera necessitam adquirir nutrientes na fase adulta, via alimentação, para o desenvolvimento de ovários e produção de oócitos (ADAMS, 1997; DAVEY, 1997). Outra fonte comum de nutrientes utilizada por fêmeas sinovigênicas é o fluido seminal produzido por machos (WHEELER, 1996; POIANI, 2006). Entretanto, há espécies que priorizam a rápida reprodução, utilizando nutrientes da fase imatura para o desenvolvimento de seu aparelho reprodutor, dando origem a adultos aptos a se reproduzir logo após a emergência, sendo os mesmos classificados como pró-ovigênicos (JERVIS; FERNS, 2004).

Estudos relacionados ao desenvolvimento e maturação do aparelho reprodutor de fêmeas de *Nezara viridula* (L., 1758) (Hemiptera: Pentatomidae) são escassos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de maturação reprodutiva de fêmeas desse percevejo, observando alterações morfológicas no ovário e na composição bioquímica da hemolinfa devido à atividade de síntese de proteínas relacionadas à reprodução, ao longo do período de maturação dos ovários e de reprodução.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Coleta e manutenção de colônia estoque de *Nezara viridula*

Para o estabelecimento da colônia estoque de *N. viridula* em laboratório, foi realizada coleta de percevejos em campo de soja na Fazenda Experimental da DuPont (Paulínia). Os insetos coletados a campo foram trazidos ao laboratório e mantidos em condições controladas (25±1°C; 60±10% UR e fotofase de 14 horas), segundo CORRÊA-FERREIRA (1985). Os adultos de *N. viridula* foram acondicionados em gaiolas (50 x 50 x 70 cm) recobertas com tela anti-afídeo. Os percevejos foram alimentados com sementes de amendoim coladas em tiras de papel do tipo sulfite (15 x 3 cm) e frutos de ligustro, *Ligustrum lucidum*, como suplemento alimentar (CORRÊA-FERREIRA, 1993). Água foi oferecida em algodão hidrófilo embebido no interior de placas plásticas. As posturas foram recolhidas diariamente e acondicionadas em câmaras climatizadas até a eclosão das ninfas, as quais foram criadas em placas gerbox (11 x 11 x 3 cm) até o início do 4º ínstar, quando foram transferidas para gaiolas de criação. A alimentação das ninfas foi idêntica aquela dos adultos.

3.2.2 Desenvolvimento morfológico do ovário de *Nezara viridula*

Ovários de *N. viridula* foram extraídos durante os períodos de pré e pós-cópula. Fêmeas de *N. viridula* apresentam período pré-copulatório que pode variar de 7 a 13 dias (MITCHELL; MAU, 1969; SINGH, 1972; COSTA, 1991). Assim, fêmeas recém-emergidas foram individualizadas e separadas em dois grupos. Um grupo foi submetido à cópula aos 10 dias de idade, enquanto o outro grupo permaneceu virgem durante todo o experimento. Fêmeas foram dissecadas em solução anti-coagulante (98 mM NaOH; 150 mM NaCl; 1,7 mM EDTA; 46 mM ácido cítrico; pH 4,5) (MASASHI HOTTA; OKUDA, 2001) e os ovários retirados após 1, 5, 10, 12, 15, 17, 20 e 23 dias da emergência, representando os períodos pré- (1, 5 e 10 dias) e pós-copulatório -(12, 15, 17, 20 e 23 dias). No caso de fêmeas acasaladas, os períodos amostrais da pós-cópula coincidiram com os períodos após a primeira cópula (12 d) e primeira postura (15 d),

entre a primeira e segunda postura (17d), após a segunda postura (20 d), e entre a segunda e terceira postura (23 d).

A morfologia geral dos ovários e o desenvolvimento dos oócitos nas diferentes partes dos ovaríolos foram observados. Cada período amostral contou com a avaliação de 10 ovários (1 fêmea = 1 ovário = 1 repetição), sendo o estágio de maturação dos oócitos de cada ovaríolo de um mesmo ovário determinado pela utilização de uma escala de notas. As notas atribuídas foram: 0 - sem a presença de oócito; 1 - presença de oócito na região do germário; 5 - presença de oócito não-corionado na região do vitelário; 10 - presença de oócito corionado (ADAMS, 2000). O número total de oócitos, assim como o número de oócitos vitelogênicos e corionados, contidos em cada ovário, foi avaliado.

O experimento constou de 2 tratamentos (fêmeas virgens e copuladas), sendo que cada tratamento foi constituído por 10 repetições. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade.

3.2.3 Alterações na composição bioquímica da hemolinfa de *Nezara viridula*

Amostras de hemolinfa de fêmeas foram coletadas nos períodos de pré e pós-cópula. Fêmeas recém-emergidas foram individualizadas e amostras nos mesmos períodos descritos no item 3.2.2 para a coleta de hemolinfa.

3.2.3.1 Coleta da hemolinfa

A hemolinfa foi coletada por pequena lesão induzida no tegumento da fêmea, junto à base do aparelho bucal. A hemolinfa amostrada foi imediatamente misturada à solução tampão anti-coagulante mantida em gelo, centrifugadas (2.000*g* x 2 min) para a remoção de hemócitos, o sobrenadante foi recuperado e armazenado a -20°C para análises quantitativa e qualitativa de proteínas (CÔNSOLI et al., 2005).

3.2.3.2 Avaliação quantitativa de proteínas da hemolinfa de fêmeas de *Nezara viridula*

A concentração total de proteínas da hemolinfa foi avaliada pelo teste colorimétrico de BRADFORD (1976), utilizando-se de uma formulação comercial do reagente Coomassie para aumentar a sensibilidade do ensaio (Coomassie Plus Protein, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL). As amostras de hemolinfa coletada em tampão anti-coagulante foram misturadas ao reagente Coomassie Plus, seguindo as recomendações do fabricante. A concentração total de proteínas de cada amostra foi determinada comparando-se a absorbância observada a 595 nm para a amostra com aquela obtida para curva-padrão, utilizando albumina como padrão.

O experimento constou de 2 tratamentos (fêmeas virgens e copuladas), sendo que cada tratamento foi constituído por 10 repetições. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade.

3.2.3.3 Avaliação qualitativa de proteínas da hemolinfa de fêmeas de *Nezara viridula*

A composição qualitativa da hemolinfa de *Nezara viridula* foi avaliada pela observação do padrão eletroforético determinado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida descontínuo em meio desnaturante (SDS-PAGE), utilizando o sistema de LAEMMLI (1970). Amostras coletadas em tampão TBS (20 mM Tris; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; pH 7,5) foram misturadas na proporção de 1:1 com 2x tampão SDS da amostra (0,25g SDS; 1,26ml 0,5M Tris-Cl, pH 6,8; 0,84 ml 75% glicerol; 0,5 ml β-mercaptoetanol; 0,40ml 0,005% azul de bromofenol; 2 ml água Milli-Q; 2% NaCl), e diluídas para uma concentração final de 30 µg/20 µl com tampão SDS 1x. Posteriormente, as amostras foram aquecidas em bloco seco (100ºC x 5 min), brevemente centrifugadas, carregadas em gel de poliacrilamida a 7,5% (30 µg de proteínas/amostra) e as proteínas separadas em voltagem constante (200V) (Protean II, Bio-Rad, Hercules, CA), até que o marcador de fronte atingisse 1,0 cm da base do gel (CÔNSOLI et al., 2001). As bandas protéicas foram reveladas após coloração com azul de Coomassie R-250 (GelCode, Pierce Company) por 1,5 h e remoção do excesso de corante pela imersão do gel em água por 12-16 h, sob agitação constante. As duas vitelogeninas liberadas na hemolinfa de fêmeas desse percevejo foram identificadas segundo CÔNSOLI et al. (2001) e suas abundâncias determinadas utilizando-se do sistema de captura e análise de imagens GelQuant versão 2.7 (Bio-Imaging Systems).

A disponibilização das proteínas relacionadas à reprodução na hemolinfa ao longo do processo de maturação e reprodução desse inseto foi comparada com os dados morfológicos obtidos para se verificar a relação entre a liberação de vitelogeninas e o processo de maturação do ovário.

O experimento constou de 2 tratamentos (fêmeas virgens e copulas), sendo que cada tratamento foi constituído por 10 repetições. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os dados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade.

3.3 Resultados

3.3.1 Desenvolvimento morfológico do ovário de *Nezara viridula*

As observações do ovário de *N. viridula* indicaram a presença de um par de ovários, sendo cada ovário constituído por sete ovaríolos. Cada ovaríolo contém um filamento apical, a região trófica, o vitelário e o pedicelo. O filamento apical se estende à superfície média do músculo tergo-esternal do mesotórax, onde o mesmo se fixa. Observou-se uma sincronia no desenvolvimento dos oócitos nos ovaríolos das fêmeas com os sucessivos estágios de desenvolvimento. Oócitos mais desenvolvidos estão presentes na região proximal dos ovaríolos e mais distantes da região do germário (Figura 1). O ovário de *N. viridula* é do tipo meroístico teletrófico, com células nutridoras localizadas no ápice de cada ovaríolo, na região do germário, contendo longos filamentos (cordão trófico) que as conectam aos oócitos em desenvolvimento. No germário, também denominado região trófica estão presentes as células nutrizes, câmara trófica e os oócitos em estágio inicial de desenvolvimento (Figura 1).

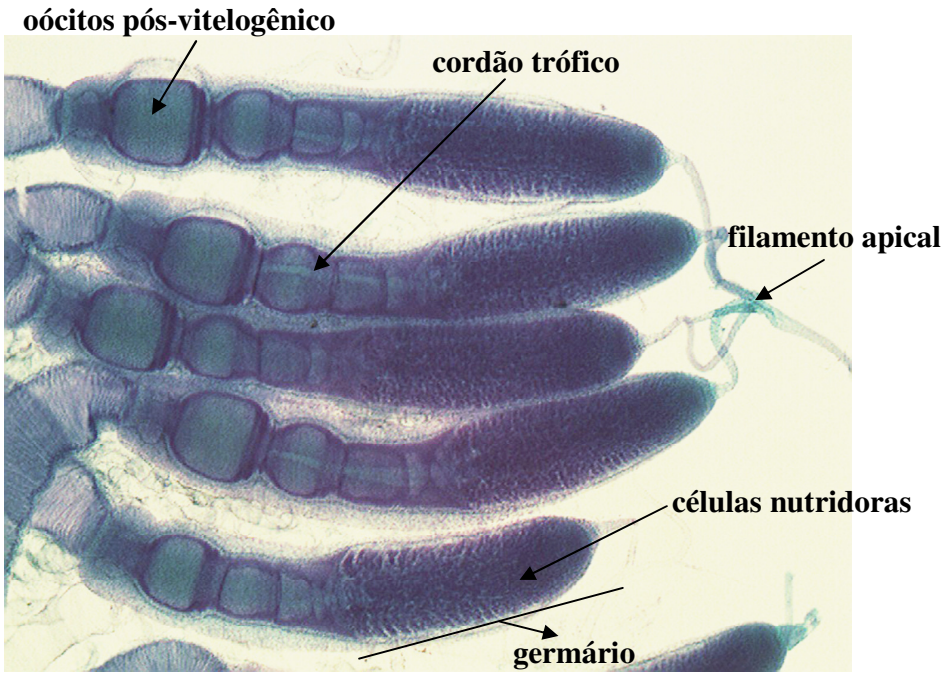

Figura 1 - Ovaríolos de *Nezara viridula* em estágio pós-vitelogênico

Fêmeas de *N. viridula* são sinovigênicas, visto que as mesmas emergem sem qualquer oócito desenvolvido (Figuras 2, 3). Os ovaríolos de fêmeas recém-emergidas não apresentavam nenhum oócito na região do germário. Após cinco dias de desenvolvimento imaginal, já era possível a observação de oócitos em desenvolvimento na região do germário e na parte superior da região do vitelário. Durante o período de pré-cópula (até 10 dias de idade) ocorreu um amadurecimento gradual dos oócitos, que passaram pelo processo de absorção e acúmulo de vitelogeninas e pelo processo de deposição do córion à medida que percorriam o ovaríolo em direção ao oviduto lateral, estando prontos para a fertilização. Os oócitos ocupavam toda a região do vitelário (Figura 2). Também foi observado que as fêmeas ovipositaram todos os oócitos corionados em uma mesma postura. Após a postura, os ovaríolos apresentavam somente oócitos não-corionados em estágio de vitelogênese na região superior do vitelário. No período entre as posturas, foram observados oócitos vitelogênicos e coriogênicos (Figuras 2 e 3).

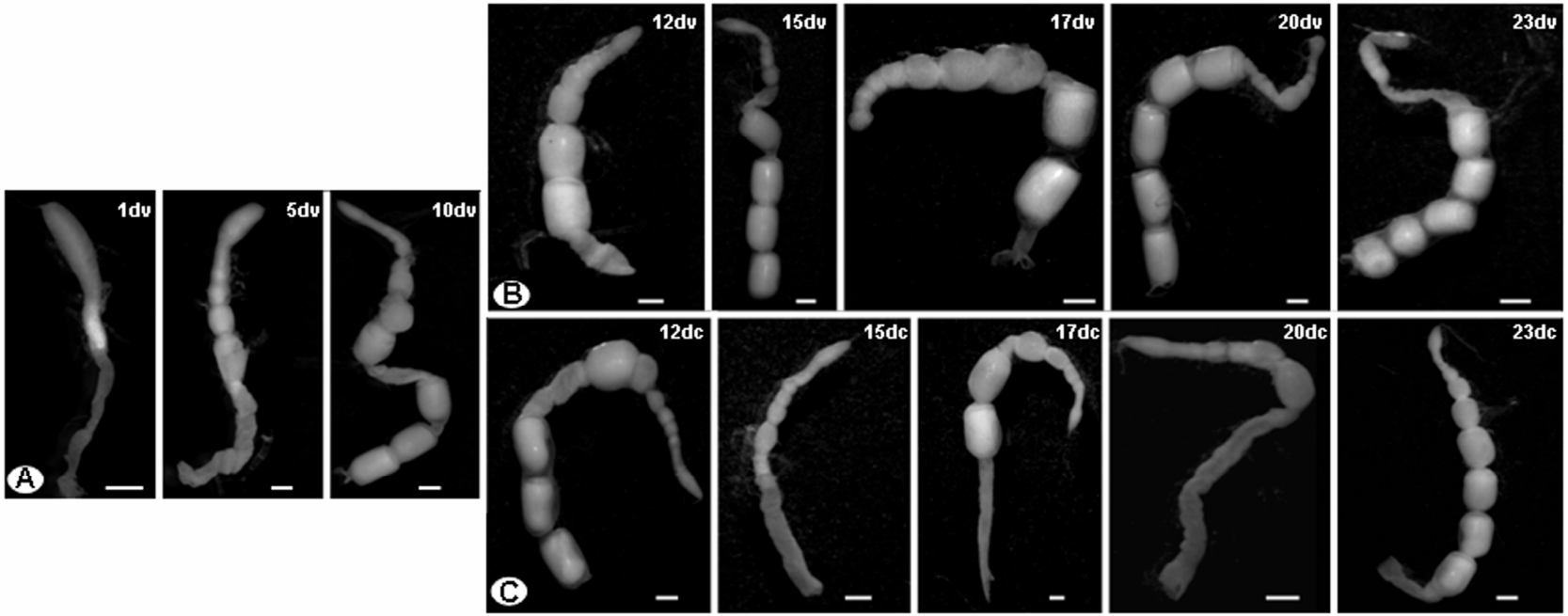

Figura 2 - Ovaríolos de fêmeas de *Nezara. viridula* em diferentes idades e estágios de maturação do ovário. A) Ovaríolos de fêmeas virgens no período de pré-cópula; B) Ovaríolos de fêmeas virgens; C) Ovaríolos de fêmeas copuladas (12dc - após a cópula; 15dc - após a primeira postura; 17dc - entre a primeira e segunda postura; 20dc -após a segunda postura; 23dc - entre a segunda e terceira postura) (d= dias; c = copulada; v = virgem). Barra=500µm

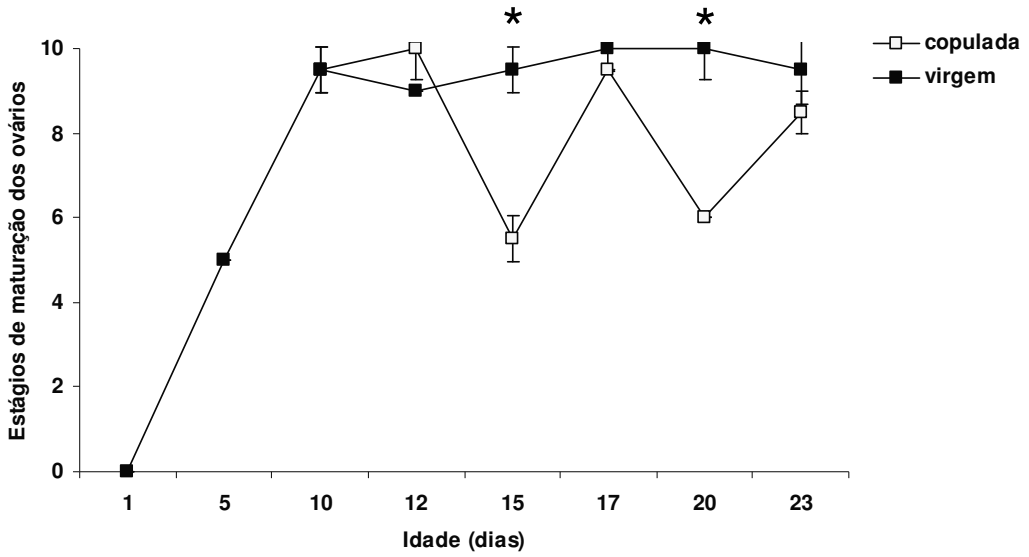

Figura 3 - Estágio de maturação dos ovários de fêmeas virgens e copuladas de *Nezaraviridula* de acordo com o estágio de desenvolvimento de oócitos em seus ovaríolos, seguindo a escala de notas: 0 - ausência de oócito; 1 - oócito presente na região do germário; 5 - oócito não-corionado presente na região do vitelário; 10 - oócito corionado presente (Fêmeas copuladas: 12d -após a cópula; 15d - após a primeira postura; 17d - entre a primeira e segunda postura; 20d - após a segunda postura; 23d - entre a segunda e terceira postura). ("*" indica diferença entre os tratamentos pelo t, $P \leq 0,05$)

O número total de oócitos (não-corionados e corionados) variou em função da idade e experiência sexual das fêmeas de *N. viridula.* Para fêmeas virgens, o número total de oócitos aumentou gradativamente até atingirem 12 dias, tendo uma queda aos 15 dias, para atingir seu valor máximo aos 17 dias de idade, com redução gradual após este período (Figura 4). O número total de oócitos foi superior para as fêmeas virgens a partir do décimo quinto dia de vida. Entretanto, aos 23 dias de idade, o número total de oócitos foi inferior em relação às copuladas que estavam no período entre posturas (Figura 4)

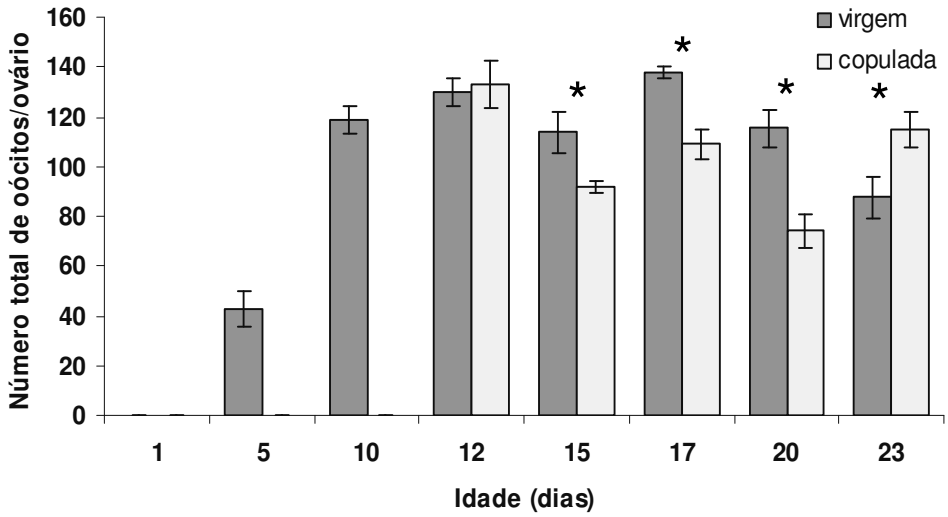

Figura 4 - Número total de oócitos (não-corionados e corionados) em ovários de fêmeas virgens e copuladas de *N. viridula* em diferentes idades (Fêmeas copuladas: 12d - após a cópula; 15d - após a primeira postura; 17d - entre a primeira e segunda postura; 20d - após a segunda postura; 23d - entre a segunda e terceira postura). Barras marcadas com "*"indica a existência de diferença entre o número total de oócito para fêmea virgem e copulada com a mesma idade pelo teste t (P<0,05)

Após a emergência, as fêmeas investiram na produção de ovos, tendo aumento intenso no número de oócito não-corionados até o período que antecedeu a realização da primeira cópula (12 dias). Neste período, os oócitos se encontravam na fase de vitelogênese, com aumento considerável de tamanho. Após a primeira postura (15 dias) e no período entre a segunda e terceira postura (23 dias), o número total de oócitos não-corionados para fêmeas acasaladas foi significativamente superior em relação às virgens. Entretanto, no período entre a primeira e segunda postura (17 dias), as fêmeas copuladas apresentaram menor número de oócito não-corionado (Figura 5A).

No período correspondente ao de pré-cópula, as fêmeas virgens não apresentaram oócitos corionados. Estes oócitos só foram observados a partir do décimo dia de vida, sendo a disponibilidade dos mesmos reduzida em fêmeas virgens com 17 e 23 dias de idade, mesmo na ausência de qualquer postura (Figura 5B).

Nos ovaríolos de fêmeas após a realização de uma postura (15 e 20 dias de idade), foram encontrados somente oócitos não-corionados, havendo a completa deposição dos oócitos corionados presentes no ovário marcando o início de um novo ciclo de coriogênese (Figura 5B).

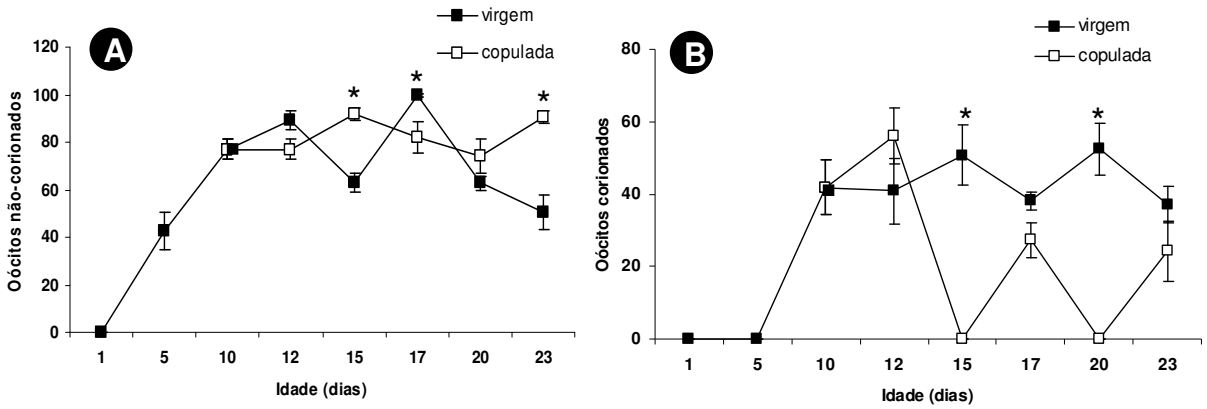

Figura 5 - Número de oócitos de fêmeas de *N.viridula* virgens e copuladas em diferentes estágios reprodutivos. A) Oóctios não-corionados; B) Oócitos corionados (Fêmeas copuladas: 12d – após a cópula; 15d - após a primeira postura; 17d - entre a primeira e segunda postura; 20d - após a segunda postura; 23d - entre a segunda e terceira postura). "*"indica a existência de diferença significativa entre fêmea virgem e copulada com a mesma idade pelo teste t (P<0,05).

3.3.2 Alterações na composição bioquímica da hemolinfa de *Nezara viridula*

3.3.2.1 Avaliação quantitativa de proteínas da hemolinfa de fêmeas de *Nezara viridula*

A análise quantitativa das proteínas totais disponíveis na hemolinfa de fêmeas de *N. viridula* apresentou variação na concentração de acordo com o desenvolvimento do ovário e a experiência sexual da fêmea. Fêmeas recém-emergidas apresentaram baixa concentração de proteínas na hemolinfa, sendo que a concentração das mesmas aumentou rapidamente até as fêmeas atingirem 10 dias de idade, marcados pelo amadurecimento gradual dos ovários. Após este período de desenvolvimento dos ovários, a concentração de proteínas se manteve constante em fêmeas virgens em função da idade (Figura 6). No entanto, para fêmeas acasaladas e reprodutivamente ativas, a concentração de proteínas totais na hemolinfa durante o período de pós-cópula foi sempre inferior quando comparada com as virgens de mesma idade (Figura 6).

