

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Efeito da cópula na aptidão reprodutiva de fêmeas de *Euschistus heros*
(Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae)**

Stefane Andrade Viana

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestra em Ciências. Área de
concentração: Entomologia

Piracicaba
2024

Stefane Andrade Viana
Engenheira Agrônoma

**Efeito da cópula na aptidão reprodutiva de fêmeas de *Euschistus heros*
(Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae)**

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

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

Dissertação apresentada para obtenção do
título de Mestra em Ciências. Área de
concentração: Entomologia

Piracicaba
2024

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Viana, Stefane Andrade

Efeito da cópula na aptidão reprodutiva de fêmeas de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae) / Stefane Andrade Viana. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2024.

66 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Biologia de insetos 2. Fisiologia de insetos 3. Vitelogeninas
4. Simbiontes I. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Criador, por dar luz a minha vida e alívio para minha mente e meu coração principalmente nos momentos em que mais precisei e não sabia nem como pedir;

Ao meu orientador, professor Dr. Fernando Luis Cònsoli por primeiramente ter toda paciência do mundo em me ensinar um pouco do mundo da biologia molecular onde eu não fazia ideia onde estava me metendo, mas hoje sigo admirando e buscando aprender sempre que posso e “segundamente” por ser tão gente boa comigo onde eu me sentia confortável em procurá-lo sempre que estivesse com qualquer dúvida “besta” sobre meus experimentos porque sabia que iria me ajudar e nunca me julgar;

Aos meus pais, que sempre em cada momento mesmo que de longe sempre foram o meu suporte e meu motivo para continuar caminhando;

Ao meu amado Lucas, meu parceiro de tudo! É a pessoa que me transborda a cada dia, que sempre buscou me ajudar em todos os momentos possíveis e é um dos motivos para eu acreditar no amor;

Ao meu fiel companheiro (de sonequinhas principalmente) Bilbo Bolseiro, mais conhecido como meu filho de patas, que sempre fez questão de estar ao meu lado (mesmo que deitado, dormindo e barriguinha para cima) enquanto eu escrevia, e acordava sempre pra me dar muitos “lambeijos” nos olhos pra cessar as minhas lágrimas;

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Interações em Insetos que se tornaram a minha segunda família, o meu muito obrigada a todos sem exceção, sempre me acolheram, me ajudaram quando pedi, me ouviram e riram comigo enquanto tomávamos café;

Ao Laboratório de Interações em Insetos por toda estrutura e equipamentos onde pude fazer minha pesquisa da maneira mais feliz e confortáveis possível;

Ao “graaaande” Leonardo por toda ajuda concedida nos problemas da estatística, tinha que ser maninho da terrinha “mexxmo”;

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Entomologia por momentos compartilhados, sejam esses bons e os mais engraçados pelo desespero nas provas;

Aos professores Programa de Pós-Graduação em Entomologia pelas aulas

ministradas com tanta dedicação;

E por fim, mas não menos importante (JAMAIS) à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de mestrado (Financiamento Code 01) que me permitiu sair de casa e buscar aperfeiçoamento através dos estudos.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. Morfologia do aparelho reprodutor	11
2.1.1. Aparelho reprodutor masculino	11
2.1.2. Aparelho reprodutor feminino	13
2.1.3. Aptidão reprodutiva de machos e fêmeas	15
2.2. Vitelogênese	17
2.3. Microrganismos associados ao sistema reprodutor de insetos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Criação e manutenção de <i>Euschistus heros</i>	21
3.2. Efeito do número de cópulas na aptidão reprodutiva de fêmeas de <i>Euschistus heros</i>	21
3.2.1. Cópula repetidas	22
3.2.2. Cópulas múltiplas	22
3.3. Determinação da infecção da vesícula seminal de machos de <i>E. heros</i> por bactérias	23
3.3.1. Frequência de ocorrência de infecção bacteriana da vesícula seminal de machos de <i>E. heros</i>	24
3.3.2. Análise quantitativa da microbiota bacteriana associada à vesícula seminal de machos de <i>E. heros</i> acasalados	25
3.4. Análise do padrão proteico da hemolinfa e da expressão do gene da vitelogenina em fêmeas de <i>E. heros</i> ao longo dos períodos de pré e pós-cópula	26
3.4.1. Análise quantitativa das proteínas totais na hemolinfa de fêmeas adultas de <i>E. heros</i>	26
3.4.2. Análise qualitativa de proteínas na hemolinfa de fêmeas adultas de <i>E. heros</i>	27
3.4.3 Expressão gênica e disponibilidade de vitelogeninas na fase adulta de fêmeas de <i>E. heros</i>	28
4 RESULTADOS	31
4.1 Efeito do número de cópulas na aptidão reprodutiva de fêmeas de <i>E. heros</i>	31
4.2 determinação da infecção da vesícula seminal de machos de <i>E. heros</i> por bactérias	37
4.2.1 PCR diagnóstico para detecção de infecções em machos de <i>E. heros</i>	37