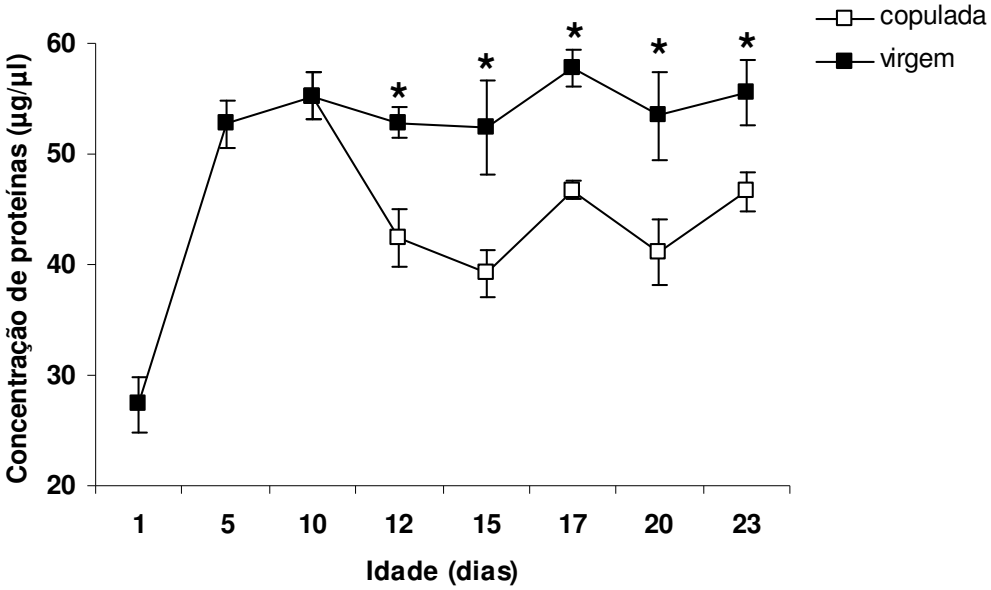

Figura - 6 Concentração de proteínas totais (µg/µl) disponíveis na hemolinfa de fêmeas virgens e copuladas de *Nezara viridula*. Fêmeas copuladas: 12 dias (após a cópula); 15 dias (após a primeira postura); 17 dias (período entre a primeira e segunda postura); 20 dias (após a segunda postura); 23 dias (entre a segunda e terceira postura). "*"indica a existência de diferença entre a concentração de proteínas em fêmea virgem e copulada com a mesma idade pelo teste t ($P<0,05$)

3.3.2.2 Avaliação qualitativa de proteínas da hemolinfa de fêmeas de *Nezara viridula*

A análise do padrão eletroforético das proteínas disponíveis na hemolinfa de fêmeas de *N. viridula* em diferentes idades e estágios reprodutivos permitiu verificar que as vitelogeninas produzidas por este inseto surgem apenas no décimo dia de vida, mantendo-se disponíveis na hemolinfa de fêmeas durante todo o processo reprodutivo (Figura 7). Também foi possível verificar que a disponibilidade de vitelogeninas em fêmeas acasaladas apresentou ligeiro aumento após a realização da primeira cópula (Figuras 7 e 8). Fêmeas acasaladas também apresentaram um ligeiro decréscimo na disponibilidade de vitelogeninas na hemolinfa entre 17 e 20 dias, com manutenção dos níveis destas proteínas após este período. Em fêmeas virgens, o decréscimo na disponibilidade das vitelogeninas foi crescente após 17 dias de idade, sendo os valores aos 23 dias de idade muito inferiores ao das fêmeas acasaladas (Figuras 7 e 8).

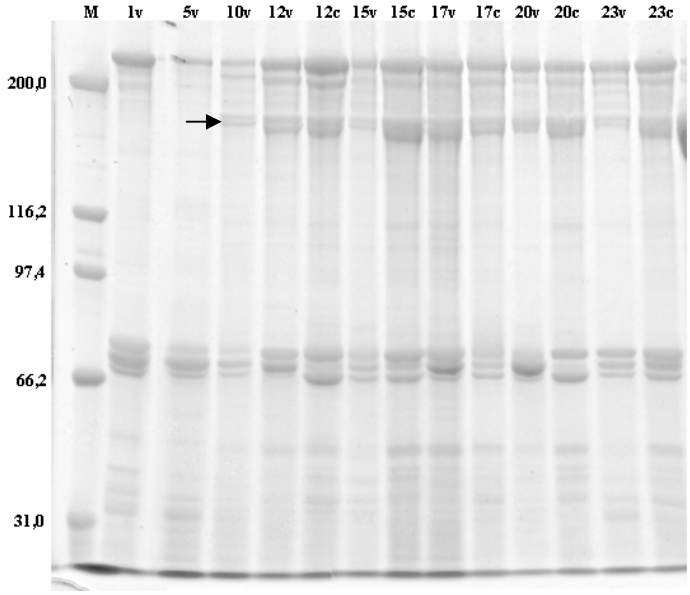

Figura -7 Padrão protéico da hemolinfa de fêmeas de *Nezara viridula* determinado em 7,5% SDS-PAGE . Marcador molecular (M) utilizado ("Broad-range, Bio-Rad Cat. 161-0317: 200,0 kDa - miosina; 116,2 kDa - ß-galactosidase; 97,4 kDa - fosforilase b; 66,2 kDa - soro abulmina; 31,0 kDa - anidrase carbônica). Hemolinfa extraída de fêmeas com 1, 5, 10, 12, 15, 17, 20 e 23 dias. v = fêmea virgem; c = fêmea copulada. Casais formados após o décimo dia de vida. Para fêmeas acasaladas, dia 12= após a cópula; dia 15 = após a primeira postura; dia 17 = entre a primeira e a segunda postura; dia 20 = após a segunda postura; 23 - entre a primeira e segunda postura

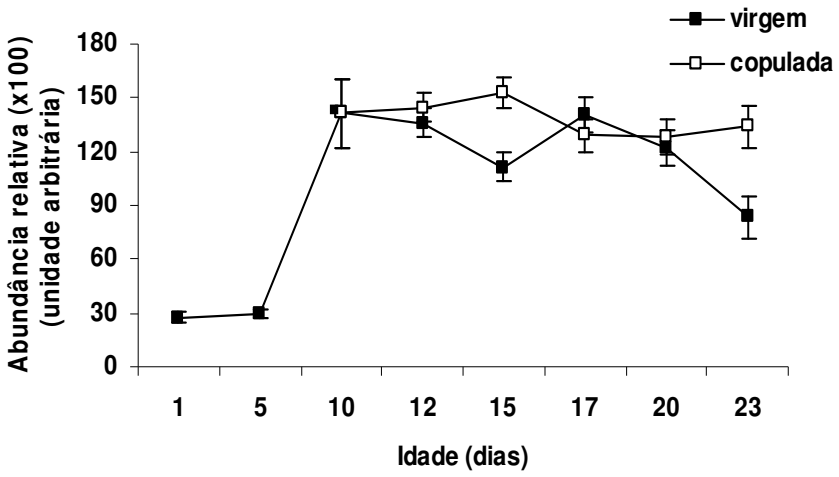

Figura 8 - Abundância das vitelogeninas de fêmeas virgens e copuladas de *Nezara viridula*, determinada a partir da análise do padrão protéico da hemolinfa em 7,5% SDS-PAGE. Fêmeas copuladas: 12 dias (após a cópula); 15 dias (após a primeira postura); 17 dias (período entre a primeira e segunda postura); 20 dias (após a segunda postura); 23 dias (entre a segunda e terceira postura). As médias da concentração de proteínas totais em fêmeas virgens e copuladas foram comparadas pelo teste t (P<0,05)

3.4 Discussão

A ausência de oócitos nos ovaríolos de fêmeas recém-emergidas de *N. viridula* e o surgimento dos primeiros oócitos em decorrência da disponibilidade de vitelogeninas na hemolinfa apenas no seu décimo dia de vida, indicam que os primeiros dias de vida do inseto são destinados à fase de pré-vitelogênese, quando os nutrientes que serão acumulados no oócito em desenvolvimento são produzidos (NIJHOUT, 1994; CHAPMAN, 1998; RAIKHEL; DHADIALLA, 1992).

A morfologia inicial do ovário de adultos recém-emergidos de *N. viridula*, assim como as alterações morfológicas observadas no mesmo, associadas às alterações bioquímicas na composição protéica de sua hemolinfa, caracteriza o seu ovário como sendo do tipo meroístico teletrófico, muito semelhante ao de outras espécies de Heteroptera (BÜNING, 1994; ADAMS, 2000; LEMOS et al., 2005; ESQUIVEL, 2009).

O número de ovaríolos em insetos pode ser bastante variável, indo de um, em Coleoptera, a milhares, em cupins (NIJHOUT, 1994; CHAPMAN, 1998). O número de ovaríolos observado

em *N. viridula* encontra-se no intervalo (8 a 14 ovaríolos) relatado para insetos pertencentes a Heteroptera (BÜNING 1994). A variação no número de ovaríolos é comum mesmo em uma mesma espécie, podendo ser sazonal ou influenciada pela sua própria estratégia de reprodução. A variação no número de ovaríolos pode ter implicações no desenvolvimento da progênie, visto que pode resultar na produção de ovos de diferentes tamanhos, ou na capacidade de reprodução da própria fêmea (PRICE, 1973; WELLINGS; LEATHER; DIXON, 1980; TSCHINKEL, 1987; STEWART; HEMPTINNE; DIXON, 1991), apesar de os nutrientes a serem utilizados na composição do vitelo do parasitóide *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) terem atuado como fator limitante no desenvolvimento de oócitos extras em fêmeas com maior número de ovaríolos (PETTERS; GROSCH, 1977).

Fêmeas virgens de *N. viridula* permaneceram boa parte do período de reprodução sem qualquer alteração no número total de oócitos, indicando ausência de reabsorção dos mesmos na ausência de estímulos para a deposição de ovos no início do período reprodutivo. No entanto, a redução no número total de oócitos de fêmeas virgens aos 23 dias de idade pode ter ocorrido devido à reabsorção de oócitos, dado o declínio acentuado no número de oócitos não-corionados iniciado no décimo sétimo dia de vida, enquanto que o número de oócitos corionados se manteve constante. A reabsorção de oócitos observada em fêmeas virgens de *N. viridula* pode ter ocorrido em resposta à limitação por tempo para reprodução pela fêmea, em busca de estender seu período de reprodução (ROSENHEIM; HEIMPEL; MANGEL, 2000). A reabsorção de oócitos é um fenômeno comum em alguns grupos de insetos em resposta a condições desfavoráveis, sendo os fatores ambientais e fisiológicos os indutores deste processo em vários insetos (BELL; BOHM, 1975; PAPAJ 2000). Entretanto, as mudanças que ocorrem no ovário durante a reabsorção e o mecanismo de regulação dessas mudanças ainda permanecem desconhecidas. Além do fato da reabsorção de oócitos estar associada ao reaproveitamento de nutrientes, dada pela degradação das vitelogeninas e vitelinas do vitelo e posterior disponibilização de peptídeos e aminoácidos na hemolinfa, acredita-se ainda que este processo desempenhe papel importante na inibição da produção de ovos antes da cópula (KOTAKI, 2003; HORTON; LEWIS; NEVEN, 2005).

No entanto, apesar da fecundidade normalmente declinar em resposta à idade, não há indicações de que a reabsorção de oócitos no ovário de fêmeas virgens de *N. viridula* possa resultar na redução de seu potencial futuro de reprodução, apesar de que o atraso e/ou ausência de cópula na barata *Nauphoeta cinerea* (Blattodea: Blattidae), que apresenta reprodução em ciclos

bem definidos, ter sido relacionado à indução de morte celular (apoptose) de oócitos imaturos e maduros, com conseqüente redução de sua capacidade reprodutiva futura (MOORE; SHARMA, 2005; BARRETT et al., 2008).

A cópula pode funcionar como estímulo necessário a vários processos fisiológicos da fêmea, influenciando inúmeros aspectos de sua reprodução, como o início da vitelogênese, o início ou velocidade do desenvolvimento do ovário, a fecundidade e a receptividade a novos parceiros, entre outros (JIN; GONG, 2001; GILLOTT, 2003; UCHIDA et al., 2003), mas pouco se conhece sobre a ausência da cópula em processos de reabsorção de oócitos (BELL; BOHM, 1975; MOORE; SHARMA, 2005; BARRETT et al., 2008). Em Hemiptera, a cópula tem se mostrado necessária para a produção e maturação dos folículos, além de influenciar a velocidade de desenvolvimento do ovário (BRUNT, 1971; HORTON; LEWIS; NEVEN, 2005). No entanto, *N. viridula* parece não necessitar de estímulos associados à cópula para iniciar e manter o processo de vitelogênese, visto que o processo de maturação dos ovários de fêmeas virgens e acasaladas procedeu de forma semelhante, assemelhando-se ao observado para outras espécies de percevejos (MASNER, 1966; WIGHTMAN, 1973; DAVEY et al., 1986; ADAMS, 2000). Para esse percevejo, a cópula parece ser fundamental para que fêmeas realizem postura, visto que fêmeas virgens jamais depositaram seus ovos. O efeito da cópula no desenvolvimento e deposição de ovos parece ser uma característica bastante variável em Heteroptera, ou até mesmo em alguns gêneros em particular. Mesmo quando há deposição de ovos por fêmeas virgens, podem ocorrer alterações no período de desenvolvimento dos ovários, tamanho e composição de oócitos e/ou no número de ovos depositados (ODHIAMBO; ARORA, 1973; HORTON; LEWIS; NEVEN, 2005).

O aumento gradativo na concentração de proteínas totais no início da vida adulta e a disponibilização de vitelogeninas apenas no período próximo ao término da fase de pré-cópula de *N. viridula* foram semelhantes ao observado no percevejo *R. clavatus,* que também teve o desenvolvimento de seus ovários coincidindo com a disponibilização de vitelogeninas na hemolinfa (SHINODA, 1996).

A maior disponibilidade de proteínas totais na hemolinfa de fêmeas virgens de *N. viridula*, quando comparada a de fêmeas acasaladas, não correspondeu à disponibilidade de vitelogeninas. Estas diferenças quanto ao estado de acasalamento das fêmeas de *N. viridula* não foram observadas em *Plautia stali* (Hemiptera: Pentatomidae), sendo indistintas as diferenças nas

concentrações de proteínas entre fêmeas virgens e acasaladas (KOTAKI, 2003). A maior abundância relativa de vitelogeninas na hemolinfa de fêmeas acasaladas, após a primeira postura, indica a maior atividade de síntese de proteínas nestas fêmeas, dado que o processo de absorção das vitelogeninas da hemolinfa para o oócito ocorreu continuamente, visto a maturação cíclica de novos oócitos. Este fato ainda indica a existência de um mecanismo de regulação da síntese dessas proteínas relacionado com a deposição de ovos, assim como observado para outros insetos, em que há um mecanismo de regulação endócrina associado à deposição de ovos, controlando o início de um novo ciclo de maturação de ovos (SCHÄL et al., 1997; YIN; STOFFOLANO, 1997).

3.5 Conclusões

Nezara viridula é um inseto sinovigênico;

O ovário de *N. viridula* é do tipo meroístico telotrófico, contendo 7 ovaríolos por ovário;

A concentração de proteínas totais disponíveis na hemolinfa aumenta gradativamente no período de pré-cópula, independentemente da condição de acasalamento; porém, os níveis de proteínas totais na hemolinfa de fêmeas virgens é sempre superior ao das fêmeas acasaladas;

A vitelogênese e o desenvolvimento de oócitos em *Nezara viridula* são independentes de estímulos derivados da cópula;

As vitelogeninas são disponibilizadas na hemolinfa apenas no período próximo ao término da pré-cópula (10 dias);

A ausência de cópula leva à reabsorção de oócitos em *N. viridula*.

Referências

ADAMS, T.S. Arthopoda-Insecta. In: ADAMS, T.S. (Ed). **Reproductive Biology of Invertebrates.** Progress in Reproductive Endocrinology. New York: Wiley, 1997. p. 277-338.

ADAMS, T.S. Effect of diet and mating status on ovarian development in a predaceous stink bug *Perillus bioculatus* (Hemiptera: Pentatomidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v.93, n. 3, p.529-535, 2000.

ALCOCK, J.; GWYNNE, D.T. Evolution of insect mating system: the impact of individual selectionist thinking. In: BAILEY, W.J.; RIDSDILL-SMITH, J. (Ed.). **Reproductive behavior of insects.** London: Chapman & Hall, 1991. p.11-36.

BARRETT, E.L.B.; PREZIOSI, R.F.; MOORE, A.J.; MOORE, P.J.. Effects of mating delay and nutritional signals on resource recycling in a cyclically breeding cockroach. **Journal of Insect Physiology,** Oxford, v. 54, p. 25-31, 2008.

BARRIE, A.; PROSSER, S.J. Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. In: BOUTTON, T.W. and YAMASAKI, S., Eds. Mass Spectrometry of Soils, p. 1-46, 1996.

BELL, W.J.; BOHM, M.K. Oosorption in insects. **Biological Reviews**. Cambridge, v.50, p.373-396, 1975.

BOGGS, C.L. Reproductive allocation from reserves and income in butterfly species with differing adult diets. **Ecology**, Washington, v.78, p.181-191, 1997.

BÜNING, J. The ovary of Ectognatha, the Insecta.s.str. In BÜNING, J.. (Ed.). **The insect ovary:** ultrastructure, previtellogenic growth and evolution. London: Chapman & Hall, 1994. p. 281-299.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, 1976.

BRUNT, A.M. The histology of the first batch of eggs and their associated tissues in the ovariole of *Dysdercus fasciatus* Signoret (Heteroptera, Pyrrhocoridae) as seen in the light microscope. **Journal of Morphology**, New York, v. 134, p.105–130, 1971.

CHAPMAN, R.F. **The insects:** structure and function. Cambridge: Cambridge University Press, 1998. 749p.

CÔNSOLI, F.L.; CONTI, E.; DANGOTT, L.J.; VINSON, S.B. In vitro culture of the teratocytes of *Trissolcus basalis* (Hymenoptera, Scelionidae) and their requirements for host-derived components. **Biological Control**, Orlando, v. 22, p. 176-184, 2001.

CÔNSOLI, F.L.; BRANDT, S.L.; COUDRON, T.A.; VINSON, S.B. Host regulation and release of parasitism-specific proteins in the system *Toxoneuron nigriceps–Heliothis virescens*. **Comparative Biochemistry and Physiology,** Oxford**,** v. 142B, p. 181–191, 2005.

CORRÊA-FERREIRA, B.S. **Criação massal do percevejo verde *Nezara viridula* (L.).** 1985. 16p. (Documentos. EMBRAPA-CNPSo,11)

CORRÊA-FERREIRA, B.S. **Utilização do parasitóide de ovos *Trissolcus basalis* (Wollaston) no controle de percevejo da soja.** Londrina: Embrapa-CNPSo, 1993. 40p. (Circular Técnica, 11).

COSTA, M.M.L. **Técnica de criação de *Nezara viridula* (L., 1758) (Hemiptera: Pentatomidae) e sua relação com o parasitóide *Eutrichopodopsis nitens* Blanchard, 1966 (Diptera: Tachinidae)**. 1991. 134p. Dissertação (Mestrado em Entomologia)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba,1991.

DAVEY, K.G. Hormonal Controls on Reproduction in female Heteroptera. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 35, p. 443-453, 1997.

DAVEY, K.G., MAIMETES, I.K.; RUEGG, R.P. 1986. The relationship between crop size and egg production in *Rhodnius prolixus.* **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 64, p. 2654-2657, 1986.

DITTMANN, F.; BICZKOWSKI, M. Induction of yolk formation in hemipteran previtellogenic oocytes (*Dysdercus intermedius*). **International Journal of Invertebrate Reproduction and Development**, Amsterdam, v. 28, p.63-70, 1995.

ENGELMANN, F. Insect vitellogenin: Identification, biosynthesis, and role in vitellogenesis. **Advances in Insect Physiology**, San Diego, v. 14, p. 49-108, 1979.

ESQUIVEL, J.F. Stage of gonadal development of the southern green stink bug (Hemiptera;Pentatomidae): Improved visualization. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v.102, n.2, p. 303-309, 2009.

GILLOTT, C. Male accessory gland secretions: Modulators of female reproductive physiology and behavior. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 48, p. 163-184, 2003.

HAGEDORN H. H. The role of ecdysteroids in reproduction. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. (Ed.). **Comprehmsivie Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Oxford, Pergamon Press, 1985, v. 8, p. 205-261.

HAGEDORN, H.H; KUNKEL, J.G. Vitellogenin and vitellin in insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 24, p. 475-505, 1979.

HIRAI, S.: WATANABE, M., KIYOTA, T.;CHINZEI, Y. Nucleotide sequence of vitellogenin mRNA in the bean bug, *Riptortus clavatus*: analysis of processing in the fat body and ovary. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 28, p. 537–547, 1998.

HORTON, D.H.; LEWIS, T.M.; NEVEN, L.G. Ovarian development and lipid reserves are affected by mating delays in three species of *Anthocoris* (Hemiptera: Anthocoridae). **The Canadian Entomologist**, Ottawa, v. 137, p. 328-336, 2005.

HUFFAKER, C.B.; GUTIERREZ, A.P. **Ecological Entomology.** 2nd ed. New York: John Wiley, 1999. 756p.

JERVIS, M.; FERNS, P. The timing of eggs maturation in insects: ovigeny index and initial egg load as measures of fitness and of resource allocation. **Oikos,** Copenhagen, v. 107, 449-460, 2004.

JERVIS, M.; BOGGS, C.L.; FERNS, P.N. Egg maturation strategy and its associated trade-offs: a synthesis focusing on Lepidoptera. **Ecological Entomology**, London, v.30, p. 359-375, 2005.

JIN, Z.Y.; GONG, H. Male accessory gland derived factors can stimulate oogenesis and enhance oviposition in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 46, p. 175-185, 2001

KARLSSON, B. Feeding habits and change of body composition with age in three nymphalid butterfly species. **Oikos**, Copenhagen, v. 69, p. 224-230, 1994.

KOTAKI, T. Oosorption in the stink bug, *Plautia crossota stali*: induction and vitellogenin dynamics. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 105-113, 2003

LAEMMLI, U.K.Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. **Nature**, London, v. 227**,** p. 680-685, 1970.

LEMOS, W.P; SERRÃO, J.E.; RAMALHO, F.S.; COLA ZANUNCIO, J.C.; LACERDA, M.C. Effect of diet on male reproductive tract of *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Heteroptera: Pentatomidae). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 65, n.1, 2005.

MARTINEZ, T., GARCERA, M.D. Effect of Precocene- II on female specific haemolymph polypeptides in *Oncopeltus faciatus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 6, p. 49–58, 1987.

MASASHI HOTTA, T.; OKUDA, T.T. *Cotesia Kariya* teratocytes: growth and development. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 47, n.1, p. 31-41, 2001.

MASNER, P. 1966. The structure, function and imaginal development of the female inner reproductive organs of *Adelphocoris lineolatus* (Goeze) (Heteroptera: Miridae). **Acta Entomological Bohemoslovaca**. Zagreb, v. 63, p. 177-199, 1966.

MASUDA, H.; OLIVEIRA, P. L. Characterization of vitellin and vitellogenin from *Rhodnius prolixus.* **Insect Biochemistry**, London, v. 15, n. 4, p. 543-550, 1985.

MITCHELL, W.C.; MAU, R.F.L. Sexual activity and longevity of the southern green stink bug, *Nezara viridula.* **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v.62, p.1246-1247, 1969

MOORE, PJ; SHARMA, S. A delay in age at first mating results in the loss of future reproductive potential via apoptosis. **Evolution and Development,** Malden, v. 7, p. 216-222, 2005.

NIJHOUT, H.F. Reproduction. In: NIJHOUT, H.F. (Ed.). **Insect Hormone**. Princeton: University, Princeton, ,1994. p. 142-159.

OBERHAUSER, K.S. Fecundity, lifespan and egg mass in butterflies: effects of male-derived and female size. **Functional Ecology**, Oxford, v. 11, p. 166-175, 1997.

ODHIAMBO, T.R.; ARORA, G.K. A comparative study of oocyte development in cotton stainers (*Dysdercus* spp., Pyrrhocoridae) and the factors that control egg production. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.16, p. 455-470, 1973.

PAPAJ, D.R. Ovarian dynamics and host use: **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 45, p. 423-448, 2000.

PETTERS, R. M.; GROSCH, D.S. Reproductive performance of *Bracon hebetor* females with more or fewer than the normal number of ovarioles. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 70, p. 577-582, 1977.

POIANI, A. Complexity of seminal fluid: a review. **Behavioral Ecology and Sociobiology,** New York, v.60, p. 289-310, 2006.

PRICE, P.W. Reproductive strategies in parasitoid wasps. **American Naturalist**, Chicago, v. 107, p. 684-693, 1973.

RAABE, M. Insect reproduction: Regulation of successive steps. **Advances in Insect Physiology**, San Diego, v.19, p. 129-154, 1986.

RAIKHEL, A.S.; DHADIALLA, T.S. Accumulation of yolk proteins in insect oocyte. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.37, p. 217-251, 1992.

RAIKHEL A. S.; BROWN, M. R.; BELLES, X. Hormonal control of reproductive processes. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. (Ed). **Comprehensive molecular insect science**, Boston:Elsevier Academic Press, 2005. v. 3. p. 433–491.

RIDDIFORD, L.M.; HIRUMA, K.; ZHOU, X.; NELSON, C.A. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 33, p. 1327-1338, 2003.

ROSENHEIM, J.A.; HEIMPEL, G.E.; MANGEL, M. Egg maturation, egg resorption and the costliness of transient egg limitation in insects. **Proceedings of the Royal Society of London,** London, Série B, v. 267, p. 1565-1573, 2000.

SCHAL, C.; HOLBROOK, G.L.; BACHMANN, J.A.S; SEVALA, V.L. Reproductive biology of the German cockroach, *Blattella germanica*: juvenile hormone as a pleiotropic master regulator. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology,** New York, v. 35, p. 405–26, 1997.

SHINODA, T.; MIURA, K.; TAYLOR, D.; CHINZEI, Y. Vitellogenins and vitellins in the bean bug, *Riptortus clavatus* (Hemiptera: Alydidae): Purification, immunological identification, and induction by juvenile hormone. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 31, p. 395-412, 1996.

SINGH, Z. **Bionomics of the Southern Green Stink Bug, *Nezara viridula* Linn. (Hemiptera: Pentatomidae) in Central India**. 1972. 141 p. PhD. (Dissertation) - Univ. Illinois.

STEWART, L.A.; HEMPTINNE, J.L.; DIXON, A.F.G. Reproductive tactics of ladybird beetles: relationships between egg size, ovariole number and developmental time. **Functional Ecology**, Oxford, v. 5, p. 380–385, 1991.

SWEVER B.L.; RAIKHEL, A.S; SAPPINGTON, T.W.; SHIRK, P.; IATROU, K. Vitellogenesis and post-vitellogenic maturation of the insect ovarian follicle. In: GILBERT, L.I.; IATROU, K.; GILL, S.S. (Ed.). **Comprehensive molecular insect science**, Boston: Elsevier, 2005. v.1, p 87–155.

TSCHINKEL, W.R. Relationship between ovariole number and spermathecal sperm count in ant queens: a new allometry. **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 80, p. 201-211, 1987.

UCHIDA, K.; MORIBAYASHI, A.; MATSUOKA, H.; ODA, T.Effects of Mating on Oogenesis Induced by Amino Acid Infusion, Amino Acid Feeding, or Blood Feeding in the Mosquito *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). **Journal of Medical Entomology,** Lanham, v. 40, n. 4, p. 441-446, 2003.

WELLINGS, P.W., LEATHER, S.R.; DIXON, A.F.G. Seasonal variation in reproductive potential: a programmed feature of aphid life cycles. **Journal of Animal Ecology**, Oxford, v. 49, p. 975-985, 1980.

WHEELER, D. The role of nourishment in oogenesis. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 41, p. 407-431, 1996.

WIGHTMAN, J.A. Ovariole microstructure and vitellogenesis in *Lygocoris pabulinus* (Hemiptera: Mirida) and other mirids. **Journal of Entomology**, London, v. 48, p. 103-115, 1973.

WYATT, G.R. Vitellogenin synthesis and the analysis of juvenile hormone action in locust fat body. **Canadian Journal of Zoology**, Ottawa, v. 66, p. 2600–2610, 1888.

YIN, C.M.; STOFFOLANO Jr, J.G. Juvenile hormone regulation of reproduction in the cyclorrhaphous diptera with emphasis on oogenesis. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New York, v. 35, p. 513–537, 1997.

ZIGLER, R; VAN ANTWERPEN, R. Lipid uptake by insect oocytes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology,** Oxford, v. 36, p. 264-272, 2006.

4 A FREQÜÊNCIA DE CÓPULA AFETA A REPRODUÇÃO DE *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)?

Resumo

Aspectos reprodutivos de fêmeas de *Nezara viridula* (L, 1758) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) foram avaliados em função da freqüência de cópulas realizada. Adultos virgens de 10 dias de idade foram acondicionados em gaiolas (1 casal/gaiola) para a realização do número desejado de cópulas (1 a 4 cópulas) e mantidos em condições controladas (25±1°C, 60±10% UR, fotofase de 14 h). Após a(s) cópula(s), os machos eram retirados, sendo que apenas as fêmeas permaneceram nas gaiolas para a observação de parâmetros reprodutivos e biológicos, tais como fecundidade e fertilidade, número médio de ovos/postura, tamanho da primeira e última postura e longevidade. Os insetos foram alimentados com sementes de amendoim e frutos de ligustro (*Ligustrum lucidum*). Cada tratamento constou de vinte repetições, sendo utilizadas apenas as fêmeas que realizaram posturas. De acordo com os resultados obtidos, observou-se que a freqüência de cópula afetou a capacidade reprodutiva de fêmeas de *N. viridula*. Fêmeas que copularam por duas vezes foram mais fecundas em relação àquelas que copularam por mais vezes. O ritmo de postura foi influenciado pelo número de cópulas, ocorrendo concentração na deposição de ovos no início do período reprodutivo de fêmeas que acasalaram uma ou duas vezes. Entretanto, a fertilidade e longevidade não foram afetadas em função do número de cópulas realizadas.

Palavras-chave: Reprodução; Freqüência de cópulas; Fertilidade; Capacidade reprodutiva

DOES MATING FREQUENCY AFFECT REPRODUCTION IN *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) ((HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)?

Abstract

The effects of the mating frequency on the reproductive biology of *Nezara viridula* (L., 1758) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) females were evaluated. Ten day-old virgin adults were placed in cages (1 couple/cage) to achieve the desired number of copulations (1 to 4 copulations) under controlled conditions (25 ± 1 ° C, 60 ± 10% RH, photoperiod of 14 h). After copulation, males were removed, and only females remained in their cages for observation of biological and reproductive parameters such as fecundity and fertility, average number of eggs per eggs mass, size of the first and last egg masses and longevity. Insects were fed with peanut seeds and privet fruits (*Ligustrum lucidum*). Each treatment consisted of twenty replicates of those females that laid eggs. Results showed that mating frequency affected the reproductive capacity of females *N. viridula*. Females that mated twice were more fecund than those with a higher mating frequency. The egg laying rhythm was influenced by the number of matings with the peak of egg deposition at the beginning of the reproductive period of females that mated once or twice. However, fertility and longevity were not affected by the number of matings performed.

Keywords: Reproduction; Frequency of copulation; Fertility; Reproductive capacity.

4.1 Introdução

Assim como em outros organismos em que ocorre a fecundação interna, a cópula em insetos tem como principal função a transferência de espermatozóides do macho para a fêmea, sendo que cada oportunidade de cópula oferece uma oportunidade para machos deixarem seus descendentes. Com isso, a aptidão biológica de machos está relacionada às inúmeras cópulas realizadas durante sua vida, sendo o seu sucesso reprodutivo proporcional à sua freqüência de cópulas. Entretanto, para as fêmeas, o sucesso reprodutivo está relacionado com a maior produção de ovos viáveis, o que nem sempre está diretamente relacionado à atividade de cópula. Assim, mesmo sendo possível a obtenção de sua capacidade reprodutiva máxima com uma única cópula, a ocorrência de poliandria em insetos é bastante comum, seja pela realização de múltiplas cópulas (cópulas com diferentes machos) ou de cópulas repetidas (cópulas com um mesmo macho) (HUNTER et al., 1993; ARNQUVIST; NILSSON, 2000; JENNIONS; PETRIE, 2000; FEDORKA; MOUSSEAU, 2002).

Múltiplas cópulas ou cópulas repetitivas podem servir como estratégia para aquisição de nutrientes que venham a ser utilizados pela fêmea na sustentação de inúmeros processos fisiológicos, ligados ou não diretamente à reprodução, dependendo de sua fisiologia reprodutiva. No momento da cópula, machos podem transferir às fêmeas uma série de compostos juntamente com seus espermatozóides. Estes compostos são produzidos por glândulas acessórias e armazenados na vesícula seminal de machos, podendo conter substâncias relacionadas à defesa, compostos moduladores e substâncias nutritivas, como proteínas, carboidratos (livres e ligados a proteínas) e lipídeos (normalmente associados às proteínas) (GILLOTT, 2003). As substâncias nutritivas podem estar relacionadas à nutrição dos espermatozóides durante seu armazenamento na espermateca da fêmea e/ou à própria nutrição da fêmea, desenvolvimento de oócitos e nutrição do embrião (ALCOCK, 1994; WHEELER, 1996; GILLOTT, 2003). Essas substâncias nutritivas, normalmente proteínas, também influenciam a fecundidade e a fertilidade de fêmeas sob estresse nutricional (BUTLIN; WOODHATCH; HEWITT, 1987; BOGGS, 1990; WHEELER, 1996). Os compostos com ação moduladora presentes no complexo de substâncias transferido para as fêmeas via cópula influenciam inúmeros processos fisiológicos e comportamentais do inseto, levando à indução da vitelogênese, alterações na receptividade da fêmea a novos machos, e na produção de feromônios sexuais, entre outros (GILLOTT, 2003).

No entanto, há custos associados ao processo reprodutivo (HARSHMAN; ZERA, 2007), sendo que à medida que a frequência de cópula aumenta, também aumentam os custos associados ao tempo e energia gastos durante a cópula (DALY, 1978; WATSON; ARQNVIST; STALLAMAN, 1998), à exposição a inimigos naturais, como predadores (ARNQVIST, 1997), à injúria mecânica (HELVERSEN; HELVERSEN, 1991) e à infecção por parasitas e/ou patógenos (HURST et al., 1995). De uma forma geral, mesmo com os riscos associados à realização de múltiplas cópulas ou cópulas repetidas, vários são os casos em que a fecundidade está diretamente relacionada ao número de cópulas realizadas pela fêmea (MC LAIN; LANIER; MARSH, 1990; WARD; LANDOLT, 1995; HSU; WU, 2000)

Apesar de o período de duração da cópula representar riscos quanto à predação (WING, 1988), cópulas prolongadas são estratégicas no processo de competição entre machos, visto que as mesmas limitam o acesso de outros machos à fêmea, permitindo a transferência do volume máximo de espermatozóides e nutrientes associados à vesícula seminal (KON; OE; NUMATA, 1993; ALCOCK, 1994; WHEELER, 1996) e o completo preenchimento da espermateca, evitando, assim, que a fêmea se torne receptiva novamente (WANG; MILLAR, 1997; MCLAIN, 1998; RUTOWSKI, 1998). Para algumas espécies, o sucesso reprodutivo também está associado ao seu tamanho, sendo que machos maiores realizam cópulas mais prolongadas e são assim capazes de transferir maior volume de nutrientes associados à vesícula seminal (THORNHILL; ALCOCK, 1983; MCLAIN; LANIER; MARSH, 1990).

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da freqüência de cópulas repetidas na capacidade reprodutiva de fêmeas de *Nezara viridula* (L., 1758) (Hemiptera: Pentatomidae) uma das mais importantes pragas da cultura da soja no mundo, para melhor entender o processo reprodutivo deste inseto visando ao desenvolvimento de táticas alternativas de controle de crescimento populacional e ao aprimoramento de técnicas de criação em condições de laboratório. Um dos métodos alternativos de controle mais eficaz empregado no controle desse inseto envolve a produção em larga escala do parasitóide de ovos *Trissolcus basalis* (Hymenoptera: Scelionidae) (CORRÊA-FERREIRA, 2002). No entanto, para que este parasitóide seja produzido, também há a necessidade de produção de percevejos em larga escala. Assim, a determinação de fatores que possam influenciar a capacidade de reprodução desse inseto em condições de laboratório é essencial para a maximização do seu processo de criação.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Efeito da freqüência de cópulas sobre a reprodução de *Nezara viridula*

Após a emergência, adultos de *N. viridula* foram separados por sexo e mantidos em placas gerbox (11x11x3 cm) até completarem 10 dias de idade (período de pré-cópula). Ao término do período de pré-cópula, casais foram individualizados em recipiente acrílico (copos plásticos de 300 ml) contendo uma tira de "voil" (2x10 cm) em seu interior como substrato de postura. Os percevejos foram alimentados com sementes de amendoim e frutos de ligustro, *Ligustrum lucidum* (CORRÊA-FERREIRA, 1993). Após a realização do número desejado de cópulas de acordo com cada tratamento, os machos foram retirados e somente as fêmeas permaneceram nas gaiolas para a avaliação dos parâmetros biológicos. O peso dos adultos foi padronizado, sendo de 160 ± 4,74 mg para fêmeas e 130 ± 5,95 mg para machos.

O experimento foi composto por quatro tratamentos, os quais variaram de uma a quatro cópulas. Cada tratamento constou de 20 fêmeas reprodutivamente ativas, ou seja, apenas fêmeas que efetivamente copularam e depositaram ovos, sendo cada fêmea considerada uma repetição. Os ensaios foram conduzidos em condições controladas (25±1°C, 60±10% UR, fotofase de 14 h), sendo avaliada a fecundidade, a fertilidade, o número médio de ovos/postura, o tamanho da primeira e última postura e a longevidade das fêmeas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os dados de fecundidade, fertilidade, número de ovos por postura, número de ovos na primeira e última postura e longevidade das fêmeas submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Para análise, os dados de fecundidade foram corrigidos para $\sqrt{(x)}$ e os de fertilidade para $x^{1,5}$.

4.3 Resultados

A realização de cópulas repetidas reduziu a fecundidade de fêmeas de *N. viridula*. Fêmeas que realizaram três ou quatro cópulas foram menos fecundas do que aquelas que copularam duas vezes (Figura 1A). Entretanto, o efeito da freqüência de cópula nos intervalos estudados não

permitiu o estabelecimento de qualquer relação proporcional entre o número de cópulas realizado e a fecundidade de fêmeas desse percevejo. Apesar dos efeitos nocivos do maior número de cópulas na fecundidade de *N. viridula*, a fertilidade das fêmeas deste percevejo não apresentou alteração significativa em relação ao número de cópulas realizadas, mesmo com a leve tendência apresentada de redução da fertilidade com o aumento no número de cópulas realizadas (Figura 1B).

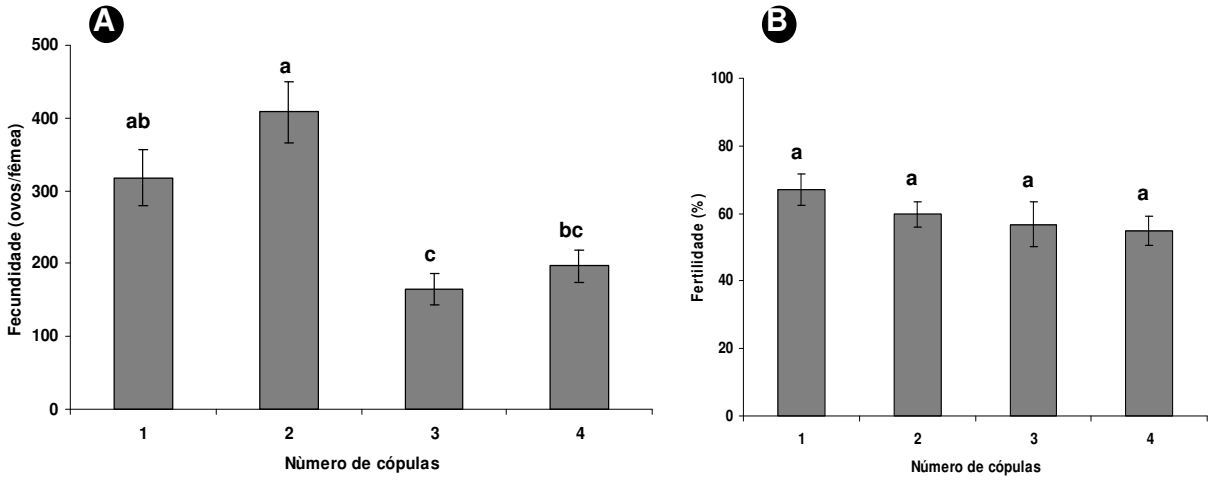

Figura 1 - Efeito da freqüência de cópulas repetidas na fecundidade (EP), fertilidade (EP) de *Nezara viridula* (25±1ºC; 60±10% UR; fotofase 14h). Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)

Apesar de não haver diferença no número de ovos da primeira e da última postura entre fêmeas com número distinto de cópulas, o número médio de ovos por postura foi superior em fêmeas que realizaram duas cópulas, apesar do mesmo não diferir daquele de fêmeas que copularam uma única vez (Tabela 1).

O número total de posturas e a distribuição relativa das mesmas também foram alterados pela freqüência com que fêmeas de *N. viridula* copularam (Tabela 1, Figura 2). Fêmeas que copularam duas vezes depositaram, em média, maior número de posturas em relação às fêmeas que copularam por três ou quatro vezes (Tabela 1).

Tabela 1 - Número de posturas (x±EP), número de ovos por postura (x±EP), número de ovos na primeira (x±EP) e última oviposição (x±EP) de *N. viridula* (25±1ºC; 60±10% UR; fotofase 14h)

Número de cópulas	Número de posturas	Número de ovos*		
		Por postura	Primeira oviposição	Última oviposição
1	4,2 ± 0,5 ab	77,7 ± 4,5 ab	84,9 ± 5,4 a	68,1 ± 6,7 a
2	5,1±0,5 a	81,8 ± 4,1 a	85,6 ± 3,3 a	76,5 ± 4,5 a
3	2,7±0,4 b	64,0 ± 4,5 b	69,6 ± 6,0 a	58,2 ± 5,4 a
4	3,1 ± 0,4 b	69,1 ± 5,3 ab	78,2 ± 6,3 a	57,5 ± 6,5 a

*Médias seguidas de mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). Os dados de número de ovos da primeira postura foram corrigidos para x^2.

A freqüência de fêmeas que realizaram múltiplas posturas também foi alterada pelo número de cópulas. Entre as fêmeas que copularam uma ou duas vezes, mais de 50% delas realizaram no mínimo cinco posturas, enquanto que 50% das fêmeas que copularam três ou quatro vezes realizaram apenas uma ou duas posturas. Enquanto fêmeas que copularam 3 ou 4 vezes realizaram, em sua grande maioria, no máximo, cinco posturas, fêmeas com uma ou duas cópulas realizaram até nove posturas (Figura 2). Ao contrário do observado para a fecundidade, fêmeas de *N. viridula* que copularam um menor número de vezes foram menos longevas do que aquelas que copularam quatro vezes (Figura 3).

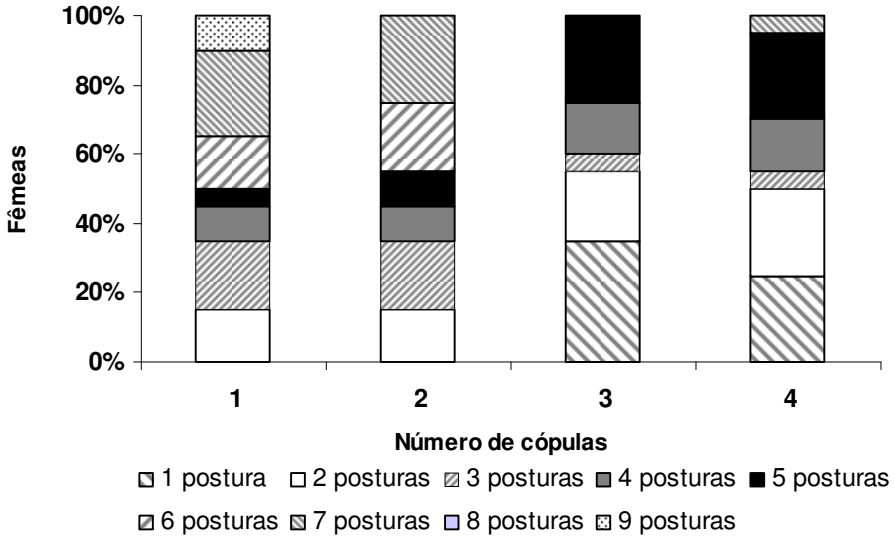

Figura 2 - Distribuição relativa da freqüência de postura de fêmeas de *Nezara viridula* que realizaram números distintos de cópulas repetidas (25±1%ºC; 60±10% UR; fotofase 14h)

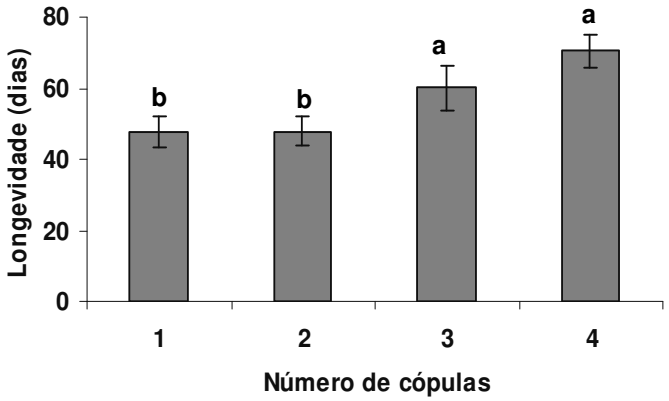

Figura 3 - Longevidade (x±EP) de fêmeas de *Nezara viridula* que realizaram números distintos de cópulas repetidas (25±1ºC; 60±10% UR; fotofase 14h). Barras seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05)

As alterações induzidas na fecundidade, número de posturas e longevidade de fêmeas de *N. viridula* que realizaram número distintos de cópulas repetidas também se refletiu no ritmo diário de produção de ovos e na velocidade de reprodução (Figura 4). Fêmeas que acasalaram uma ou duas vezes concentraram a deposição de ovos no início do período reprodutivo, enquanto as demais, com três e quatro cópulas, apresentaram um atraso no início da deposição de ovos (Figura 4). A velocidade de reprodução, dada pela fecundidade acumulada, também foi maior em fêmeas com uma ou duas posturas, sendo que as mesmas atingiram mais de 80% de sua capacidade reprodutiva ao redor do vigésimo dia, enquanto que as fêmeas que copularam três ou quatro vezes atingiram esses valores bem mais tardiamente, com cerca de 50 dias. Fêmeas de *N. viridula* com duas cópulas atingiram sua capacidade reprodutiva total aos 56 dias, sendo que aquelas que realizaram quatro cópulas só o fizeram aos 76 dias após o término do período de pré-cópula. Fêmeas com uma e três cópulas apresentaram valores intermediários, 66 e 68 dias, respectivamente (Figura 4).