4.2.2	<i>Análise quantitativa da microbiota bacteriana associada à vesícula seminal de machos de E. heros acasalados</i>	39
4.3	<i>Análise quantitativa de proteínas na hemolinfa de fêmeas adultas de E. heros</i>	40
4.4	<i>Análise qualitativa de proteínas na hemolinfa de fêmeas adultas de E. heros</i>	41
4.5	<i>Expressão dos genes de vitelogeninas</i>	43
5	<i>DISCUSSÃO</i>	45
6	<i>CONCLUSÕES</i>	49
	<i>REFERÊNCIAS</i>	51

RESUMO

Efeito da cópula na aptidão reprodutiva de fêmeas de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae)

A maioria dos sistemas de acasalamento de insetos é caracterizada por um maior investimento reprodutivo das fêmeas do que dos machos, por razões como a produção de ovos, gasto de energia para suportar o assédio pelos machos e selecionar potenciais parceiros. Com isso, presente trabalho teve por objetivo identificar fatores que contribuem para o sucesso reprodutivo de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae) com base em ensaios de cópulas múltiplas e cópulas repetidas. Análises quantitativa e qualitativa do perfil proteico de fêmeas adultas ao longo dos períodos de pré e pós-cópula também foram realizadas, assim como a análise da expressão do gene da vitelogenina 2 nos referidos períodos. Também foi investigada a frequência de infecções bacterianas da vesícula seminal de machos, assim como a quantificação relativa da abundância de duas bactérias comuns vesícula seminal, *Yokenella regensburgei* e *Staphylococcus sciuri*. O número de cópulas repetidas não afetou a aptidão de fêmeas de *E. heros*, mas a realização de cópulas com múltiplos machos resultou em maior fecundidade e longevidade das fêmeas de *E. heros*. A cópula interferiu na quantidade de proteínas totais na hemolinfa de fêmeas, afetando também o perfil qualitativo e quantitativo das proteínas da hemolinfa. A expressão do gene da vitelogenina 2 não é dependente da cópula, mas a expressão desse gene é reativada após a realização da cópula por fêmeas de *E. heros*. As análises diagnósticas de infecção bacteriana na vesícula seminal indicaram 100% de infecção, sendo a infecção independente da cópula e do número de cópulas realizadas. *Yokenella regensburgei* e *Staphylococcus sciuri* ocorrem comumente em infecções mistas, sendo a primeira mais abundante do que a segunda na vesícula seminal de machos de *E. heros*.

Palavras-chave: Biologia de insetos, Fisiologia de insetos, Vitelogeninas, Simbiontes

ABSTRACT

Effect of mating on the reproductive fitness of *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) females (Hemiptera: Pentatomidae)