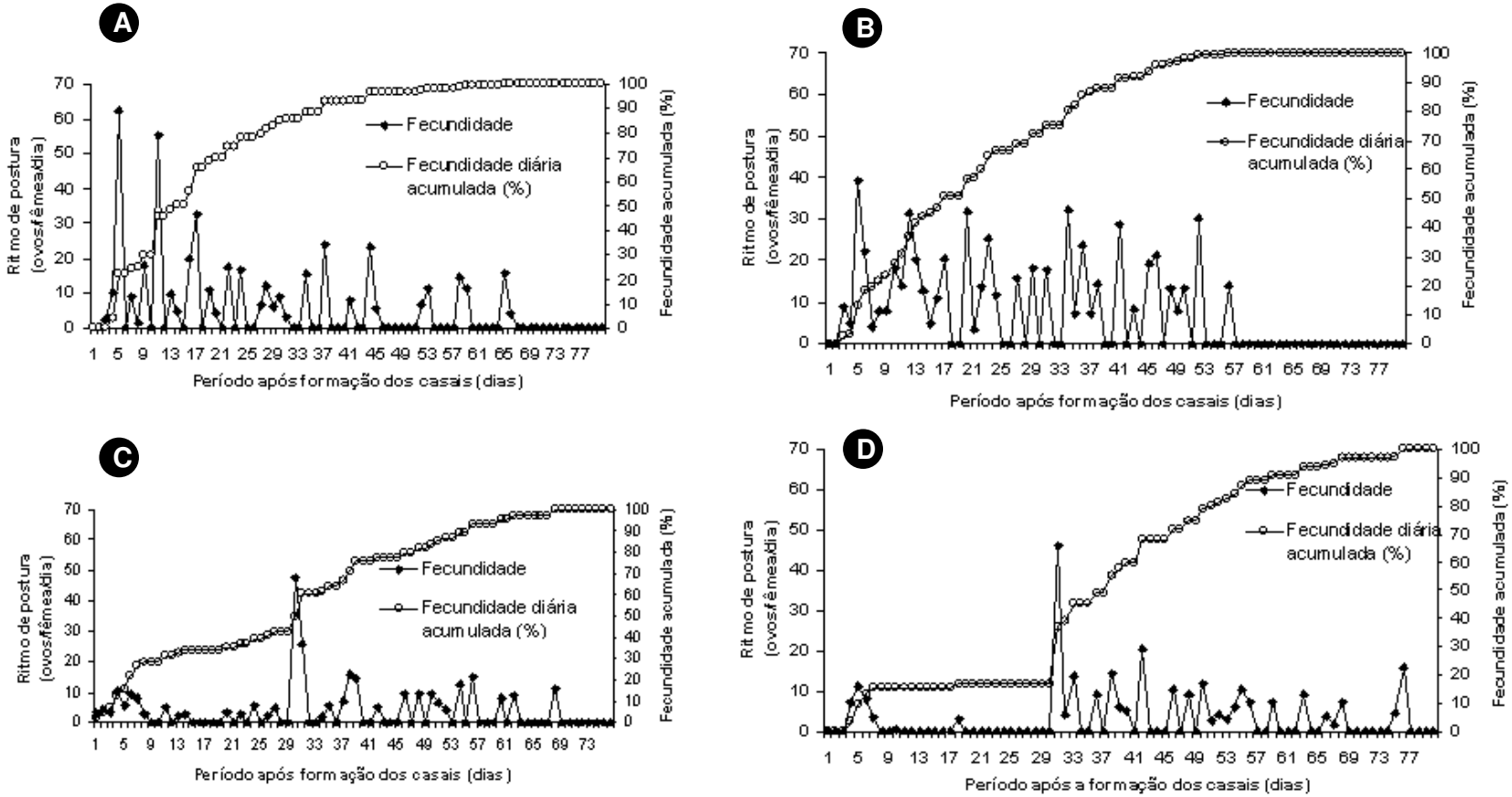

Figura 4 - Ritmo de postura diário e velocidade de reprodução (fecundidade diária acumulada) de fêmeas de *Nezara viridula* que realizaram números distintos de cópulas repetidas (25±1ºC; 60±10% UR; fotofase 14h). A) uma cópula, B) duas cópulas, C) três cópulas, D) quatro cópulas.

4.4 DISCUSSÃO

Há uma grande disparidade entre machos e fêmeas quanto ao número ideal de cópulas em muitos organismos. Mesmo com a indicação de que fêmeas de *N. viridula* realizam várias cópulas, com preferência para a realização de cópulas múltiplas (poliandria) ao invés de cópulas repetidas (MCLAIN, 1992), a capacidade reprodutiva de *N. viridula* foi reduzida com o aumento no número de cópulas realizadas.

Apesar dos efeitos benéficos que podem estar associados à prática de várias cópulas para diversos insetos (WANG; MILLAR, 1997), o aumento da freqüência de cópula para *N. viridula* prejudicou a aptidão reprodutiva de fêmeas deste inseto, à semelhança do observado em outras espécies (RIDLEY, 1988; KON; OE; MUNATA, 1993; OMKAR, 2005; SHUNKER; BALLANTYNE; WEDELL, 2006; HOLLANDER; GWYNNE, 2009). Porém, os benefícios associados à realização de uma segunda cópula por *N. viridula*, assim como para *Nezara antennata* (Heteroptera: Pentatomidae), pode ser decorrente da reposição do fluído seminal perdido durante o próprio processo de transferência de espermatozóides (KON; OE; MUNATA, 1993), sugerindo que os componentes presentes no fluido possam desempenhar qualquer papel funcional na fêmea receptora. De uma forma geral, fêmeas que realizam cópulas múltiplas ou cópulas repetidas são normalmente beneficiadas pela aquisição de uma maior quantidade de nutrientes, dado o maior volume de fluídos da vesícula seminal transferido às mesmas. No entanto, há relatos de proteínas do fluído seminal que passam a afetar a longevidade e reprodução, como a proteína Acp70A em *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophiladae), de fêmeas expostas continuamente à mesma (CHAPMAN et al. 1995; WIGBY; CHAPMAN, 2005).

Assim, a redução observada na fecundidade de fêmeas de *N. viridula* que realizaram três ou quatro cópulas poderia ser decorrente da maior concentração de peptídeos da vesícula seminal que pudessem influenciar diretamente os custos da reprodução em fêmeas, afetando sua capacidade reprodutiva. No entanto, essas fêmeas acabaram apresentando maior longevidade do que aquelas copuladas uma ou duas vezes, indicando a existência de um possível benefício do maior número de cópulas e de outros fatores relacionados à freqüência de cópula, os quais afetariam o desempenho reprodutivo de fêmeas desse percevejo. A menor longevidade de fêmeas que realizaram apenas duas cópulas em relação àquelas com quatro cópulas pode ser explicada pela maior atividade reprodutiva das primeiras, que certamente tiveram maior gasto energético

para sustentar as atividades metabólicas intensas, exigidas pelo processo de produção de ovos, visto que fêmeas que realizaram duas cópulas foram as que produziram a maior quantidade de ovos (ROSE; BRADLEY, 1998; WILLIAMS, 2005).

Outro aspecto que pode estar associado à cópula e que poderia explicar a redução na capacidade de reprodução de fêmeas com atividade sexual mais intensa, seria o alto gasto energético associado às longas cópulas realizadas por *N. viridula*, visto que o custo energético associado à cópula pode afetar a capacidade reprodutiva de insetos (DALY, 1978; WATSON; ARQNVIST; STALLMAN, 1998). O período de acasalamento nesses percevejos são em média de 40 h, podendo variar de oito até 150 horas (HARRIS; TODD, 1980; MCLAIN, 1980). O assédio sexual mais intenso de machos sofrido pelas fêmeas que realizaram três e quatro cópulas, já que as mesmas permaneceram por períodos mais prolongados em conjunto com machos, também poderia ser um fator a explicar a redução na fecundidade e o atraso no seu processo de deposição de ovos, assim como relatado para outros insetos (MCLAIN; PRATT, 1999; CORDERO RIVERA; ANDRÉS, 2002).

De qualquer forma, para fêmeas que são beneficiadas pela transferência de dotes nupciais, aqui inclusos os possíveis nutrientes presentes no fluido seminal, é esperado que os custos associados à cópula (gasto energético e de tempo, substâncias acessórias tóxicas, riscos de injúrias mecânicas) pouco influenciem a aptidão reprodutiva da fêmea após a realização de um número de cópulas superior ao ideal. O mesmo não é esperado para fêmeas em que a transferência desses dotes nupciais não exerça papel fundamental na reprodução, sendo esperado, assim, uma forte redução na aptidão reprodutiva de fêmeas com freqüência de cópula superior daquela ótima (ARNQVIST; NILSSON, 2000). Desta forma, o processo reprodutivo de fêmeas de *N. viridula* parece não se basear na transferência de dotes nupciais, entendido, neste caso, como a presença de nutrientes no fluido seminal que possam influenciar substancialmente a aptidão reprodutiva de fêmeas deste percevejo, contrariando dados da literatura que relatam maior fecundidade em fêmeas que realizam inúmeras cópulas devido à utilização do maior número de espermatozóides como nutrientes, os quais eram destinados para o desenvolvimento de oócitos e para a fecundação de ovos (MCLAIN; LANIER; MARSH, 1990). No entanto, não observamos qualquer alteração na fertilidade de fêmeas com freqüências de cópulas distintas que pudesse corroborar os resultados já publicados, o que também indica que a realização de uma ou

duas cópulas é o suficiente para fornecer às fêmeas desse percevejo o número de espermatozóides necessários para a fertilização do seu completo suplemento de oócitos.

Assim, se fêmeas de *N. viridula* atingem o seu potencial reprodutivo máximo com uma ou duas cópulas, por que fêmeas se sujeitariam à realização de novas cópulas? A promiscuidade se apresenta como um evento comum aos insetos (EBERHARD, 1996; BIRKHEAD; MOLLER, 1998) e parece ocorrer devido ao fato de que os custos associados à resistência ao assédio sexual de machos seriam superiores aos custos associados à própria cópula (WATSON, ARNQVIST, STALLMANN, 1998; PITNICK, BROWN; MILLER, 2001).

4.5 Conclusões

A freqüência de cópulas repetidas afeta a capacidade reprodutiva de fêmeas de *Nezara viridula*;

A realização de uma ou duas cópulas permite a fertilização do complemento total de oócitos de fêmeas de *N. viridula*;

Frequência de cópula superior à ideal (1 - 2 cópulas) afeta o ritmo de postura de *N. viridula*, retardando o início de deposição de ovos e reduzindo o número de posturas realizadas por fêmea;

Fêmeas de *N. viridula* que copularam 3 - 4 vezes foram as mais longevas.

Referências

ALCOCK, J. Postinsemination associations between males and females in insects: The male-guarding hypothesis. **Annual Review of Entomology,** Stanford, v.39, p. 1-21, 1994.

ARNQVIST, G. The evolution of water strider mating systems: cause and consequences of sexual conflits. In: CHOE, J.C.; CRESPI, B.J. (Ed.). **The Evolution of mating system in insects and arachnids**. Cambridge University Press, 1997. v.1, p. 146-163.

ARNQVIST, G.; NILSSON, T. The evolution of polyandry; multiple mating and female fitness in insects. **Animal Behaviour**, London, v. 60, p. 145-164, 2000.

BIRKHEAD, T.R.; MOLLER, A.P. Sperm competition and sexual selection. San Diego, CA :Academic Press,. 1998. 826 p.

BOGGS, C.L. A general model of the role of male-donated nutrients in female insects' reproduction. **American Naturalist**, Chicago, v. 136, p. 598-617, 1990.

BUTLIN, R.K.; WOODHATCH, C.W.; HEWITT, G.M. Male spermatophore investment increase female fecundity in a grasshopper. **Evolution**, Lanham, v.41, p. 221-225, 1987.

CHAPMAN T.; LIDDLE, L.F.; KALB, J.M.; WOLFNER, M.F.; PARTRIDGE, L. Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females is mediated by male accessory gland products. **Nature**, London, v. 373, p. 241-244, 1995.

CORDERO RIVERA, A.; ANDRÉS, J.A. Male coercion and convenience polyandry in a calopterigid damselfly. **Journal of Insect Science**, Madison, v. 2, n.14, 2002.

CORRÊA-FERREIRA, B.S. **Utilização do parasitóide de ovos *Trissolcus basalis* (Wollaston) no controle de percevejo da soja.** Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1993. 40p. (Circular Técnica, 11).

CORRÊA-FERREIRA, B.S. *Trissolcus basalis* para o controle de percevejos da soja. In: PARRA,J.R.P.; BOTELHO, P.S.M.; CORRÊA-FERREIRA, B.S.; BENTO, J.M.S.; (Ed.) **Controle biológico no Brasil:** Parasitóides e predadores. São Paulo: Manole, 2002. cap. 27, p. 449-471.

DALY, M. The cost of mating. **American Naturalist**, Chicago, v. 112, p. 771-774, 1978.

EBERHARD, W.G. **Female Control**: Sexual selection by cryptic female choice. Princeton, NJ: Princeton University Press, 1996. 501 p.

FEDORKA, K.M.; MOUSSEAU, T.A. Material and genetic benefits of female multiple mating and polyandry. **Animal Behaviour,** London, v.64, p.361-367, 2002.

GILLOTT, C.Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 48, p. 163-184, 2003.

HARRIS, V.E.;. TOOD, J.W. Temporal and numerical patterns of reproductive behavior in the southern green stink bug *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 27, p. 105-116, 1980.

HARSHMAN, L.G.; ZERA, A.J. The cost of reproduction: the devil in the details. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 22, p. 80-86, 2007.

HELVERSEN, D.V.; HELVERSEN, O.V. Pre-mating sperm removal in the bush cricket *Metaplastes ornatus* Ramme 1931 (Orthoptera, Tettigonidae, Phaneropteridae). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 28, p. 391-396, 1991.

HOLLANDER, M.D.; GWYNNE, D.T. Female fitness consequences of male harassment and copulation in seed beetles, *Callosobruchus maculates*. **Animal Behaviour**, London, v. 78, p. 1061-1070, 2009.

HUNTER, F.M.; PETRIE, M; OTRONEN, M.; BIRKHEAD, T.; MOLLER, A.P. Why do females copulate repeatedly with one male? **Trends in Ecology & Evolution,** Amsterdam, v. 8, p. 21-26, 1993.

HSU, M.H.; WU, W.J. Effects of multiple mating on female reproductive output in the cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 37, p. 828–834, 2000.

HURST, G.D.D.; SHARPE, R.G.; BROOMFIELD, A.H.; WALKER, L.E.; MAJERUS, T.M.O.; ZAKHAROV, I.A.; MAJERUS, M.E.N. Sexually transmitted disease in a promiscuous insect, *Adalia bipunctata*. **Ecological Entomology**, London, v. 20, p. 230-236, 1995.

JENNIONS, M.D.; PETRIE, M. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 75, p. 21-64, 2000.

KON, M.; OE, A.; NUMATA, H. Intra–and interspecific copulation in the two congeneric green stink bug, *Nezara antennata* and *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae), with reference to postcopulatory changes in the spermatheca. **Ethology**, Berlin, v. 11, p. 83-89, 1993.

MCLAIN, D.K. Female choice and the adaptative significance of prolonged copulation in *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). **Pyche**, cidade, v. 87, p. 325-326, 1980.

MCLAIN, D.K. Preference for polyandry in female stink bugs, *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Insect Behavior**, New York, v.5, p. 403-410, 1992.

MCLAIN, D.K. Non-genetic benefits of mate choice: fecundity enhancement and sex sons. **Animal Behavior**, London, v. 55, p. 1191-1201, 1998.

MCLAIN D.K.; PRATT, A.E. The cost of sexual coercion and heterospecific sexual harassment on the fecundity of a host-specific, seed-eating insect (*Neacoryphus bicrucis*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 46, p. 164-170, 1999.

MCLAIN, D.K.; LANIER, D.L.; MARSH, N.B. Effects of female size, mate size, and number of copulations on fecundity, fertility, and longevity of *Nezara viridula* (Hemiptera :Pentatomidae). **Heredity**, London, v. 64, p. 161-167, 1990.

OMKAR, M.G. Mating in aphidophagous ladybirds: costs and benefits. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 129, n. 8, p. 432-436, 2005.

PITNICK, S.; BROWN, W.D.; MILLER, G.T. Evolution of female remating behavior following experimental removal of sexual selection. **Proceedings of the Royal Society of London**, Series B, v. 268, p. 557-563, 2001.

RIDLEY, M. Mating frequency and fecundity in insects. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 63, p. 509-549, 1988.

ROSE, M.R.; BRADLEY, T.J. Evolutionary physiology of the cost of reproduction. **Oikos**, Buenos Aires, v. 83, p. 443-451, 1998.

RUTOWSKI, R.L. Mating strategies in butterflies. **Scientific American**, New York, v. 279, p. 46-51, 1998.

SHUKER, D.M., BALLANTYNE, G.A.; WEDELL, N. Variation in the cost to females of the sexual conflict over mating in the seed bug, *Lygaeus equestris*. **Animal Behaviour,** London, v. 72, p. 313-321, 2006.

THORNHILL, R.; ALCOCK, J. The evolution of insect mating systems. Cambridge, Mass. :Harvard University Press, 1983. 547p.

WANG, Q.; MILLAR, J.G. Reproductive behavior of *Thyanta pallidovirens* (Heteroptera: Pentatomidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v. 90, p. 380-388, 1997.

WARD, K.E.;LANDOLT,P.J. Influence of multiple matings on fecundity and longevity of female cabbage looper moths (Lepidoptera: Noctuidae). **Annals of the Entomological Society of America**, College Park, v.88, n.6, p 768-772, 1995.

WATSON, P.J.; ARQNVIST, G.; STALLMAN, R.R. Sexual conflict and the energetic cost of mating and mate choice in water striders. **American Naturalist**, Chicago, v. 141, p. 440-465, 1998.

WHEELER, D. The role of nourishment in oogenesis. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 41, p. 407-431, 1996.

WIGBY, S.; CHAPMAN, T. Sex peptide causes mating costs in female *Drosophila melanogaster*. **Current Biology**, London, v. 15, p. 316-321, 2005.

WILLIAMS, T. Mechanisms underlying the costs of egg production. **BioScience**, Washington, v 55, p. 39-48, 2005.

WING, S.R. Cost of mating for female insects: risk of predation in *Photinus collustrans* (Coleoptera: Lampyridae). **The American Naturalist**, Chicago, v. 131, p. 139-142, 1988.

5 ALOCAÇÃO DE NUTRIENTES PARA A REPRODUÇÃO DE *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE): EFEITO DA NUTRIÇÃO DO IMATURO E ADULTO

Resumo

Insetos desenvolveram diferentes estratégias de maturação de seus oócitos, adequando a utilização e alocação de recursos nutricionais à sua fisiologia da reprodução. Assim, dependendo da estratégia adotada, a capacidade de maturação de oócitos e, consequentemente, a capacidade de reprodução do inseto, podem ser dependentes da qualidade do alimento explorado nas diferentes fases do seu desenvolvimento. Assim, este estudo teve por objetivo verificar a estratégia de alocação de nutrientes para a reprodução nas diferentes fases desenvolvimento de *Nezara viridula* (L, 1758) (Hemiptera: Pentatomidae) e avaliar o impacto de diferentes regimes nutricionais nas fases imatura e adulta na aptidão reprodutiva deste inseto. A alocação de nutrientes para a reprodução foi avaliada ninfas e adultos alimentados em dieta enriquecida com o isótopo estável ^{15}N, verificando a distribuição relativa deste marcador em diferentes tecidos somáticos e reprodutivos de adultos (machos e fêmeas). O efeito da alimentação nas diferentes fases de desenvolvimento foi testado em insetos criados em dieta natural (sementes de amendoim e frutos de ligustro) ("rica") ou dieta artificial seca ("pobre") de forma continua ou alternada, nas fases imatura e adulta. Foram realizadas análises quantitativas das proteínas totais e das vitelogeninas da hemolinfa, avaliado o desenvolvimento do ovário após a emergência e aos 10 dias de idade, e os parâmetros biológicos das fêmeas. Os resultados indicaram que apesar de *N. viridula* destinar nutrientes adquiridos em ambas as fases de desenvolvimento para a reprodução, nutrientes da fase ninfal são principalmente investidos no desenvolvimento e manutenção de tecidos somáticos, enquanto os nutrientes da fase adulta são aqueles que mais contribuem para o processo de reprodução nesse inseto. A qualidade do alimento na fase imatura e/ou adulta influenciou o processo de maturação de oócitos, a concentração de proteínas totais e de vitelogeninas disponíveis na hemolinfa e a fecundidade de fêmeas desse percevejo. A alimentação "rica" em nutrientes na fase adulta de *N. viridula* foi essencial para a reprodução das fêmeas, independentemente da dieta na fase imatura, permitindo recuperar as deficiências nutricionais acumuladas na fase imatura quando exposta à dieta "pobre". No entanto, o acesso à dieta natural ("rica") apenas na fase imatura do percevejo não permitiu o acúmulo necessário de reservas nutritivas para sustentar o processo de reprodução de adultos alimentados com dieta artificial ("dieta pobre").

Palavras-chave: Nutrição; Reprodução; Fisiologia reprodutiva; Dieta

NUTRIENT ALLOCATION FOR REPRODUCTION OF *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE): THE EFFECTS OF IMMATURE AND ADULT NUTRITION

Abstract

Insects developed different strategies to mature their oocytes, adjusting the use and allocation of nutritional resources to their reproductive physiology. Thus, depending on their reproductive strategy, the oocyte maturation can depend on the quality of the nutrients acquired on a specific developmental stage. Therefore, our study aimed to verify the strategy of nutrient allocation for reproduction of *Nezara viridula* (L., 1758) (Hemiptera: Pentatomidae), and to evaluate the impact of different food regimes at the nymphal and adult stages on the reproductive capacity of this insects. Nutrient allocation for reproduction was assessed by comparing different somatic and reproductive tissues of adults which were reared either as nymphs or adults on diets enriched with the stable isotope ^{15}N. The effects of the food quality at different stages of the development of *N. viridula* was tested on nymphs and adults by constantly and alternately feeding them on a natural diet (peanut seeds and fruits of privet) ("rich") or on an artificial dry diet ("poor"). The total protein and vitellogenin content in the hemolymph and the maturation of oocytes were also assessed. Our data indicated that although *N. viridula* allocates nutrients acquired at both stages of for reproduction, nutrients from the immatures are mainly used for the development and maintenance of somatic tissues, while nutrients acquired at the adult stage are mostly invested in reproduction. The quality of food offered at the immature and adult stages influenced oocyte maturation, the total protein and vitellogenin concentrations, and affected female fecundity. Adult feeding on the natural diet was essential for female reproduction, regardless the diet used for the immature, allowing insects to overcome any deficiencies due to the use of an unsuitable diet for the immatures. Access to the natural diet (rich diet) only at the immature stages could not sustain the metabolic activities required for adult reproduction.

Keywords: Nutrition; Reproduction; Reproductive physiology; Diet

5.1 Introdução

Os insetos possuem diferentes estratégias de reprodução, as quais estão relacionadas ao desenvolvimento ovariano e às decisões de alocação de recursos nutricionais adquiridos ao longo do desenvolvimento imaturo e da fase adulta. Assim, a estratégia reprodutiva de insetos pode ser avaliada pelo seu índice de ovigenia (IO), que relaciona o potencial reprodutivo inicial do indivíduo (dado pelo número de ovos maduros no ovário) ao seu potencial observado (número total de ovos depositados) (JERVIS; BOGGS; FERNS, 2005). Desta forma, insetos que apresentam IO igual a um (IO = 1) são classificados como pró-ovigênicos, sendo que as fêmeas emergem com o complemento total de oócitos que serão utilizados em sua vida reprodutiva. Por

outro lado, aqueles insetos com IO igual a zero (IO = 0), classificados como sinovigênicos, apresentam fêmeas que emergem com nenhum ou poucos oócitos desenvolvidos. Em alguns grupos de insetos, como Lepidoptera e Hymenoptera, as espécies se distribuem ao longo de um gradiente contínuo delimitado por estes dois extremos, sendo a estratégia reprodutiva adotada extremamente ligada às decisões de alocação de recursos nutricionais ao desenvolvimento de tecidos somáticos ou reprodutivos ao longo do processo de crescimento e metamorfose (JERVIS et al., 2001; JERVIS; BOGGS; FERNS, 2005). Enquanto insetos pró-ovigênicos priorizam a alocação de nutrientes da fase imatura para o desenvolvimento de atividades reprodutivas logo no início de sua vida adulta, os sinovigênicos priorizam o investimento de nutrientes para o desenvolvimento do soma, dependendo da aquisição de nutrientes na fase adulta para a sustentação de suas atividades reprodutivas (BOGGS 1997; JERVIS, et al., 2001; JERVIS; BOGGS; FERNS, 2005).

Assim, os recursos nutricionais para a reprodução de insetos podem ser derivados da utilização de reservas nutritivas adquiridas na fase imatura (investimento "capital"), as quais se encontram armazenadas no tecido adiposo, sendo posteriormente destinadas à produção e maturação de oócitos na fase adulta do inseto. Nutrientes necessários ao desenvolvimento de atividades reprodutivas na fase adulta ainda podem ter sua origem ligada diretamente à alimentação do adulto ou à cópula, quando machos podem transferir moléculas nutritivas às fêmeas junto ao seu fluído seminal (investimento "income") (BOGGS, 1997; JERVIS; FERNS, 2005).

As diferentes estratégias de maturação de oócitos em insetos têm implicações diretas em vários aspectos da sua história de vida, relacionando-se de forma positiva ou negativa a parâmetros biológicos como longevidade, tamanho do adulto e fidelidade hospedeira, entre outros, indicando a existência de custos adaptativos no processo de alocação de nutrientes (JERVIS; BOGGS; FERNS, 2005). Assim, é evidente que a qualidade nutricional do alimento oferecido às diferentes fases do desenvolvimento do inseto (imaturo e adulto) pode ter reflexo significativo no seu processo de reprodução, dependendo da estratégia reprodutiva (maturação de oócitos) utilizada pelo mesmo, visto que os recursos nutricionais afetam diretamente a vitelogênese (ADAMS, 1997).

Dessa forma, dados os custos adaptativos associados ao processo de alocação de nutrientes e de maturação de oócitos em insetos, e da nutrição adequada para a sustentação de

suas atividades reprodutivas, este trabalho teve por objetivo determinar a estratégia de alocação de nutrientes para a sustentação das atividades reprodutivas de *Nezara viridula* (L., 1758) (Hemiptera: Pentatomidae), avaliando-se o investimento de recursos das fases imatura (investimento "capital") e adulta (investimento "income") na reprodução deste percevejo. Também avaliamos o efeito da qualidade do alimento oferecido nas diferentes fases do desenvolvimento na sustentação das suas atividades reprodutivas e resultados além de fornecerem informações básicas sobre as estratégias de reprodução e alocação de recursos nutricionais desse percevejo, permitirão o desenvolvimento de sistemas de criação que explorem dietas distintas para as diferentes fases do desenvolvimento de *N. viridula*. A utilização de parasitóides de ovos em programas de controle biológico desse percevejo em áreas de soja tem sido limitada pelas dificuldades envolvidas no seu processo de criação em larga escala de *Nezara viridula*, indicando a necessidade de informações voltadas à utilização de nutrientes pelo mesmo. Assim, este trabalho visa responder a duas questões básicas: 1) qual a estratégia de alocação de nutrientes em *N. viridula*; 2) como a qualidade do alimento oferecido nas diferentes fases de desenvolvimento afeta a fisiologia e aptidão reprodutiva de fêmeas.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Criação de *Nezara viridula*

Os adultos de *N. viridula* foram acondicionados em gaiolas (50 x 50 x 70 cm) recobertas com tela anti-afídeo. Os percevejos foram alimentados com sementes de amendoim coladas a tiras de papel (15 x 3 cm) e frutos de ligustro, *Ligustrum lucidum*, como suplemento alimentar (CORRÊA-FERREIRA, 1993), e mantidos em condições controladas (25±1°C; 60±10% UR e fotofase de 14 horas), segundo CORRÊA-FERREIRA (1985). Água foi oferecida em algodão hidrófilo embebido no interior de placas plásticas. As posturas foram recolhidas diariamente e acondicionadas em câmaras climatizadas até a eclosão sendo as ninfas criadas em placas gerbox (11 x 11 x 3 cm) até o início do 4º ínstar, quando foram transferidas para gaiolas de criação. A alimentação das ninfas foi idêntica aquelas dos adultos.

5.2.2 Determinação da estratégia de alocação de nutrientes

A estratégia de alocação de nutrientes das fases imatura e adulta para as atividades reprodutivas de *N. viridula* foi avaliada segundo técnica de marcação com isótopo estável, utilizando o aminoácido glicina enriquecido com o isótopo estável ^{15}N (abundância dos átomos de ^{15}N superior a 60%).

5.2.2.1 Alocação de nutrientes da fase imatura - Investimento "capital"

Para a determinação da alocação de nutrientes da fase imatura, ninfas de terceiro ínstar de *N. viridula* foram alimentadas com solução de glicina contendo o isótopo ^{15}N via alimentação. Para tanto, ninfas individualizadas em placa de Petri foram alimentadas com dieta natural (amendoim e frutos de ligustro), juntamente com 200 µl de solução aquosa de glicina enriquecida a 69% de ^{15}N, adicionada a algodão hidrófilo umedecido. Os insetos foram mantidos nestas condições até a emergência dos adultos. Após a emergência, os adultos foram transferidos para caixas tipo gerbox contendo a mesma dieta descrita acima e água, oferecida via algodão hidrófilo, até atingirem a maturação sexual (10 dias de idade), quando casais foram individualizados, utilizando como parceiros insetos não-marcados para a obtenção da primeira postura para análise. Adultos marcados também foram dissecados em solução anti-coagulante (98 mM NaOH; 150 mM NaCl; 1,7 mM EDTA; 46 mM ácido cítrico; pH 4,5) (MASASHI HOTTA, OKUDA, 2001) para a obtenção de tecidos somáticos e reprodutivos. A alocação dos nutrientes assimilados durante a fase imatura de desenvolvimento foi avaliada investigando a disponibilidade de ^{15}N em diversos tecidos do inseto (6 insetos/sexo/tratamento), como o tecido adiposo, aparelho reprodutor e musculatura em machos, e os tecidos adiposo e muscular, ovário, espermateca e ovos em fêmeas. Os diferentes tecidos obtidos foram liofilizados e a abundância relativa de ^{15}N nas amostras determinada via análise por espectrometria de massas.

5.2.2.2 Alocação de nutrientes da fase adulta - Investimento "income"

Fêmeas e machos recém-emergidos de *N. viridula* obtidos da criação estoque foram individualizados em placa de Petri e alimentados com glicina enriquecida com 69% do isótopo

estável ^{15}N, assim como descrito anteriormente. Os insetos ficaram mantidos individualmente nestas condições até atingirem a maturação sexual (10 dias de idade). As fêmeas marcadas foram acondicionadas em gaiolas de acrílico (copos plásticos de 300 ml) com machos virgens não-marcados com a mesma idade para acasalamento e obtenção da primeira postura. Logo após a oviposição, fêmeas foram dissecadas em meio anti-coagulante para a obtenção do tecido adiposo e musculatura alar, que juntamente com o ovário e os ovos obtidos, foram utilizados para a verificação da disponibilidade de nutrientes oriundos do período de alimentação da fase adulta. Os machos com 10 dias de idade foram dissecados em meio anti-coagulante para coleta dos tecido adiposo e muscular e aparelho reprodutor para posterior análise. As amostras das fêmeas foram compostas por tecidos obtidos de cinco indivíduos, enquanto para machos oito indivíduos foram amostrados. As amostras foram preparadas e analisadas por espectrometria de massas para a determinação da disponibilidade de ^{15}N nos diferentes tecidos.

5.2.2.3 Preparo e analise de amostras para determinação isotópica de N por espectrometria de massas

As amostras (tecidos adiposo e muscular, aparelho reprodutor masculino, ovário, espermateca e ovos) de *N. viridula* foram liofilizadas e posteriormente seladas em cápsulas miniaturas de estanho (Sn), sendo admitidas no auto-amostrador de um analisador de carbono e nitrogenio automático (ANCA, Europa Scientific, Crewe, UK). As amostras foram arrastadas com um fluxo de He ultrapuro para no auto-amostrador. Na seqüência, foram levadas para o interior de tubo de combustão vertical, quando um pulso de O_2 ultra puro substituiu temporariamente o fluxo de He. O tubo de combustão foi preenchido com um catalisador, o Cr_2O_3 (óxido de cromo), e CuO (óxido de cobre), em fios cortados em pequenos pedaços, que oxida os hidrocarbonos, e lã de prata (Ag) que tem a função de reter S (SO_2) e halogênios. Quando o pulso de O_2 chega ao forno de combustão juntamente com a amostra selada na cápsula de Sn, a temperatura local inicial passa de 1000ºC para 1700ºC, levando à completa combustão das amostras.

Os produtos da combustão: CO_2, N_2, NO_x e H_2O foram levados para um tubo de redução mantido a 600ºC e que contém cobre metálico (Cu). No tubo de redução, os óxidos de nitrogênio

foram reduzidos a N_2, sendo também retido o excesso de O_2. A seguir, os gases foram conduzidos pelo gás carregador para uma coluna preenchida com perclorato de magnésio [$Mg(ClO_4)_2$], que retém o vapor de água. Por último, uma coluna cromatográfica separou o CO_2 de impurezas. Uma pequena fração do efluente (0,1%) do sistema de preparação de amostra entrou no espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS) por um longo tubo capilar com um constritor para ajuste do fluxo de gás na entrada do IRMS. O gás entrando na fonte foi analisado para N-total e razão $^{15}N/^{14}N$, por meio das intensidades das massas 28 ($^{14}N^{14}N$), 29($^{15}N^{14}N$) e 30 ($^{15}N^{15}N$) (BARRIE; PRESSER, 1996).

O experimento de determinação da estratégia de alocação de nutrientes foi avaliado separadamente para machos e fêmeas. Para cada sexo, o experimento foi inteiramente casualizado e constituído por dois tratamentos (5.2.2.1 investimento "capital" e 5.2.2.2 investimento "income"). Os dados foram submetidos à analise de variância e as médias comparadas pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade.

5.2.3 Efeito da qualidade do alimento nas fases imatura e adulta na fisiologia e reprodução de fêmeas de *Nezara viridula*

5.2.3.1 Efeito da alimentação na reprodução de *Nezara. viridula*

O efeito da nutrição nas diferentes fases do desenvolvimento de *N. viridula* na sua reprodução foi avaliado em diferentes regimes nutricionais: i) dieta "rica" (dieta natural) e ii) dieta "pobre" (dieta artificial), alternados ou não nas fases imatura e adulta. Assim, ninfas receberam dieta natural (sementes de amendoim e frutos de ligustro) até o início do 3º ínstar, quando parte das mesmas teve sua alimentação substituída por dieta artificial (FORTES et al., 2006) até a emergência dos adultos. Adultos recém-emergidos de ambos os regimes alimentares em sua fase ninfal, foram individualizados em recipiente acrílico (copos plásticos de 300 ml) para a formação de casais, sendo os mesmos alimentados segundo os tratamentos: 1) ninfas e adultos alimentados com dieta natural (NN); 2) ninfas alimentadas com dieta natural e adultos com dieta artificial (NA); 3) ninfas e adultos alimentados com dieta artificial (AA); 4) ninfas alimentadas com dieta artificial e adulto com dieta natural (AN). O experimento foi mantido em condições controladas (25±2°C; 60±10% UR; fotofase de 14 h). Foram avaliados os seguintes parâmetros

biológicos: peso de machos e fêmeas recém-emergidos, porcentagem de fêmeas que copularam e ovipositaram, número de posturas, fecundidade, fertilidade e longevidade de fêmeas e machos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, contando com quatro tratamentos com 31 repetições para o tratamento (NN); 22 para (NA); 28 para (AA) e 21 para (AN). Os dados foram submetidos à analise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os dados para a porcentagem de fêmeas que acasalaram e a porcentagem de fêmeas que ovipositaram foram corrigidas para arcsen $\sqrt{(x/100)}$, número de postura para $\sqrt{(x+6)}$, fecundidade para $\sqrt{(x+3)}$, longevidade de fêmeas para logx e longevidade de machos para $\sqrt{x}$.

Para a análise de peso de machos e fêmeas recém-emergidos, alimentados com diferentes dietas durante a fase ninfal, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade.

5.2.3.2 Efeito da alimentação na composição bioquímica da hemolinfa e desenvolvimento do ovário de *Nezara viridula*

Para análise do efeito da alimentação na composição bioquímica da hemolinfa e no desenvolvimento do ovário de *N. viridula*, foram utilizadas cinco fêmeas recém-emergidas e com 10 dias de idade. O procedimento de alimentação foi idêntico ao descrito no item 5.2.3.1.

5.2.3.2.1 Análise quantitativa e qualitativa das proteínas

5.2.3.2.1.1 Coleta da hemolinfa

A hemolinfa foi coletada após pequena lesão induzida junto à base do aparelho bucal da fêmeas. A hemolinfa extravasada foi coletada em solução tampão anti-coagulante mantida em gelo. As amostras foram centrifugadas (2.000*g* x 2 min) para a remoção dos hemócitos e o sobrenadante recuperado foi armazenado a -20°C para análises quantitativa e qualitativa de proteínas (CÔNSOLI et al., 2005).

5.2.3.2.1.2 Avaliação quantitativa de proteínas da hemolinfa de fêmeas de *Nezara viridula*

A concentração total de proteínas da hemolinfa foi avaliada pelo teste colorimétrico de BRADFORD (1976), utilizando-se de uma formulação comercial do reagente coomassie (Coomassie Plus Protein, Pierce Company). As amostras de hemolinfa coletadas em solução tampão anti-coagulante foram misturadas ao reagente coomassie plus, seguindo as recomendações do fabricante. A concentração total de proteínas de cada amostra foi determinada comparando-se a absorbância observada a 595 nm para a amostra com aquela obtida para curva-padrão, utilizando albumina como padrão.

Para fêmeas recém-emergidas, o experimento constou de dois tratamentos (provenientes de um regime alimentar rico ou pobre de nutrientes durante a fase ninfal) com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade. Para as fêmeas com 10 dias de idade, o experimento constou de quatro tratamentos, os dados foram submetidos à analise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

5.2.3.2.1.3 Avaliação quantitativa das vitelogeninas na hemolinfa de fêmeas de *Nezara viridula*

A quantidade de vitelogeninas da hemolinfa de *N. viridula* foi determinada pela observação do padrão eletroforético determinado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em meio desnaturante (SDS-PAGE), utilizando o sistema de LAEMMLI (1970). Amostras coletadas em tampão TBS (20 mM Tris; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; pH 7,5) foram misturadas na proporção de 1:1, com 2x tampão de SDS (0,25g SDS; 1,26ml 0,5M Tris-Cl, pH 6,8; 0,84 ml 75% glicerol; 0,5 ml β-mercaptoetanol; 0,40 ml 0,005% azul de bromofenol; 2 ml água Milli-Q; 2% NaCl) da amostra. As amostras foram aquecidas em bloco seco (100ºC x 5 min) e 20µl da amostra, correspondentes a 30 µg de proteínas, foram carregadas em gel de poliacrilamida a 7,5%, sendo as proteínas separadas em voltagem constante (200V) (Protean II, Bio-Rad, Hercules, CA), até que o marcador de fronte atingisse 1,0 cm da base do gel (CÔNSOLI et al., 2001). As bandas protéicas foram reveladas após coloração com azul de Coomassie R-250 (GelCode, Pierce Company) por 1,5 h e remoção do excesso de corante pela

imersão do gel em água por 12-16 h, sob agitação constante. As duas vitelogeninas liberadas na hemolinfa de fêmeas desse percevejo foram identificadas segundo CÔNSOLI et al (2001), e suas abundâncias determinadas utilizando-se do sistema de captura e análise de imagens GelQuant versão 2.7 (Bio-Imaging Systems).

Os dados de abundância das vitelogeninas para fêmeas recém-emergidas foram submetidos à analise de variância e as médias comparadas pelo teste t. Para fêmeas com 10 dias de idade, os dados foram submetidos à analise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

5.2.3.2.2 Efeito da maturação do ovário de *Nezara viridula* ao término do período de pré-cópula

Fêmeas recém-emergidas e com 10 dias de idade, mantidas em diferentes regimes alimentares, foram dissecadas em solução anti-coagulante para a remoção dos ovários e posterior avaliação do estágio de desenvolvimento dos oócitos e do número total de oócitos/ovaríolo em cada um dos tratamentos estudados.

O experimento constituiu de quatro tratamentos e cinco repetições. Os dados do número total de oócitos/ovaríolo foram submetidos à analise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

5.3 Resultados

5.3.1 Alocação de nutrientes em *Nezara viridula* – investimento "capital" vs. "income"

A distribuição do aminoácido glicina enriquecido com o isótopo estável ^{15}N em imaturos e adultos de *N. viridula* indicou que ambos os estágios de desenvolvimento destinam nutrientes para tecidos somáticos e reprodutivos, mas em proporções distintas (Figura 1). Enquanto os nutrientes da fase imatura foram destinados em maior quantidade para o desenvolvimento/manutenção da musculatura de fêmeas, aqueles obtidos na fase adulta foram alocados majoritariamente no ovário e primeiros ovos depositados (Figura 1A). O mesmo padrão

de distribuição de nutrientes da fase ninfal e adulta nos diferentes tecidos avaliados foram observados para machos (Figura 1B). A disponibilidade de ^{15}N em ovos da primeira postura desse percevejo indicou ainda que ambas as fases destinam nutrientes que são alojados ao desenvolvimento de ovos, apesar da fase adulta contribuir praticamente com o dobro de nutrientes que a fase imatura (Figura 1).

Análises comparativas da distribuição relativa dos nutrientes adquiridos nas fases imatura e adulta nos diferentes tecidos analisados indicaram que fêmeas e machos seguem padrão semelhante de investimento de nutrientes (Figura 1). Para ambos os sexos, os nutrientes destinados à reprodução têm sua origem na alimentação da fase adulta (investimento "income"), enquanto o desenvolvimento e manutenção de tecidos somáticos são dados por nutrientes oriundos da fase imatura (investimento "capital") (Figura 1). Fêmeas de *N. viridula* destinaram o dobro de nutrientes para o desenvolvimento de ovos durante a fase adulta do que durante a fase imatura, ocorrendo o inverso em relação à musculatura (Figura 1A). Tanto machos quanto fêmeas destinam nutrientes adquiridos na fase imatura e adulta, em quantidades proporcionais semelhantes ao tecido adiposo (Figura 1).

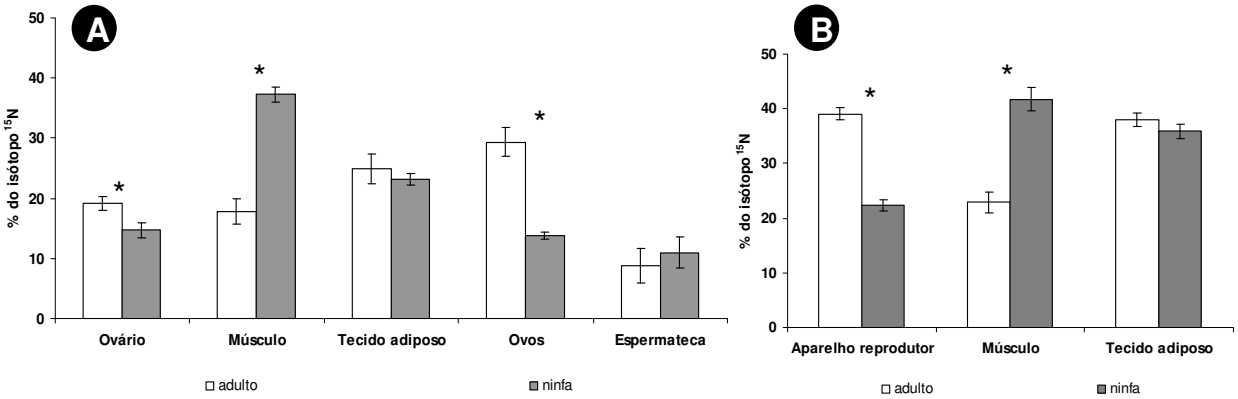

Figura -1 Distribuição relativa (% de ^{15}N) (±EP) de nutrientes adquiridos na fase imatura ou adulta nos diferentes tecidos de fêmeas (A) e machos (B) de *N. viridula*. Barras marcadas com "*" para os gráficos (A) e (B) indicam a existência de diferença entre os valores obtidos para um mesmo tecido, pelo teste t ($P<0,05$)

5.3.2 Efeito da qualidade do alimento nas diferentes fases do desenvolvimento na fisiologia, maturação do ovário e aptidão reprodutiva de fêmeas de *Nezara viridula*

5.3.2.1 Efeito na fisiologia

5.3.2.1.1 Avaliação quantitativa de proteínas da hemolinfa de fêmeas de *Nezara viridula*

A nutrição influenciou a concentração de proteínas totais disponíveis na hemolinfa de fêmeas de *N. viridula* durante o período de formação e desenvolvimento dos oócitos (Figura 2). Interessante foi notar que a quantidade de proteínas totais na hemolinfa de fêmeas recém-emergidas de *N. viridula* foi semelhante a despeito da qualidade do alimento na fase imatura, ou seja, ninfas alimentadas com dieta natural ou artificial deram origem a fêmeas com valores idênticos de proteínas circulantes, não havendo diferença significativa, sendo de 48,5 µg/µl para fêmeas provenientes da criação com dieta artificial e de 45,6 µg/µl para aquelas criadas em deita natural (teste t; F= 1,70; P=0,23).

Porém, surgiram diferenças marcantes nos níveis de proteínas da hemolinfa desses insetos durante o período de maturação sexual, que envolve o desenvolvimento de oócitos e o início do processo de vitelogênese (Figura 2). Apenas as fêmeas que receberam dieta natural em ambas as fases de seu desenvolvimento apresentaram níveis de proteínas no décimo dia de vida superiores àqueles de fêmeas recém-emergidas (Figura 2). Em todos os demais casos em que a dieta artificial foi oferecida a uma das fases de desenvolvimento do inseto, os níveis de proteínas 10 dias após a emergência foram inalterados (dieta natural na fase ninfal e dieta artificial na fase adulta) ou inferiores em relação aos níveis protéicos inicias (Figura 2).

Ao longo do processo de vitelogênese, ficou evidente a interação dos nutrientes armazenados no tecido adiposo durante o desenvolvimento ninfal e aqueles obtidos na fase adulta, visto que apenas as fêmeas alimentadas com dieta natural em ambas as fases do desenvolvimento apresentaram aumento na concentração de proteínas totais da hemolinfa, com níveis de vitelogeninas superiores aos demais tratamentos e ovos corionados ao final do período de pré-cópula (10 dias) (Figuras 2, 4 e 5).

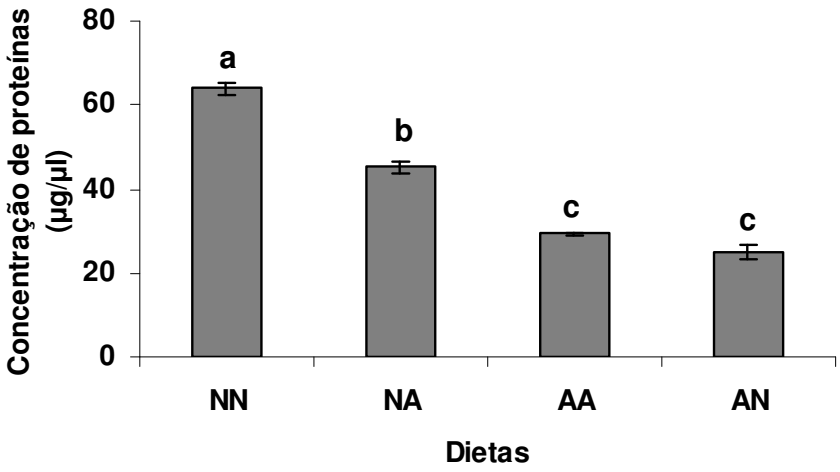

Figura-2 Efeito de diferentes regimes alimentares durante as diferentes fases de desenvolvimento de *Nezara viridula*, na concentração de proteínas totais (µg/µl) (x±EP) na hemolinfa de fêmeas virgens. A - recém-emergidas; B - 10 dias de desenvolvimento (NN - ninfas e adultos alimentados com dieta natural; NA - ninfas alimentadas com dieta natural e adultos com dieta artificial; AA - ninfas e adultos alimentados com dieta artificial; AN - ninfas alimentadas com dieta artificial e adultos com dieta natural) (Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, P>0,05)

5.3.2.1.2 Avaliação quantitativa das vitelogeninas da hemolinfa de fêmeas de *Nezara viridula*

A análise do padrão eletroforético da hemolinfa de fêmeas de *N. viridula*, mantidas em diferentes regimes alimentares na fase imatura e adulta, indicou a ocorrência de variações na disponibilidade de vitelogeninas (Figura 3). Pode-se observar que a abundância de algumas bandas protéicas (ao redor de 35 kDa) em fêmeas recém-emergidas, alimentadas em dieta artificial na fase imatura, foi muito reduzida em relação àquelas alimentadas com dieta natural (Figura 3).

A abundância de vitelogeninas em fêmeas recém-emergidas foi semelhante em ambas as dietas utilizadas na fase imatura, não havendo diferença significativa entre elas (teste t; F=0,39; P= 0,52), mas os níveis de vitelogeninas na hemolinfa de fêmeas aos 10 dias de idade foi extremamente afetado pelo alimento utilizado na fase adulta (Figuras 3 e 4). Após 10 dias de alimentação na fase adulta, a concentração de vitelogeninas na hemolinfa de insetos alimentados com dieta natural em ambas as fases foi muito superior às demais (Figuras 3 e 4).