Most insect mating systems are characterized by a greater reproductive investment by females than by males, for reasons such as egg production, energy expenditure to withstand harassment by males and selecting potential mates. Therefore, the present work aimed to identify factors that contribute to the reproductive success of *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae) based on multiple mating and repeated mating tests. Quantitative and qualitative analyzes of the protein profile of adult females throughout the pre- and post-copulation periods were also carried out, as well as the analysis of the expression of the vitellogenin 2 gene in those periods. The frequency of bacterial infections of the seminal vesicle and the relative quantification of the abundance of two common seminal vesicle bacteria, *Yokenella regensburgei* and *Staphylococcus sciuri* in males were also investigated. The number of repeated copulations did not affect the fitness of *E. heros* females but mating with multiple males resulted in greater fecundity and longevity of *E. heros* females. Mating interfered with the amount of total proteins in the hemolymph of females, also affecting the qualitative and quantitative profile of hemolymph proteins. The expression of the vitellogenin 2 gene is not dependent on mating, but the expression of this gene is reactivated after mating by *E. heros* females. All seminal vesicles (100%) analyzed tested positive for bacterial infection. The infection of seminal vesicles was independent of mating, or the number of copulations performed. *Yokenella regensburgei* and *Staphylococcus sciuri* jointly infected male seminal vesicles, with *Y. regensburgei* being much more abundant than *S. sciuri*.

Keywords: Insect biology, Insect physiology, Vitellogenins, Symbionts

1. INTRODUÇÃO

O comportamento reprodutivo em insetos é comumente caracterizado por uma sucessão de eventos definidos pela procura, localização, corte e acasalamento (Aldrich 1988). Os acasalamentos são onerosos, englobando os custos energéticos do comportamento sexual (Daly 1978; Arnqvist e Nilsson 2000). Além do investimento em energia e tempo, o acasalamento pode também levar à transferência de microrganismos patogênicos, assim como adicionar outros fatores de risco às fêmeas devido às lesões físicas que podem ser infligidas por machos, sem contar os riscos aumentados de predação (Moran e Dunbar 2006; Roggiro et al. 2020). A duração da cópula também pode influenciar os custos e benefícios associados ao sucesso reprodutivo (Sears et al. 2020).

Considera-se que o sucesso reprodutivo de um macho depende principalmente do número de fêmeas que ele pode inseminar, enquanto este benefício às fêmeas ainda é controverso (Simmons 2005). A frequência de acasalamentos pode afetar o ciclo e o número de descendentes de fêmeas poliândricas, ou seja, aquelas que se acasalam com diferentes machos. Isto representa uma estratégia evolutiva e pode aumentar a fertilidade das fêmeas que possuem este tipo de reprodução. Contudo, as fêmeas, muitas vezes, realizam acasalamentos múltiplos com o mesmo ou com machos distintos, mesmo quando estes machos não as forneçam outros benefícios, como nutrientes ou cuidados parentais. Conseqüentemente, os benefícios da realização de múltiplas cópulas às fêmeas devem compensar os custos associados (Reichardt e Wheeler 1996; Arnqvist e Nilsson 2000).

Diversos insetos possuem relações de simbiose com microrganismos, podendo ser facultativas ou obrigatórias, resultando em interações neutras, mutualísticas ou patogênicas. As associações de simbiose entre insetos e microrganismos são amplamente difundidas, havendo estimativas de sua ocorrência em cerca de 15-20% das espécies estudadas (Buchner 1965; Wernegreen 2002; Baumann 2005). Estudos mostram que a presença de simbiontes facultativos poderia aumentar a aptidão do hospedeiro, muitas vezes até mesmo o sucesso reprodutivo (Leonardo e Muiru 2003). A participação de simbiontes na reprodução de insetos foi comprovada por estudos que demonstraram que a eliminação dos mesmos levou à redução da fecundidade de *Cimex lectularius* (Linnaeus, 1758)

(Hemiptera: Cimicidae), por exemplo (Takano-Lee et al. 2003). Os simbioses não patogênicos também podem alterar o comportamento de seus hospedeiros, a fim de otimizar sua aptidão reprodutiva ou de protegê-los contra patógenos (Brownlie e Johnson 2009).

De uma perspectiva biotecnológica, os microrganismos simbioses constituem fontes promissoras e quase totalmente inexploradas para aplicações potenciais na medicina e agricultura (Berasategui et al. 2016). A manipulação e/ou eliminação de microrganismos simbioses obrigatórios para a reprodução do inseto hospedeiro seria uma forma de exploração desses microrganismos para o controle de insetos-praga, já que a