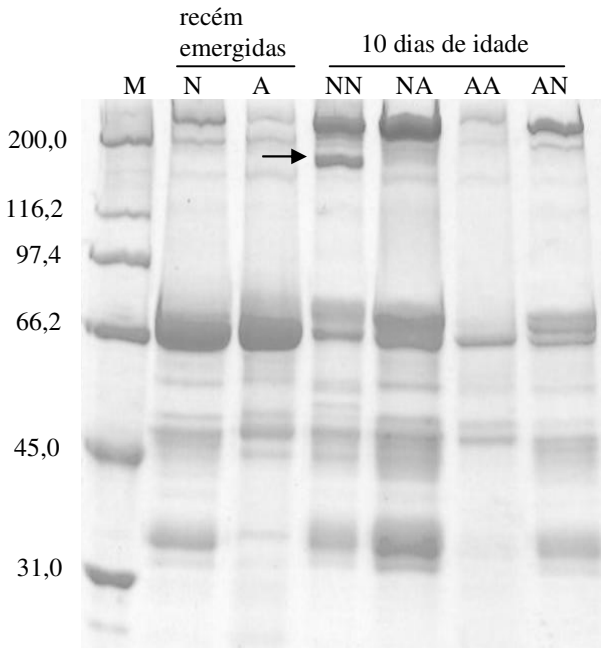

Figura - 3 7,5% SDS-PAGE do padrão protéico da hemolinfa de fêmeas de *Nezara viridula* com diferentes regimes alimentares. Marcador molecular utilizado: broad-range (Bio-Rad Cat. 161-0317; miosina - 200,0 kDa; ß-galactosidase - 116,2 kDa; fosforilase b - 97,4 kDa; soro albumina - 66,2 kDa; ovalbumina - 45,0 kDa; anidrase carbônica - 31,0 kDa). M-Marcador; Hemolinfa de fêmeas recém-emergidas: N - Ninfas alimentadas com dieta natural; A- Ninfas alimentadas com dieta artificial; Hemolinfa de fêmeas com 10 dias de idade: NN - Ninfas e adultos alimentados com dieta natural; NA - Ninfas alimentadas com dieta natural e adultos alimentados com dieta artificial. AA - Ninfas e adultos alimentados com dieta artificial; AN - Ninfas alimentadas com dieta artificial e adultos com dieta natural

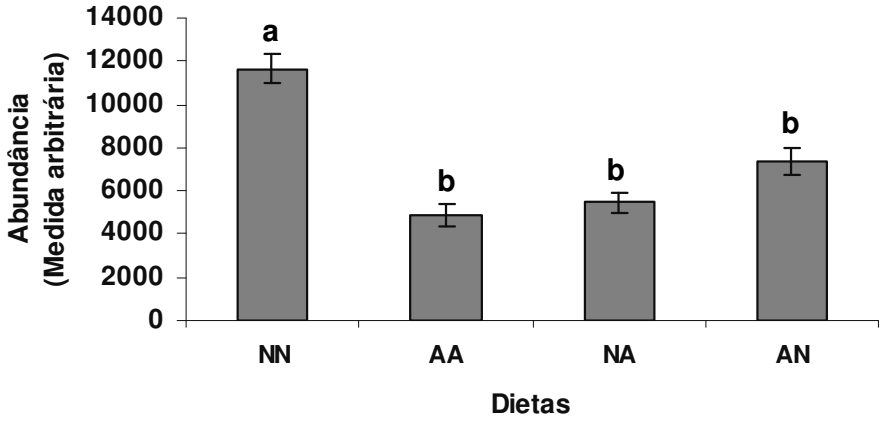

Figura - 4 Abundância das vitelogeninas na hemolinfa de fêmeas de *Nezara viridula* com 10 dias de idade mantidas em diferentes regimes alimentares, determinada a partir da análise do padrão protéico da hemolinfa em 7,5% SDS-PAGE. (NN - ninfas e adultos alimentados com dieta natural; NA - ninfas alimentadas com dieta natural e adultos com dieta artificial; AA - ninfas e adultos alimentados com dieta artificial; AN - ninfas alimentadas com dieta artificial e adultos com dieta natural) (Barras seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, P>0,05)

5.3.2.2 Efeito na maturação do ovário de *Nezara viridula*

Embora o desenvolvimento dos oócitos tenha sido influenciado pelo regime alimentar de ninfas e adultos de *N. viridula* (Figura 5), o número total de oócitos não diferiu significativamente entre os tratamentos, variando de 7,1 a 4,6 oócito/ovaríolo (F= 0,42; P= 0,74; teste de Tukey). Somente fêmeas que se alimentaram em dieta nutricionalmente adequada (dieta natural) em ambas as fases de desenvolvimento (imatura e adulta), apresentaram oócitos corionados aos 10 dias de idade, com cerca de 1,1 oócito por ovaríolo. Fêmeas oriundas de ninfas alimentadas com dieta artificial, mas que receberam dieta natural nos 10 primeiros dias de vida adulta, apresentaram oócitos em fase inicial do processo de coriogênese. No entanto, a alimentação de adultos em dieta artificial não permitiu o desenvolvimento completo dos oócitos, mesmo no caso de fêmeas que se alimentaram com dieta natural na fase imatura. A combinação dieta artificial/dieta artificial foi a que mais afetou o desenvolvimento do ovário de *N. viridula*, com poucos oócitos formados, todos em fase inicial ou intermediária do processo de

vitelogênese. Por outro lado, a combinação dieta artificial/dieta natural permitiu a formação de um grande número de oócitos, com a maioria já na fase inicial de coriogênese (Figura 5).

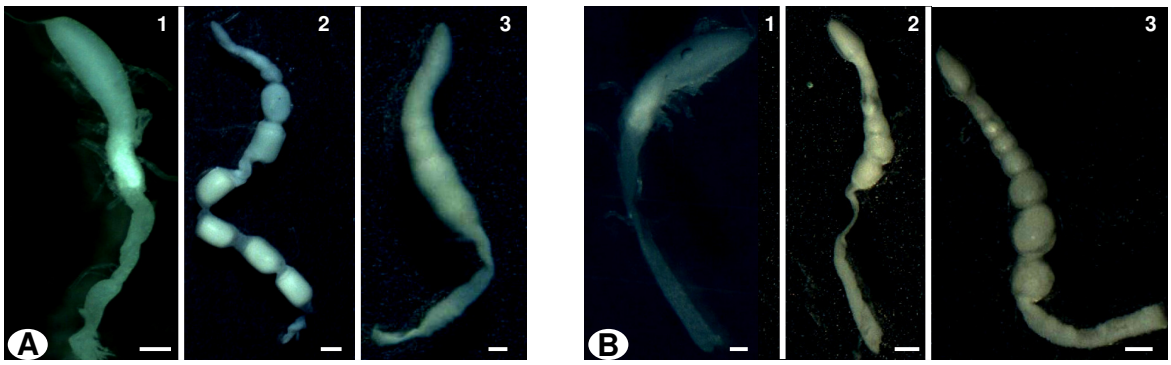

Figura - 5 Ovaríolos de fêmeas virgens mantidas em diferentes regimes alimentares. A – Ovaríolos de fêmeas oriundas de ninfas alimentadas com dieta natural: A1) recém-emergida (0 dia de idade) (Escala = 200 µm); A2) 10 dias de idade, alimentadas com dieta natural (Barra = 500 µm); A3) 10 dias de idade, alimentadas com dieta artificial (Escala = 100 µm); B – Ovaríolos de fêmeas oriundas de ninfas alimentadas com dieta artificial: B1) recém-emergida (0 dia de idade) (Escala = 100 µm); B2) 10 dias de idade, alimentadas com dieta artificial (Escala = 500 µm); 3) 10 dias de idade, alimentadas com dieta natural (Escala = 500 µm)

5.3.2.3 Efeito na aptidão reprodutiva de *Nezara viridula*

As diferentes dietas utilizadas na alimentação de *Nezara viridula* na fase imatura influenciaram o peso dos adultos recém–emergidos sendo que os adultos que receberam dieta nutricionalmente adequada (dieta natural) na fase ninfal foram mais pesados em relação àqueles que se alimentaram em dieta inadequadas (dieta artificial). . O peso do machos criados em dieta natural (119,6 mg) diferiram significativamente daqueles que foram criados em dieta artificial (86,4 mg) (teste t; F= 56,21; P< 0,0001). Padrão semelhante foi observado para as fêmeas (dieta natural= 155,9 mg; dieta artificial = 107,5 mg) (teste t; F= 142,77; P<0,0001), comprovando a menor adequação nutricional da dieta artificial em relação à natural para este percevejo (FORTES et al., 2005).

As diferentes combinações de dietas na fase imatura e adulta afetaram a aptidão biológica e a fisiologia reprodutiva de *N. viridula* (Tabela 1). Insetos que receberam dieta natural

(nutricionalmente adequada) na fase adulta, independentemente do alimento oferecido na fase imatura, renderam fêmeas mais propensas ao acasalamento e a deposição de ovos (Tabela 1).

Tabela 1 - Atividade de acasalamento e oviposição de fêmeas mantidas em diferentes regimes alimentares nas fases imatura e adulta (25±1ºC; 60±10% UR; fotofase 14h)

Dietas*	Número de fêmeas	Fêmeas (%)**	
		Acasalaram	Ovipositaram
NN	31	83,3 ± 6,2 a	80,7 ± 7,0 a
NA	22	68,2 ± 7,6 b	37,5 ± 8,1 b
AA	28	53,6 ± 3,5 b	45,0 ± 7,8 b
AN	21	85,0 ± 7,6 a	85,0 ± 7,6 a

* NN - ninfas e adultos alimentados com dieta natural; NA - ninfas alimentadas com dieta natural e adultos com dieta artificial; AA - ninfas e adultos alimentados com dieta artificial; AN - ninfas alimentadas com dieta artificial e adultos com dieta natural. ** Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). Os dados foram transformados para arcsen√(x/100).

A qualidade do alimento na fase adulta também alterou o padrão comportamental de *N. viridula.* Adultos que receberam dieta natural na fase adulta, independentemente do alimento oferecido na fase imatura, realizaram até seis ou sete cópulas, enquanto aqueles alimentados com dieta artificial copularam no máximo por quatro vezes (Figura 6).

Fêmeas que receberam dieta natural na fase adulta também foram mais fecundas do que aquelas alimentadas com dieta artificial, não havendo, porém, diferenças quanto ao número médio de posturas realizadas e a longevidade (Tabela 2). A alimentação de adultos com dieta artificial (inadequada nutricionalmente) afetou o desempenho reprodutivo desse inseto, mesmo quando a alimentação utilizada na fase imatura foi adequada (dieta natural). A manutenção da dieta artificial em ambas as fases de desenvolvimento de *N. viridula* foi a que mais afetou a aptidão reprodutiva do adulto, influenciando inclusive a fertilidade de fêmeas em relação àquelas alimentadas com dieta natural em ambas as fases de desenvolvimento (Tabela 2).

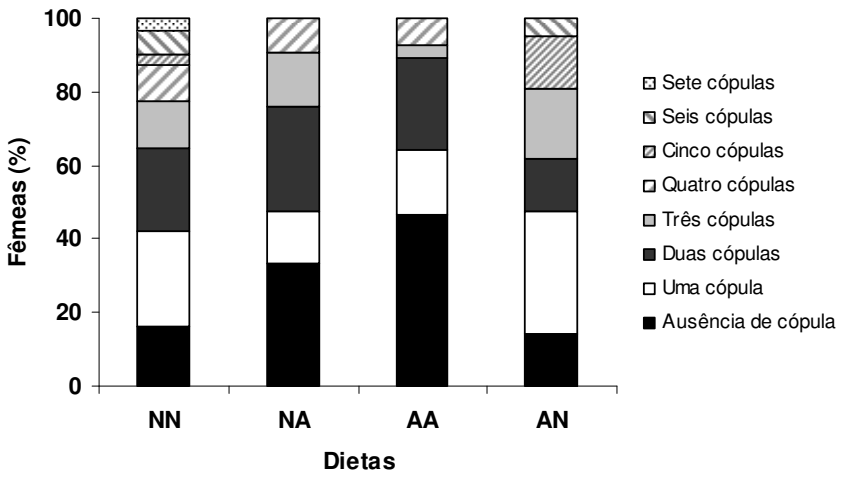

Figura 6 - Freqüência da atividade de cópula de fêmeas de *N. viridula* mantidas em diferentes regimes alimentares nas fases imatura e adulta (25±1ºC; 60±10% UR; fotofase 14h). (NN - ninfas e adultos alimentados com dieta natural; NA - ninfas alimentadas com dieta natural e adultos com dieta artificial; AA - ninfas e adultos alimentados com dieta artificial; AN - ninfas alimentadas com dieta artificial e adultos com dieta natural)

Tabela. 2 Número de posturas (x±EP), fecundidade (x±EP) (ovos/fêmea), fertilidade (%) (x±EP), e longevidade de machos (x±EP) e fêmeas (x±EP) de *N. viridula* mantidas com diferentes regimes alimentares nas fases imatura e adulta (25±1ºC; 60±10% UR; fotofase 14h)

Dietas*	Número de posturas	Fecundidade (ovos/fêmea)	Fertilidade (%)	Longevidade (dias)	
				Macho	Fêmea
NN	2,1 ± 0,2 a	92,8 ± 19,3 a	71,9 ± 4,5 a	28,6 ± 2,9 a	30,6 ± 3,4 a
NA	1,7 ± 0,7 a	20,3 ± 12,1 b	58,2 ± 19,9 ab	34,5 ± 3,0 a	30,0 ± 3,1 a
AA	1,3 ± 0,3 a	11,6 ± 7,6 b	19,4 ± 11,7 b	31,7 ± 2,9 a	32,8 ± 3,4 a
AN	2,4 ± 0,3 a	104,3 ± 5,8 a	63,5 ± 7,4 ab	36,6 ± 3,6 a	30,6 ± 3,4 a

*. NN - ninfas e adultos alimentados com dieta natural; NA - ninfas alimentadas com dieta natural e adultos com dieta artificial; AA - ninfas e adultos alimentados com dieta artificial; AN - ninfas alimentadas com dieta artificial e adultos com dieta natural. Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05). Dados de número de postura transformados para $\sqrt{(x+6)}$, fecundidade para $\sqrt{(x+3)}$, longevidade de machos para $\sqrt{x}$ e de fêmeas para log(x).

5.4 Discussão

Vários fatores estão envolvidos no processo de reprodução, porém o mais importante é a aquisição de recursos nutricionais. Os investimentos destinados à reprodução de insetos podem ser derivados das fases imatura e adulta, dependendo da estratégia reprodutiva dos mesmos (ALCOCK; GWYNNE, 1991; JERVIS; BOGGS; FERNS, 2005). As reservas nutricionais armazenadas durante a fase imatura podem ser destinadas aos processos reprodutivos. Entretanto, outras espécies preferem investir seus nutrientes adquiridos durante a fase ninfal para o crescimento de tecidos somáticos e de estruturas de reserva para a sobrevivência de adultos. Assim, o sucesso reprodutivo de algumas espécies será dependente da aquisição de nutrientes pelo adulto, seja ela via alimentação ou pela absorção de nutrientes transferidos à fêmea via cópula, os quais serão destinados ao desenvolvimento de oócitos (BOGGS, 1997; JERVIS; BOGGS; FERNS, 2005). *N. viridula* apresenta investimento do tipo "income", baseando sua reprodução em recursos nutricionais adquiridos na fase adulta, apesar de certa contribuição da fase imatura ao desenvolvimento reprodutivo deste inseto.

A síntese de proteínas responsáveis pelo desenvolvimento dos oócitos, as vitelogeninas, é realizada pelo tecido adiposo, sendo as mesmas transportadas posteriormente pela hemolinfa até os ovários, onde ocorre sua incorporação aos oócitos via endocitose mediada por receptores (ADAMS, 1997, 1999; HAGEDORN et al., 1998). A ausência das mesmas na hemolinfa de insetos que receberam dieta artificial em pelo menos uma das fases de desenvolvimento, indica que a sua síntese é dependente da aquisição de nutrientes em níveis adequados na fase adulta.

O desenvolvimento do ovário em fêmeas sinovigênicas pode ocorrer pela utilização de reservas nutritivas adquiridas na fase imatura, as quais se encontram armazenadas no tecido adiposo, mas principalmente de nutrientes adquiridos via alimentação na fase adulta (WHEELER, 1996; ADAMS, 2000; JERVIS; BOGGS; FERNS, 2005). Fêmeas de *N. viridula* são sinovigênicas, sendo de extrema necessidade o acesso a alimentos ricos em nutrientes durante a fase adulta para garantir seu sucesso reprodutivo. Assim como nos demais insetos que necessitam adquirir nutrientes via alimentação na fase adulta para a sustentação do processo reprodutivo, a qualidade e quantidade do alimento influenciam diretamente a vitelogênese e o processo de oogênese em Heteroptera (ADAMS, 1997). Para *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophiladae), as fêmeas com restrição alimentar na fase adulta não investem os nutrientes

adquiridos nesta fase para a reprodução, mas sim na manutenção das atividades metabólicas dos tecidos, sendo inclusive mais longevas em relação àquelas sem restrição alimentar (O'BRIEN et al., 2008). Para *Podisus maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae) a fonte nutricional das ninfas tem papel importante no desenvolvimento dos ovários, principalmente na formação dos folículos pré-vitelogênicos. A fonte de alimento dos adultos torna-se importante durante o processo de vitelogênese, enquanto todo o processo reprodutivo, incluindo a fecundidade e sobrevivência dos descendentes, é afetado pela interação dos nutrientes adquiridos nas fases imatura e adulta (WHEELER, 1996; WITTMEYER; COUDRON, 2001).

O efeito das diferentes dietas nos parâmetros biológicos de *N. viridula* pode ser explicado pela dificuldade do inseto em acumular nutrientes, visto que a qualidade nutricional do alimento influencia a capacidade de hemípteros sugadores de sementes em estocar reservas nutricionais (lipídeos) durante a fase imatura (PANIZZI, 2009), tendo sido observado que a nutrição inadequada durante esta fase prolonga o período de desenvolvimento, diminui na taxa de crescimento e no peso dos adultos, com, consequente redução na fecundidade (PANIZZI et al., 2000; FORTES et al., 2006; PANIZZI et al., 2007).

Assim como esperado para um inseto sinovigênico (BOGGS 1997), a utilização de dietas nutricionalmente adequadas na fase adulta se mostrou eficiente na recuperação dos desbalanços nutricionais ocasionados pela alimentação em substrato inadequado na fase ninfal em *N. viridula.* A capacidade de recuperação do potencial reprodutivo desse inseto, após o oferecimento de alimento adequado na fase adulta, está diretamente ligada à sua estratégia de reprodução, que conta primordialmente com os nutrientes advindos da fase adulta, assim como observado para *Podisius maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae) e *Macrolophus caliginosus* (Hemiptera: Miridae) (WITTMEYER; COUDRON; ADAMS, 2001; VANDEKERKHOVE et al., 2006).

A cópula envolve gasto de energia, sendo que o aumento da freqüência de cópula leva ao aumento dos custos associados ao tempo e energia gastos durante esse processo (DALY, 1978; WATSON; ARQNVIST; STALLAMAN, 1998). Quando o regime alimentar não é adequado, o comportamento e freqüência de cópula podem ser afetados. A dieta rica em nutrientes para *D. melanogaster* resultou em maior aptidão para as fêmeas, havendo interação entre nutrição e exposição das fêmeas aos machos, sendo que fêmeas mais nutridas tiveram maior freqüência de cópulas (CHAPMAN; PATRIDGE, 1996). Uma vez que o acasalamento envolve custos, adultos de *N. viridula* que tiveram alimentação pobre em nutrientes durante a fase adulta, a freqüência de

fêmeas que acasalaram e ovipositaram foram reduzidas. Assim como a nutrição influencia a freqüência de cópula, a oviposição também foi influenciada pelo regime alimentar. *N. viridula* e *Dichelops melacanthus* (Hemiptera: Pentatomidae) sofreram redução na porcentagem de oviposição quando alimentados com dieta artificial (FORTES et al., 2006; PANIZZI et al., 2007).

Para insetos expostos à restrição alimentar, a fecundidade pode diminuir. Para compensar esta carência de nutrientes, pode ocorrer a reabsorção de oócitos e os nutrientes são realocados para a manutenção dos tecidos somáticos (BROUGH; DIXON, 1990). Porém, nosso estudos indicam a possibilidade de oosorção apenas em fêmeas com 17 dias de idade, quando as mesmas foram privadas de acasalar (cap. 3), não havendo qualquer indicação de oosorção em resposta a nutrição.

5.5 Conclusões

Nezara viridula investe os nutrientes da fase imatura principalmente para a manutenção e desenvolvimento de tecidos somáticos (músculos), enquanto os nutrientes adquiridos na fase adulta são destinados primordialmente à reprodução (ovário/aparelho reprodutor masculino);

O acesso a fontes nutricionais adequadas na fase adulta é fundamental ao processo reprodutivo em *N. viridula*;

O acesso a alimentos nutricionalmente adequados na fase adulta pode reverter os efeitos nocivos da nutrição inadequada na fase ninfal no processo de reprodução de *N. viridula*;

A alimentação de adultos em dieta artificial reduz a aptidão de fêmeas de *N. viridula* para a cópula e a fecundidade, mas não a fertilidade e longevidade de adultos;

A alimentação de adultos e/ou ninfas em dieta artificial atrasa o processo de vitelogênese e a maturação do ovário de *N. viridula*, reduzindo a disponibilidade de proteínas totais e de vitelogeninas na hemolinfa.

Referências

ADAMS, T.S. Arthopoda-Insecta. In: ADAMS, T.S. (Ed). **Reproductive Biology of Invertebrates. Progress in Reproductive Endocrinology**, Wiley, New York, v.8, p.277-338, 1997.

ADAMS, T.S. Hematophagy and hormone release. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v.92, p.1-13, 1999.

ADAMS, T.S. Effect od diet and mating status on ovarian development in a predaceous stink bug *Perillus bioculatus* (Hemiptera: Pentatomidae). **Annals of Entomological Society of America,** Columbus, v.93, n.3, p.529-535, 2000.

ALCOCK, J.; GWYNNE, D.T. Evolution of insect mating system: the impact of individual selectionist thinking. In: BAILEY, W.J.; RIDSDILL-SMITH,J. (Ed.). **Reproductive behavior of insects.** London: Chapman & Hall, 1991. p 11-36.

BOGGS, C.L. Dynamics of reproductive allocation from juvenile and adult feeding: radiotracer studies. **Ecology**, Washington, v.78, p.192-202, 1997.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, 1976.

BROUGH, C.N.; DIXON, A.F.G. The effects of starvation on development and reproductive potential of apterous virginoparae of vetch aphid, *Megoura viciae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 55, n.1, p. 41-45, 1990.

CHAPMAN, T.; PARTRIDGE, L. Female Fitness in *Drosophila melanogaster*: An Interaction between the Effect of Nutrition and of Encounter Rate with Males. **Proccedings of the Royal Society of London,** London, Series B, v. 263, p. 755-759, 1996

CÔNSOLI, F.L.; CONTI, E.; DANGOTT, L.J.; VINSON, S.B. In vitro culture of the teratocytes od Trissolcus basalis (Hymenoptera, Scelionidae) and their requirements for host-derived components. **Biological Control**, Orlando, v.22, p.176-184, 2001.

CÔNSOLI, F.L., BRANDT, S.L., COUDRON, T.A., VINSON, S.B. Host regulation and release of parasitism-specific proteins in the system *Toxoneuron nigriceps–Heliothis virescens*. **Comparative Biochemistry and Physiology,** Oxford**,** v. 142B, p. 181–191, 2005.

DALY, M. The cost of mating. **American Naturalist**, Chicago, v. 112, p. 771-774, 1978

FORTES, P.;MAGRO, S. R.; PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. Development of a dry artificial diet for *Nezara viridula* (L.) and *Euschistus heros* (Fabricius) (Heteroptera: Pentatomidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v.35, p.567-572, 2006.

HAGEDORN, H.H.;MADDISON, D.R.;TU, Z. The evolution of vitellogenins, cyclorrhaphan yolk proteins and related molecules. **Advances in Insect Physiology**, San Diego, v.27, p. 335-384, 1998.

JERVIS, M.A.; HEIMPEL, G.E.; FERNS, P.N.; HARVEY, J.A.; KIDD, N.A.C. Life-history strategies in parasitoid wasps: a comparative analysis of ovigeny. **Journal of Animal Ecology**, Oxford, v. 70, p. 442-458, 2001.

JERVIS, M.A.; BOGGS, C.L.; FERNS, P.N. Egg maturation strategy and it is associated trade-off: a synthesis focusing on Lepidoptera. **Ecological Entomology**, London, v.30, p. 359-375, 2005.

LAEMMLI, U.K.Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. **Nature**, London, v. 227**,** p. 680-685, 1970.

MASASHI HOTTA, T.; OKUDA, T.T. *Cotesia Kariya* teratocytes: growth and development**.** **Journal of Insect Physiology**, London, v. 47, n.1, p. 31-41, 2001.

O'BRIEN, D.; MIN, K.; LARSEN, T.; TATAR, M. Use of stable isotopes to examine how dietary restriction extends Drosophila lifespan. **Current Biology**, London, v.18, n. 4, p. 155-156, 2008.

PANIZZI, A.R.; SILVA, F.A.C. Insetos sugadores de sementes (Heteroptera). In: PANIZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (ed.). **Bioecologia e nutrição de insetos. Base para o manejo integrado de pragas**. 1 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v. 1, p. 465-523, 2009

PANIZZI, A.R; PARRA, J.R.P.; SANTOS, C.H.; CARVALHO, D.R. Rearing the southern green stink bug using na artifical diet and an artifical plant. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, p.1709-1715, 2000.

PANIZZI, A.R.; DUO, L.J.S; BORTOLATO, N.M.; SIQUEIRA. Nymph developmental and survivorship, adult longevity, reproduction and body weight of *Dichelops melacanthus* (Dallas) feeding on natural and artificial diets. **Revista Brasileira de Entomologia**, Curitiba, v. 51, n. 4, p. 484-488, 2007.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality. **Biometrika,** London, v.52, n.34, p.591-561, 1965.

VANDEKERKHOVE, B.; VAN BAAL, E.; BOLCKMANS, K.; DE CLERCQ, P. Effect of diet and mating on development and oviposition n the polyphagous predator *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae). **Biological Control**, Orlando, v.39, p.532-538, 2006.

WATSON, P.J.; ARQNVIST, G.; STALLMAN, R.R. Sexual conflict and the energetic cost of mating and mate choice in water striders. **American Naturalist**, Chicago, v. 141, p. 440-465, 1998.

WHEELER, N. Mate quality affects reproductive effort in a paternally investing species. **American Naturalist,** Chicago, v. 148, p. 1075-1088, 1996.

WITTMEYER, J.L.; COUDRON, T.A. Life table parameters, reproductive rate, intrinsic rate of increase and realized costs of rearing *Podisus maculiventris* (Say) (Heteroptera: Pentatomidae) on an artificial diet. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 94, p.532-538, 2001.

WITTMEYER, J.L., COUDRON, T.A.; ADAMS, T. Reproductive development in the predacious spined soldier bug *Podisus maculiventris* (Say) (Heteroptera: Pentatomidae) on an artificial diet. **Invertebrate Reproduction and Development**, Rehovot, v.39, p.9-20, 2001.

6 BACTERIOFAUNA FACULTATIVA ASSOCIADA À VESÍCULA SEMINAL DE MACHOS DE *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) E O SEU EFEITO NA FECUNDIDADE DE FÊMEAS

Resumo

Este trabalho teve por objetivo identificar os simbiontes facultativos associados à vesícula seminal de machos de *Nezara viridula* (L., 1758) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE), a ocorrência e intensidade de infecção em machos virgens e acasalados de indivíduos oriundos de populações de laboratório e de campo, além de investigar o efeito desses simbiontes na capacidade reprodutiva de fêmeas deste percevejo. Foi verificada uma rica diversidade de bactérias cultiváveis associadas à vesícula seminal de *N. viridula*, baseando-se em análises de seqüências do 16S rDNA. Análises comparativas das seqüências obtidas com aquelas depositadas nos bancos de dados do GenBank e SIMO RDP, agruparam os diferentes morfotipos encontrados na vesícula de machos em quatro diferentes classes de bactérias: γ-Proteobacteria (Enterobacteriaceae), Bacilli (Bacillaceae e Staphylococcaceae), Actinobacteria (Microbacteriaceae) e Flavobacteria (Flavobacteriaceae), sendo cada família representada por um único gênero de bactéria. Três dos morfotipos selecionados, IIL-NV5 e IIL-NV7, semelhantes a *Klebsiella*, e IIL-NV9, a *Bacillus* (IIL-NV9), são distintos o suficiente para sugerir o seu posicionamento como novas espécies. A presença de bactérias associadas à vesícula seminal masculina é de ocorrência natural e não um artefato da criação em condições de laboratório, visto que insetos coletados no campo apresentaram-se infectados. No entanto, a ocorrência de simbiontes em insetos mantidos em laboratório foi muito superior àquela de indivíduos coletados no campo. A freqüência e abundância de bactérias da vesícula seminal de machos foram variáveis dependendo da origem dos adultos e da experiência sexual. A ocorrência dessas bactérias não afetou a capacidade de inseminação de machos e nem o desempenho reprodutivo de fêmeas. O papel desta associação na aptidão biológica de machos infectados ainda permanece desconhecido.

Palavras-chave: Simbionte; Aparelho reprodutor; Capacidade reprodutiva

FACULTATIVE BACTERIOFAUNA ASSOCIATED THE SEMINAL VESICULAR OF MALE OF *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE) AND ITS EFFECT ON FERTILITY OF FEMALE

Abstract

This study aimed to identify the bacteriofauna associated with the seminal vesicle of males of *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE). Additionaly, we investigated the occurrence and intensity of infection in virgin and mated males of individuals from laboratory and field populations, besides investigating the effect of these symbionts on the reproductive capacity of females. A rich diversity of culturable bacteria associated with the seminal vesicle of *N. viridula* was found, based on analysis of 16S rDNA sequences. Analysis of the obtained sequences compared with those stored at the GenBank and SIMO RDP databases, grouped the different morphotypes associated with the seminal vesicles of males into four

different classes of bacteria: γ-Proteobacteria (Enterobacteriaceae), Bacilli (Bacillaceae and Staphylococcaceae), Actinobacteria (Microbacteriaceae) and Flavobacteria (Flavobacteriaceae), with each family represented by a single genus of bacteria. Three of the selected morphotypes, IIL-NV5 and IIL-NV7, similar to *Klebsiella* and IIL-NV9, to *Bacillus* (IIL-NV9), are distinct enough to suggest their positioning as new species. The presence of bacteria associated with the male seminal vesicle is a natural occurrence and not an artifact created in laboratory conditions, once infection was also observed in insects collected in the field. However, the occurrence of symbionts in laboratory-maintained insects was much higher than that in the field colleted ones. The frequency and abundance of bacteria in the seminal vesicle of males varied depending on the origin and the adult mating. The occurrence of these bacteria affected neither the insemination capacity of males nor the reproductive performance of females. The role of this association in the fitness of infected males remains unknown.

Key words: Symbiont; Reproductive system; Reproductive capacity

6.1 Introdução

A simbiose é um importante veículo para a evolução e a diversidade ecológica, aumentando o número de habitats aceitáveis para a vida (WERNEGREEN, 2002). Entre os organismos multicelulares, os insetos formam um grupo com grande diversidade de hábitos alimentares, sendo parte desta diversidade atribuída aos microrganismos a eles associados (BOURTZIS; MILLER, 2008). Vários insetos apresentam relações de simbiose das mais diversas com microrganismos, que podem ser facultativas ou obrigatórias, resultando em interações neutras, de mutualismo ou patogênicas. As interações em que as associações são obrigatórias normalmente levam a relações de mutualismo, enquanto aquelas associações facultativas podem resultar em relações bastante variáveis, que podem envolver custos adaptativos, levando à redução da aptidão biológica do hospedeiro, no caso, o inseto (DIXON, 1998; WERNEGREEN, 2002).

As relações de mutualismo envolvem simbiontes obrigatórios, os quais são transmitidos verticalmente e resultam em alto grau de dependência entre hospedeiro e simbionte. A ocorrência deste tipo de simbiose está normalmente associada à disponibilização de nutrientes encontrados em concentrações inadequadas na dieta natural de seus hospedeiros, influenciando, assim, a aptidão biológica dos mesmos (DOUGLAS, 1996; WERNEGREEN, 2002; MORAN; DUNBAR, 2006). Já os simbiontes facultativos podem ser transmitidos vertical ou horizontalmente, distribuindo-se por diferentes tecidos do hospedeiro. Estes simbiontes podem influenciar i) o sistema imune de seus hospedeiros, tornando-os mais resistentes a parasitóides e patógenos, ii) a

resistência do hospedeiro a fontes de estresse, iii) o comportamento de seleção hospedeira e iv) contribuir de forma negativa ou positiva para a capacidade reprodutiva do hospedeiro (CHEN et al., 2000; GOEBEL; GROSS, 2001; OLIVER et al., 2003; HAINE 2008).

Apesar da grande maioria dos simbiontes essenciais serem obrigatoriamente endocelulares, inúmeros simbiontes que habitam o espaço extracelular também podem influenciar a aptidão biológica de seus hospedeiros de forma positiva (OLIVER et al. 2003; TSUCHIDA; KOGA; FUKATSU, 2004, FERRARI et al. 2004). No entanto, também são os simbiontes extracelulares aqueles que mais comumente assumem interações patogênicas com seus hospedeiros, como aqueles que induzem doenças sexualmente transmissíveis. Entre estes simbiontes, encontram-se principalmente os vírus, protozoários, fungos, helmintos e outros artrópodes, como o ácaro *Coccipolipus hippodamia* (Acari: Podapolipidae) (KNELL; WEBBERLEY, 2004; WEBBERLEY, et al. 2006). Assim, insetos que realizam várias cópulas são mais propensos a adquirirem agentes infecciosos transmitidos sexualmente e que podem resultar na redução da aptidão reprodutiva de adultos, afetando a dinâmica populacional do inseto, apresentando, assim, potencial como agentes de controle biológico (KNELL; WEBBERLEY, 2004).

Independentemente da natureza da associação inseto-simbionte, simbiontes tem sido alvo de estudos intensos para sua utilização como ferramenta para o desenvolvimento de novas estratégias de manejo de insetos-praga, de vetores ou de doenças por eles transmitidas (COSTA et al., 1997; DURVASULA et al., 1997; BEARD; DURVASULA; RICHARDS, 1998; BEXTINE et al., 2004). Os sugadores de seiva da ordem Hemiptera apresentam associações diversas com simbiontes (MORAN et al., 1993; FUKATSU; HOSOKAWA, 2002; BAUMANN, 2005; HOSOKAWA et al., 2006), indicando a possibilidade de exploração desses simbiontes no desenvolvimento de novas ferramentas para o controle de percevejos-praga.

Entre os sugadores de plantas, os pentatomídeos se destacam pela diversidade de espécies-pragas e pela importância que as mesmas assumem em diversos agroecossistemas, seja como causadores de danos diretos ou indiretos (PANIZZI et al., 2000). No Brasil, *Nezara viridula* (L., 1758) (Hemiptera: Pentatomidae) se destaca como uma das mais importantes pragas-agrícolas visto os danos que pode causar à soja, importante cultura no agronegócio nacional. Esse percevejo apresenta várias bactérias simbiontes associadas ao seu trato digestivo, mas ao contrário de outros Pentatomidae, estes simbiontes parecem não exercer qualquer efeito no

desenvolvimento e reprodução do inseto (HIROSE et al. 2006; PRADO et al., 2009). No entanto, há ainda indicações na literatura que apontam a existência de bactérias habitando a vesícula seminal de machos, sem qualquer indicação da relação das mesmas com seu hospedeiro (MALOUF, 1933). Assim, este trabalho teve por objetivo isolar, identificar e caracterizar os simbiontes associados à vesícula seminal de machos de *N. viridula,* assim como verificar se os mesmos poderiam reduzir a aptidão reprodutiva de fêmeas acasaladas com machos infectados, atuando, desta forma, como uma doença sexualmente transmissível.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Criação de *Nezara viridula*

Adultos de *N. viridula* foram acondicionados em gaiolas (50 x 50 x 70 cm) recobertas com tela anti-afídeo e mantidos em condições controladas (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14 horas), segundo CORRÊA-FERREIRA (1985). Os percevejos foram alimentados com sementes de amendoim coladas a tiras de papel (15 x 3 cm) e frutos de ligustro, *Ligustrum lucidum*, como suplemento alimentar (CORRÊA-FERREIRA, 1993). Água foi oferecida em algodão hidrófilo embebido no interior de placas plásticas. As posturas foram recolhidas diariamente e acondicionadas em câmaras climatizadas (25±1°C; 60±10% UR; fotofase de 14 horas) até a eclosão das ninfas, as quais foram criadas em placas gerbox (11 x 11 x 3 cm) até o início do 4º ínstar, quando foram transferidas para gaiolas de criação. A alimentação das ninfas foi idêntica àquela dos adultos.

6.2.2 Determinação da ocorrência, freqüência e densidade de simbiontes em machos virgens e acasalados da população estoque e na população natural de *Nezara viridula*

Para se avaliar a ocorrência natural de bactérias associadas à vesícula seminal e o efeito da cópula na infecção de machos, machos virgens e acasalados de *N. viridula* mantidos em laboratório e coletados no campo foram dissecados em condições assépticas para remoção da vesícula seminal e posterior isolamento e cultivo das bactérias associadas a esta estrutura. Para isso, os insetos foram esterilizados superficialmente em 70% etanol por 5 min, lavados em água

Milli-Q estéril e dissecados em solução salina estéril NaCl 0,85% para a remoção asséptica da vesícula seminal. A vesícula dissecada foi lavada (3x) em solução salina 0,85% estéril e transferida para 300 µl de solução salina estéril. A vesícula foi rompida para a liberação do seu conteúdo, agitada em vórtex para a homogeneização da mistura e diluições seriais foram utilizadas para o plaqueamento e cultivo de bactérias em meio de agar nutriente a 28°C, durante 16 h, para posterior determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por vesícula seminal (= inseto).

A ocorrência natural de bactérias associadas à vesícula seminal de *N. viridula* foi investigada coletando-se indivíduos imaturos de último ínstar (n = 11) e adultos em campo (n = 24), os quais foram trazidos ao laboratório para a coleta da vesícula seminal. Adultos foram dissecados imediatamente e a vesícula seminal processada como descrito anteriormente para os indivíduos do laboratório. As ninfas de último ínstar foram mantidas em gaiolas e alimentadas até a emergência de adultos, utilizando método descrito no item 6.2.1, quando os mesmos foram processados. Para insetos virgens provenientes de campo e laboratório, a vesícula seminal foi extraída de machos com 10 dias de idade. Para os adultos capturados em campo, a vesícula foi extraída imediatamente após a coleta, enquanto que os insetos copulados em criação de laboratório foram amostrados imediatamente após a cópula.

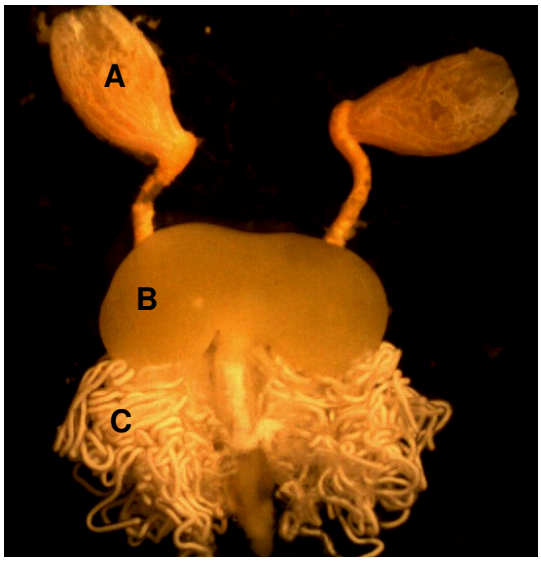

Figura 1 - Aparelho reprodutor masculino de *Nezara viridula*. A - Testículo; B - Vesícula seminal; C - Glândulas acessórias

6.2.3 Cultivo e isolamento de simbiontes associados à vesícula seminal de *Nezara viridula*

A vesícula seminal de machos de *N. viridula* foi dissecada em condições estéreis após a desinfecção externa de machos em solução de 0,5% de hipoclorito de sódio em 70% etanol. A vesícula foi removida, transferida para 300 µL de solução salina estéril a 0,85%, onde foi rompida para liberação de seu conteúdo e a mistura agitada em vórtex. Após a agitação, diluições seriais foram plaqueadas em meio ágar nutriente e cultivadas a 28ºC, por até 24 h. Após o crescimento, colônias foram separadas baseadas em suas características morfológicas, inoculadas em meio LB líquido e cultivadas a 28°C por 24 horas, sob agitação constante. Após o período de crescimento, alíquotas foram retiradas para preservação da linhagem em meio LB+glicerol a -80°C, sendo o restante da cultura utilizado para a extração de DNA genômico.

6.2.4 Caracterização molecular dos simbiontes

Colônias das bactérias cultivadas em ágar nutriente foram tocadas com alça de platina, previamente esterilizada, e mergulhada em 50 µl de água Milli-Q estéril. Posteriormente, a solução foi aquecida a 100 °C por 5 minutos e mais 50 µl de água estéril foram adicionados à mistura. Essas amostras foram utilizadas para a amplificação de fragmento da região 16S do rDNA em reações de PCR, utilizando o conjunto de iniciadores 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', posições 8 – 27 de *Escherichia coli*) e 1491R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', posições 1509 – 1491 de *E. coli*), em reação programada a 95°C por 4 min (1 ciclo), seguida de 35 ciclos a 95°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 2 min, com extensão final a 72°C por 10 min (RIVAS et al. 2001). Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) a 5V/cm e visualizados em transiluminador após coloração com 50 µg/ml de brometo de etídio.

As reações que produziram fragmento único, de tamanho esperado (cerca de 1.300 pb) foram purificadas em etanol adicionando um décimo do volume do produto de amplificação de acetato de sódio 3M (pH 7) e duas vezes o volume de etanol 95% gelado, seguido de agitação vigorosa. As amostras foram incubadas a -20 °C durante 24 horas. Posteriormente foram centrifugadas a 14000 *g* por 10 minutos. Após este processo todo o sobrenadante foi removido e

adicionou 500 µl de etanol 80% gelado, seguido de duas novas centrifugações (14000 *g* x 5 min). O etanol foi removido, o pellet de DNA foi exposto a temperatura ambiente para secar e, em seguida, ressuspenso em 20 µl de água Milli-Q (DAVIS; KUEHL; BATTEY, 1994).

Os amplicons purificados foram submetidos à análise de RFLP ("restrition fragment lenght polimorphysm") utilizando-se das enzimas de restrição *RsaI*, *HinfI* e *DdeI*. As reações de restrição foram conduzidas a 37°C, por 24 h, no tampão específico da enzima. Após o período de restrição, os fragmentos foram separados em gel de agarose a 1,5%, sendo o padrão de digestão obtido visualizado em transluminador após coloração do gel com brometo de etídio (50 µg/ml). Isolados que produziram padrões de restrição distintos foram selecionados para posterior sequenciamento bidirecional do amplicon da região do 16S rDNA obtido. O sequenciamento foi realizado pelo Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG), UNICAMP. As seqüências obtidas foram sujeitas a análises comparativas com aquelas existentes no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando-se da ferramenta de busca BLASTn. As seqüências obtidas também foram submetidas à análise comparativa com linhagens tipos e não-tipo depositadas no banco de dados SIMO RDP Agent ('Sapelo Island Microbial Observatory – Ribossomal Database Project') (http://simo.marsci.uga.edu/public_db/). Os acessos aos bancos de dados foram feitos em Novembro de 2009.

6.2.5 Análise filogenética

As seqüências obtidas foram alinhadas usando o programa MEGA 4.0 (TAMURA; DUDLEY; NEI, 2007) e trimadas manualmente antes de proceder à análise filogenética. As relações filogenéticas foram inferidas usando o método de máxima verossimilhança (ML) como critério (FELSENSTEIN, 1981). O modelo de substituição de nucleotídeos mais apropriado foi o 'General Time Reversible (GTR+I+G)' (LANAVE *et al.*, 1984), selecionado pelo 'Akaike Information Criterion (AIC)', usando o programa MrMTgui 1.0 (NUIN, 2008). O pacote PHYML foi usado em todas as análises (GUIDON; GASCUEL, 2003). A topologia das árvores obtidas foi avaliada pela análise de 'bootstrap' (FELSENSTEIN, 1985) no método 'neighbor-joining' (NJ), baseado em 1000 pseudo-repetições usando os programas SEQBOOT e CONSENSE, existentes no pacote PHYML (GUIDON; GASCUEL, 2003).

6.2.6 Efeito das bactérias simbionte associadas à vesícula seminal na reprodução de *Nezara viridula*

A capacidade de patogenicidade das bactérias simbiontes associadas à vesícula seminal de machos de *N. viridula* foi investigada avaliando-se o efeito das mesmas na reprodução deste inseto. Para tanto, machos recém-emergidos foram alimentados com solução a 2% de antibiótico-antimicótico (10.000 unidades/ml de penicilina G, 10 mg/ml de sulfato de estreptomicina e 25 mg/ml anfotericina B) (Sigma-Aldrich), acrescida à água durante todo o período correspondente à pré-cópula (dez dias) (COSTA, 1991). Posteriormente, casais foram individualizados em recipientes de 300 ml e alimentados assim como descrito anteriormente (item 6.2.1). Visto que a capacidade reprodutiva máxima das fêmeas pode ser obtida mesmo após uma única cópula (ver capítulo 4), os machos de *N. viridula* foram removidos logo após o término da cópula. Para a confirmação da eficiência do tratamento com antibiótico na eliminação das bactérias da vesícula seminal, machos tratados foram dissecados após a cópula e os fluídos da vesícula seminal coletados e plaqueados como descrito anteriormente (item 6.2.3).

O efeito do simbionte na reprodução desse inseto foi avaliado comparando-se a capacidade reprodutiva de fêmeas copuladas com machos tratados com antibióticos e aqueles não-tratados, infectados por bactérias, observando a fecundidade, fertilidade e longevidade das fêmeas. Cada tratamento constituiu de diferentes repetições, sendo realizadas 37 repetições para machos tratados com antibiótico e 35 para machos sem antibiótico. Cada casal foi considerado uma repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade. Os dados para fecundidade foram corrigidos para log x e longevidade das fêmeas para $\sqrt{x}$.

6.3 Resultados

6.3.1 Determinação da ocorrência, freqüência e intensidade de infecção da vesícula seminal de *Nezara viridula* por bactérias simbiontes

Bactérias associadas à vesícula seminal de machos de *N. viridula* foram encontradas em machos coletados a campo e obtidos de criação de laboratório. Entretanto, a freqüência e abundância dessas bactérias foram variáveis dependendo da origem dos adultos e da experiência sexual de machos (virgem ou acasalado), principalmente para os insetos mantidos em condições de laboratório.

A freqüência de infecção da vesícula seminal em machos de laboratório foi de 81%, muito superior aos 34,3% encontrado para machos coletados a campo (teste t; F=17,90; P<0,001). Para os insetos criados em laboratório, foi verificado que machos copulados apresentaram 100% de infecção diferindo significativamente dos virgens, que apresentaram 58% de infecção (teste t; F= 15,00; P< 0,001). Já para os insetos provenientes de campo, a maior porcentagem de infecção foi para os machos virgens (72,7%) diferindo significativamente dos adultos coletados em campo (16,6%) (teste t; F=10,48; P< 0,001).

Assim como a freqüência de bactérias variou em função da origem e experiência sexual, o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi distinto para insetos de criados em laboratório. Insetos acasalados apresentaram $7{,}0 \times 10^3$ UFC, diferindo significativamente dos virgens que apresentaram $5{,}5 \times 10^2$ UFC (teste t; F=169,60; P<0,00001). Entretanto, para insetos coletados em campo, o número de unidades formadoras de colônia para indivíduos virgens e adultos foi próximo. Machos virgens apresentaram $4{,}7 \times 10^2$ UFC, enquanto os adultos cerca de $6{,}0 \times 10^2$ UFC (teste t, F=0,45; P=0,52).

6.3.2 Freqüência de infecção, isolamento caracterização molecular de bactérias simbiontes associadas à vesícula seminal de *Nezara viridula*

Sessenta e nove isolados de bactérias associadas à vesícula seminal de *N. viridula* foram recuperados de placas ágar nutriente para análises de PCR-RFLP do gene 16S rDNA. Análises dos padrões de restrição obtidos resultaram na identificação de 10 morfotipos (Tabela 1). A análise comparativa dos cerca de 1300 pb obtidos para a região 16S do rDNA para os morfotipos isolados da vesícula seminal de *N. viridula* com seqüências depositadas nos bancos de dados do GenBank e SIMO RDP, permitiu agrupar os morfotipos selecionados em quatro diferentes classes de bactérias: γ-Proteobacteria (Enterobacteriaceae), Bacilli (Bacillaceae e Staphylococcaceae), Actinobacteria (Microbacteriaceae) e Flavobacteria (Flavobacteriaceae)

(Tabela 1). Todas as famílias foram representadas por um único gênero de bactéria. Além disso, Staphylococcacea, representada pelo gênero *Staphylococcus*, foi a família mais abundante, sendo responsável por 40% dos morfotipos selecionados (Tabela 1). Conseqüentemente, essa família também apresentou a maior diversidade de morfotipos, com três espécies distintas: IILNv1 (GenBank no. GU373035) semelhante a *S. saccharolyticus* (GenBank no. L37602), IILNv2 (GenBank no. GU373036) e IILNv3 (GenBank no. GU373037) a *S. caprae* (GenBank no. AB009935) e IILNv4 (GenBank no. GU373038) a *S. pasteuri* (GenBank no. AB009944) (Tabela 1).

No entanto, apesar de *Staphylococcus* ter apresentado a maior diversidade de morfotipos, sua freqüência entre as colônias isoladas foi relativamente baixa (9,8% dos isolados), sendo a Enterobacteriaceae *Klebsiella* a mais comum, representando 81,8% dos morfotipos analisados [isolados IILNv5 (GenBank no. GU373039) e IILNv7 (GenBank no. GU373041)]. Porém, o morfotipo IILNv7 foi o mais abundante de todos, representando 80,4% de todas as colônias analisadas (Tabela 1).

Tabela 1 - Similaridade do gene 16S rDNA (~1.300 pb) dos morfotipos selecionados de bactérias associados à vesícula seminal de *Nezara viridula* com seqüências de linhagens tipo e não-tipo depositadas nos bancos de dados do NCBi e SIMO RDP, e freqüência relativa dos mesmos em análises de PCR-RFLP de clones isolados

Morfotipos	**Similaridade com linhagens tipo e não-tipo**		**Freqüência relativa (%)**
	Linhagem mais próxima	**% de Identidade**	
IILNv1 (GU373035)	*Staphylococcus saccharolyticus* (L3702)	99%	2,8
IILNv2 (GU373036)	*Staphylococcus caprae* (AB009935)	99%	4,2
IILNv3 (GU373037)	*Staphylococcus caprae* (AB009935)	99%	1,4
IILNv4 (GU373038)	*Staphylococcus pasteuri* (AB009944)	99%	1,4
IILNv5 (GU373039)	*Klebsiella pneumoniae* (AY043391)	98%	1,4
IILNv6 (GU373040)	*Curtobacterium albidum* (AM042692)	99%	1,4
IILNv7 (GU373041)	*Klebsiella sp.* (AY827578)	99%	80,4
IILNv8 (GU373042)	*Cryseobacterium indologenes* (AM232813)	99%	2,8
IILNv9 (GU373043)	*Bacillus sp* (GQ375801)	98%	1,4
IILNv10 (GU373044)	*Cryseobacterium indologenes* (AM232813)	99%	2,8

A análise filogenética realizada (795 caracteres totais; 404 padrões informativos e 53,23% sítios sem polimorfismo) indicou que todos os morfotipos identificados foram afins de espécies com hábito de vida livre em seus determinados gêneros. Entretanto, apesar dos morfotipos IILNv5 (GenBank no. GU373039) e IILNv7 (GenBank no. GU373041) apresentarem alta similaridade com espécies de *Klebsiella*, e o morfotipo IILNv9 (GenBank no. GU373043) com *Bacillus*, a análise filogenética demonstrou que esses isolados apresentaram afinidade com espécies ainda não-identificadas, sugerindo, portanto, que as mesmas possam se tratar de novas espécies. Os isolados IIL-Nv5 e IIL-Nv-7, apesar de inseridos em um grande clado de enterobacteriáceas que também inclui dois dos simbiontes isolados do intestino de *N. viridula* (EU072503 e AY679762), apresentam alta divergência com as bactérias presentes no trato digestivo deste percevejo (Figura 2).

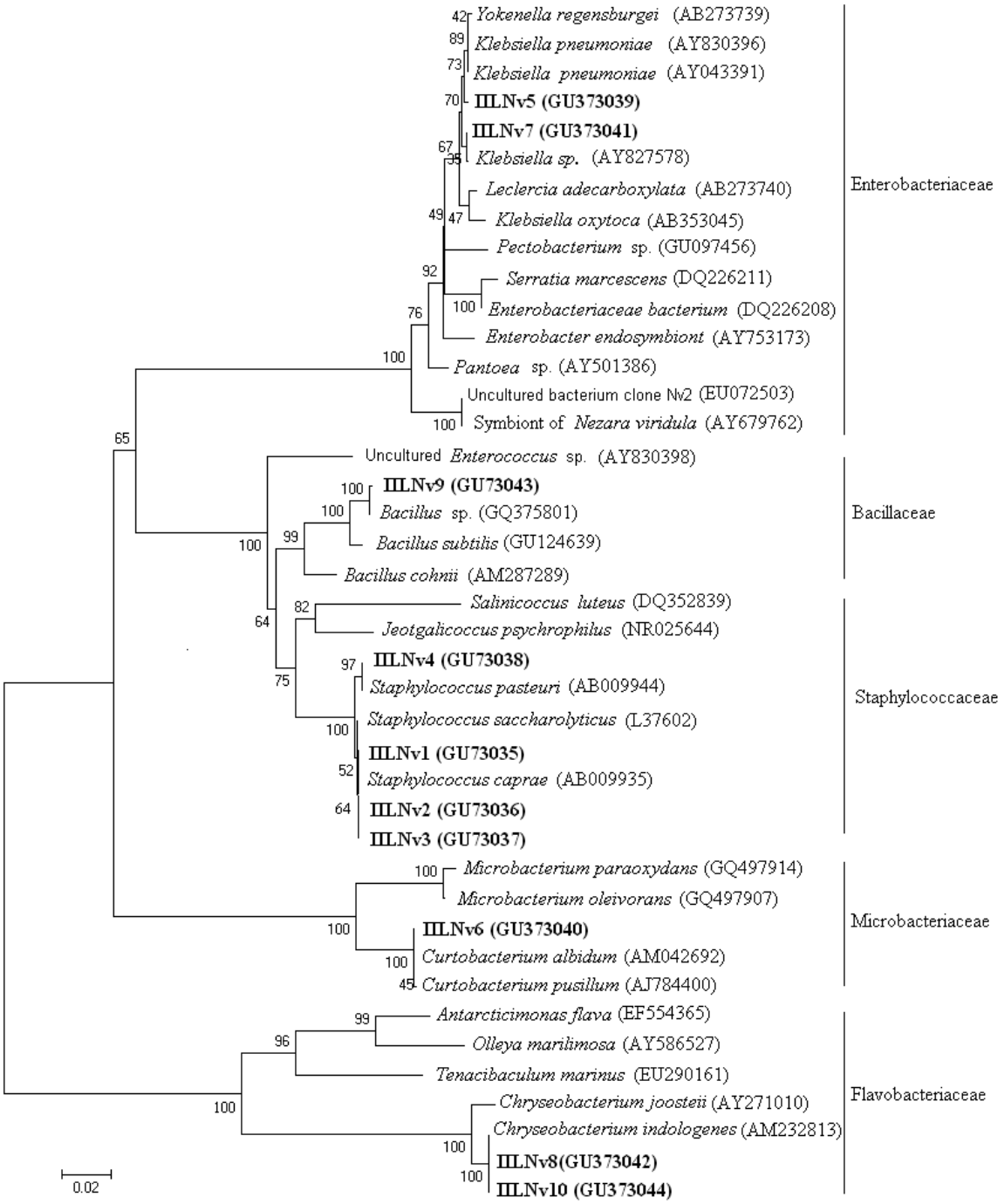

Figura 2 - Relações filogenéticas de bactérias associadas à vesícula seminal de *Nezara viridula* e bactérias isoladas do ambiente e associadas ao trato digestivo de insetos, inferida sobre o critério de máxima verossimilhança (FELSENSTEIN, 1993) a partir de informações da seqüência do gene 16S rDNA. Os números nos ramos indicam o nível de suporte "boostrap", baseado na análise de NJ com 1000 pseudo-repetições; apenas valores acima de 50% estão representados. A barra de escala indica 0,02 substituições por nucleotídeo

6.3.3 Efeito de bactérias associadas à vesícula seminal de machos na reprodução de *Nezara viridula*

A fecundidade e fertilidade das fêmeas acasaladas com machos infectados ($5,6x10^3$ UFC/vesícula seminal) e não-infectados foram semelhantes, indicando que a associação de simbiose com as bactérias presentes na vesícula seminal possa ser neutra, visto que não há interferência na capacidade reprodutiva das fêmeas (Tabela 2).

Tabela 2 - Fecundidade (x±EP), fertilidade (x±EP) e longevidade (x±EP) de fêmeas que copularam com machos tratados ou não com antibióticos (25±1ºC; 60±10% UR; fotofase 14h)

Parâmetros biológicos	Tratamento[1]	
	Tratada	Não tratada
Fecundidade	306,1 ± 39,3 a	209,0 ± 31,9 a
Fertilidade (%)	55,1 ± 6,2 a	45,0 ± 6,1 a
Longevidade (dias)	43,6 ± 3,4 a	49,8 ± 4,4 a

[1]Médias seguidas de mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade. Dados de fecundidade foram corrigidos para log x e os de longevidade para √x.

6.4 Discussão

A vesícula seminal de *N. viridula* apresentou diversidade de bactérias muito superior àquela esperada, visto que o único relato referente à presença de simbiontes na vesícula seminal deste inseto relacionava os mesmos às bactérias comumente presentes no trato digestivo (MALOUF, 1933). No entanto, nossas análises indicam que nenhum dos simbiontes presentes na vesícula seminal de *N. viridula* se assemelha àqueles relatados habitando o trato digestivo deste inseto (HIROSE et al., 2006; PRADO; RUBINOFF; ALMEIDA, 2006).

A ocorrência de bactérias em indivíduos virgens e de campo indica que estas bactérias são de ocorrência natural e que ganham acesso à vesícula seminal por mecanismos outros que a atividade sexual. Entretanto, os resultados obtidos sugerem que a freqüência de infecção, pelo menos em condições de laboratório, pode ser influenciada pela cópula. Este fato indica que as

bactérias associadas ao aparelho reprodutor de *N. viridula* também podem utilizar do mesmo mecanismo de disseminação relatado para enterobacteriáceas associadas a outros insetos, como pulgões e pernilongos, as quais são benéficas ao inseto hospedeiro (MORAN; DUNBAR, 2006; FAVIA, 2007).

No entanto, a presença de bactérias em machos virgens indica a existência de uma via de infecção distinta da sexual, apontando para a possibilidade de infecção da vesícula seminal de *N. viridula* ainda durante o desenvolvimento ninfal deste inseto. A via mais fácil de contaminação seria mesmo a aquisição de bactérias presentes no trato digestivo, mas apesar dos morfotipos mais comuns identificados em *N. viridula* pertencerem ao gênero *Klebsiella*, as mesmas são muito distintas dos isolados de *Klebsiella* associados ao trato digestivo desse inseto (HIROSE et al., 2006; PRADO; RUBINOFF; ALMEIDA, 2006).

Bactérias como *Klebsiella, Pantoea*, *Arsenophonus* e *Buchnera* vêm sendo relatadas em associações com diversos grupos de insetos. Porém, com exceção de *Buchnera*, que exerce papel de simbionte primário, as demais enterobacteriáceas tem função desconhecida na maioria das associações com insetos (DOUGLAS 1998; FREDERICK; CAESAR, 1999; SUBANDIYAH et al. 2000; ZIENTZ et al. 2005; HIROSE et al. 2006). Existem indicações que essas bactérias exercem funções diversas, incluindo a fixação de nitrogênio (POTRIKUS; BREZNAK, 1977; BRIDGES 1981) e a proteção contra agentes infecciosos (DILLON; CHARNLEY, 1995; DILLON et al. 2000).

A relação de simbiose no caso dos simbiontes associados ao aparelho digestivo parece incerta, pois a eliminação das bactérias não afetou os parâmetros biológicos avaliados. A eliminação dos simbiontes *Klebsiella pneumoniae* e *Pantoea agglomerans*, associados ao aparelho digestivo na fase imatura de *N. viridula*, também não afetou o desenvolvimento e crescimento deste percevejo (HIROSE et al., 2006; PRADO; RUBINOFF; ALMEIDA, 2006). Quando os simbiontes foram eliminados de ovos de *N. viridula* e *Murgantia histriônica* (Hemiptera: Pentatomidae), os parâmetros biológicos não foram afetados (PRADO et al., 2009); entretanto, para *Acrosternum hilare* (Heteroptera: Pentatomidae), a ausência de bactérias associadas ao trato digestivo resultou no prolongamento do período ninfal, aumento na mortalidade e redução da fecundidade (PRADO; ALMEIDA, 2009). Assim, enquanto *A. hilare* e *Plautia stali* (Hemiptera: Pentatomidae) necessitam de simbiontes para a sobrevivência (ABE; MISHIRO; TAKANASHI, 1995), em *M. histrionica* e *N. viridula,* os mesmos parecem não

exercer papel fundamental neste parâmetro biológico (PRADO; RUBINOFF; ALMEIDA, 2006; PRADO; ALMEIDA, 2009).

O fato dos simbiontes não serem essenciais para seus hospedeiros não significa que os mesmos não exerçam qualquer papel na biologia do inseto. Para *Parastrachia japonensis* (Heteroptera: Cydnidae), os simbiontes exercem importante papel nutricional e ainda participam da proteção contra condições adversas (KASHIMA; NAKAMURA; TOJO, 2006). A associação inseto-simbionte secundário pode ser benéfica ou prejudicial ao hospedeiro. Algumas dessas associações facultativas influenciam diretamente a reprodução do hospedeiro, como, por exemplo, a alfa-proteobactéria *Wolbachia*, de ocorrência comum entre os invertebrados, e o bacterioidete *Cardinium*, comum a ácaros, homópteros e seus inimigos naturais, os quais afetam o modo de reprodução de seus hospedeiros (WERREN, 1997; WERREN, WINDSOR; 2000; ZCHORI-FEIN et al., 2001; ZCHORI-FEIN, PERLMAN; 2004).

Determinados simbiontes, que são transferidos durante a cópula e se alojam nas estruturas reprodutivas de adultos, estabelecem relações patogênicas, influenciando parâmetros reprodutivos (MORAN; DUNBAR, 2006; KIKUCHI et al., 2009). Assim, insetos que realizam cópulas múltiplas são mais propensos a adquirirem esses simbiontes secundários, os quais, devido à natureza da relação patogênica estabelecida, podem resultar na redução da aptidão reprodutiva dos adultos. Entretanto, para *N. viridula* esta relação de patogenicidade parece incerta, pois a fecundidade, fertilidade e longevidade das fêmeas não foram alteradas quando copuladas com machos infectados.

Apesar da associação dos simbiontes com o aparelho reprodutor de *N. viridula* ainda ser obscura e necessitar de maior investigação para que se possa compreender o tipo de relação existente e os custos adaptativos desta associação, a freqüência da associação com esses simbiontes secundários, a possibilidade de estabelecimentos dos mesmos em populações naturais abre perspectivas para a sua exploração no desenvolvimento de estratégias de controle deste inseto-praga, assim como preconizado para o uso de *Asaia* no combate a mosquitos (FAVIA et al., 2008).

6.5 Conclusões

A vesícula seminal de machos de *Nezara viridula* apresenta 10 linhagens distintas de bactérias, dividadas em 4 grupos distintos;

A Enterobacteriacea *Klebsiella pneumoniae* é a bactéria predominante na vesícula seminal dos machos, utilizando-se de métodos de cultivo;

A freqüência e abundância de simbiontes variam em função da experiência sexual dos machos e da condição de criação (natural ou em laboratório);

A aquisição de simbiontes ocorre por vias outras que a atividade sexual;

A aptidão reprodutiva de fêmeas não é afetada quando inseminadas por machos infectados.

Referências

ABE, Y.; MISHIRO, K.; TAKANASHI, M. Symbiont of brown-winged bug *Plautia stali* Scott. **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology**, Tokio, v.39, p.109-115, 1995.

BARTLETT, M.S. Properties of sufficiency and statistical tests. **Proceedings of the Royal Society of London.** Series A, London, v. 160, p. 268-282, 1937.

BAUMANN, P. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 59, p. 155-189, 2005.

BEARD, C.B.; DURVASULA, R.V.; RICHARDS, F.F. Bacterial symbiosis in arthropods and the control of disease transmission. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 4, p. 581-591, 1998.

BEXTINE B.; LAUZON, C.; POTTER, S.; LAMPE, D.; MILLE, T.A. Delivery of a genetically marked *Alcaligenes* sp. to the glassy-winged sharpshooter for use in a paratransgenic control strategy. **Current Microbiology**, New York, v. 48, p. 327–331, 2004

BOURTZIS, K.; MILLER, T.. **Insect symbiosis**. Boca Raton: CRC Press, 2008, 408 p.

BOX, G.E.P.; COX, D.R. An analysis of transformations. **Journal of the Royal Statistical Society**, London, v.26, n.2, p. 211-252, 1964.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing of principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRIDGES, J.R. Nitrogen-fixing bacteria associated with bark beetles. **Microbial Ecology**, New York, v.7, p.131–137, 1981.

CHEN, D.Q.; MONTLOR, C.B.; PURCELL, A.H. Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrthosiphon pisun*, and the blue alfalfa aphid, *A. kondoi.* **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 95, p. 315-323, 2000.

CORRÊA-FERREIRA, B.S. **Criação massal do percevejo verde *Nezara viridula* (L.).** 1985**.** 16p. (Documentos. Embrapa-CNPSo, 11)

CORRÊA-FERREIRA, B.S. **Utilização do parasitóide de ovos *Trissolcus basalis* (Wollaston) no controle de percevejo da soja**. Londrina: Embrapa-CNPSo, 1993. 40p. (Circular Técnica, 11).

COSTA, H.S.; HENNEBERRY, T.J.; TOSCANO, N.C. Effects of antibacterial materials on *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) oviposition, growth, survival and sex ratio. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 90, p. 333-339, 1997.

COSTA, M.M.L. **Técnica de criação de *Nezara viridula* (L., 1758)(Hemiptera: Pentatomidae) e sua relação com o parasitóide *Eutrichopodopsis nitens* Blanchard, 1966 (Diptera: Tachinidae).** 1991. 134p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba,1991.

DAMIENS, D.; BRESSAC, C.; BRILLARD, J.P.; CHEVRIER, C. Qualitative aspects of sperm stock in males and females from *Eupelmus orientalis* and *Dinarmus basalis* as revealed by dual fluorescence. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 27, p. 97–102, 2002.

DAVIS, L.G.; KUEHL, W.; BATTEY, J.F. **Basic Methods in molecular biology**. 2nd ed.. Norwalk, Connecticut: Appleton & Lange 1994. 777p.

DILLON, R.J.; CHARNLEY, A.K. Chemical barriers to gut infection in the desert locust: In vivo production of antimicrobial phenols associated with the bacterium Pantoea agglomerans. **Journal of Invertebrate Pathology,** San Diego, v. 66, p. 72-75, 1995.

DIXON, A.F.G. **Aphid ecology**. London: Chapman & Hall 1998. 300 p.

DOUGLAS, A.E. Reproductive failure and the free amino acid pools in pea aphids (*Acyrthosiphon pisum*) lacking symbiotic bacteria. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 42, p. 247-255, 1996.

DOUGLAS, A.E. Nutritional interactions in insect–microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *B. aphidicola*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 43, p. 17–37, 1998.

DURVASULA R.V.; GUMBS, A.; PANACKAL, A.; KRUGLOV, O.; AKSOY, S.; MERRIFIELD, R.B.; RICHARDS, F.F.; BEARD, C.B. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, v. 94, p. 3274-3278, 1997.

FAVIA, G.; RICCI, I.; DAMIANI, C.; RADDADI, N.; CROTTI, E.; MARZORATI, M.; RIZZI, A.; URSO, R.; BRUSETTI, L.; BORIN, S.; MORA, D.; SCUPPA, P.; PASQUALINI, L.; CLEMENTI, E.; GENCHI, M.; CORONA, S.; NEGRI, I.; GRANDI, G.; ALMA, A.; KRAMER, L.; ESPÓSITO, F.; BANDI, C.; SACCHI, L.; DAFFONCHIO, D. Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** London**,** v. 104, p. 9047–9051, 2007.

FAVIA G, RICCI, I; MARZORATI, M., NEGRI, I., ALMA, A., SACCHI, L., BANDI, C.; DAFFONCHIO, D. Bacteria of the genus *Asaia*: a potential paratransgenic weapon against malaria. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 627, p. 49-59, 2008.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequence: a maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v.17, p. 368-376, 1981

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, v. 39, p. 783-791, 1985.

FERRARI, J.; DARBY, A.C.; DANIELL, T.J.; GODFRAY, H.C.J.;DOUGLA, A.E. Linking the bacterial community in pea aphids with host-plant use and natural enemy resistance. **Ecological Entomology**, London, v. 29, p. 60–65, 2004.

FREDERICK, B.A; CAESAR, A.J. Analysis of bacterial communities associated with insect biological control agents using molecular techniques. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF WEEDS, 10., 1999. Bozeman. **Proceedings of the 10th International Symposium on Biological Control of Weeds.** 1999. Bozeman. p. 261-267.

FUKATSU, T.; HOSOKAWA, T. Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stink-bug, *Megacopta punctatissima.* **Applied and Environmental. Microbiology**, Washington, v. 68, p. 389-396, 2002.

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. **Systematic Biology**, Washington, v. 52, p. 696-704, 2003.

GOEBEL, W.; GROSS, R. Intracellular survival strategies of mutualistic and parasitic prokaryotes. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 9, n. 6, p. 267-273, 2001.

HAINE, E.R. Symbiont-mediated protection. **Proceedings of the Royal Society,** Serie B, London, v. 275, p. 353-361, 2008.

HIROSE, E.; PANIZZI, A.R.; DE SOUZA, J.T.; CATTELAN, A.J.; ALDRICH, J.R. Bacteria in the gut of Southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 99, p. 91-95, 2006.

HOSOKAWA, T.; KIKUCHI, Y.; NIKOH, N.; SHIMADA, M.; FUKATSU, T. Strict host–symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. **Public Library of Science Biology,** San Franscisco, v. 4, p. 1841-1851, 2006.

KASHIMA, T.; NAKAMURA, T.; TOJO, F. Uric acid recycling in the shield bug, *Parastrachia japonensis* (Hemiptera: Parastrachiidae), during diapause. **Journal of Insect Physiology**, London, v. 52, p. 816–825, 2006.

KIKUCHI, Y.; HOSOKAWA, T.; NIKOH, N.; MENG, X.Y.; KAMAGATA, Y.; FUKATSU, T. Host-symbiont co-speciation and reductive genome evolution in gut symbiotic bacteria of acanthosomatid stinkbugs. **BMC Biology**, London, v. 7, n.2, p.1-22, 2009.

KNELL, R.J.; WEBBERLEY, K.M. Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behaviour. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 79, p. 557-581, 2004.

LANAVE, C.; PREPARATA, G.; SACCONE, C.; SERIO, G. A new method for calculating evolutionary substitution rates. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 20, n.1, p. 86–93, 1984.

MALOUF, N.S.R. Studies on the internal anatomy of the stink bug *Nezara viridula.* **Bulletin de la Société Royale Entomologique d'Egypte**, Cairo, p. 96-119, 1933.

MORAN, N.A.; DUNBAR, H.E. Sexual acquisition of beneficial symbionts in aphids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 103, n. 34, p. 12803-12806, 2006.

MORAN, N.A.; MUNSON M.; BAUMANN, P.; ISHIKAWA, H. A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts. **Proceedings of the Royal Society of London Series B**, London, v. 253, p. 167–171, 1993.

NUIN, P. MrMTgui: cross-platform interface for ModelTest and MrModeltest, 2008. Disponível em: <http://www.genedrift.org/mtgui.php>.Acesso em: 14 jan. 2008.

OLIVER, K.M.; RUSSELL, J.A.; MORAN, N.A.; HUNTER, M.S. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 100, n. 4, p. 1803-1807, 2003.

PANIZZI, A.R.; MC PHERSON, J.E.; JAMES, D.G.; JAVAHERY, J.M.; MC PHERSON, R.M. Stink bug (Pentatomidae). In: SCHAEFER, C.W; PANIZZI, A.R. (Ed.) **Heteroptera of economic importance**. Flórida, p.421-474, 2000.

POTRIKUS, C.J.; BREZNAK, J.A. Nitrogen-Fixing Enterobacter agglomerans Isolated from Guts of Wood-Eating Termites. **Applied and Environmental Microbiology,** Washington, v. 33, p. 392-399, 1977.

PRADO, S.S.; ALMEIDA, R.P.P. Role of symbiotic gut bactéria in the development of *Acrosternum hilare* and *Murgantia histrionica.* **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 132, p.21-29, 2009.

PRADO, S.S.; RUBINOFF, D.; ALMEIDA, R.P.P. Vertical transmission of a Pentatomid caeca-associated symbiont. **Annals of Entomological Society of America**, Columbus, v. 99, n. 3, p. 577-585, 2006.

PRADO, S.S.; ALMEIDA, R.P.P. Role of symbiotic gut bactéria in the development of *Acrosternum hilare* and *Murgantia histrionica.* **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 132, p.21-29, 2009.

PRADO, S.S.; GOLDEN, M.; FOLLETT, P.A.; DAUGHERTY, M.P; ALMEIDA, R.P.P. Demography of Gut Symbiotic and Aposymbiotic *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 38, p. 103-109, 2009.

RIVAS, R.; VELASQUEZ, E.; VALVERDE, A.; MATEOS, P.F.; MOLINA, E.M. A two primers random amplified polymorphism DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 22, p. 1086-1089, 2001.

SUBANDIYAH, S.; NIKOH, N.; TSUYUMU, S.; SOMOWIYARJO, S.; FUKATSU, T. Complex Endosymbiotic Microbiota of the Citrus Psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). **Zoological Science**, Tokyo, v. 17, p. 983-989, 2000.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. ; Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution,** Chicago, v.24, p. 1596-1599, 2007.

TSUCHIDA T, R KOGA, T FUKATSU. Host plant specialization governed by facultative symbiont. **Science,** New York, v. 303, p. 1989, 2004.
WEBBERLEY, K.M.; BUSZKO, J.; ISHAM, V.; HURST, G.D.D. Sexually transmitted disease epidemics in a natural insect population. **Journal of Animal Ecology,** Oxford, v. 75, p. 33-43, 2006.

WERNEGREEN, J.J. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. **Nature**, London, v. 3, p. 850-860, 2002.

WERREN, J.H. Biology of *Wolbachia*. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 42, p. 587-609, 1997.

WERREN, J.H.; WINDSOR, D.M. *Wolbachia* infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? **Proceedings of the Royal Society of London. Series B,** London, v. 267, p. 1277-1285, 2000.

ZCHORI-FEIN, E.; GOTTLIEB, Y.; KELLY, S.E; BROWN, J.K.; WILSON, J.M.; KARR, T.L.; HUNTER, M.S. A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 98, p. 12555–12560, 2001.

ZCHORI-FEIN E.; PERLMAN, S.J. Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, p. 2009–2016, 2004.

ZIENTZ, E.; FELDHAAR, H.; STOLL, S.; GROSS, R. Insights into the microbial world associated with ants. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 184, p. 199–206, 2005.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo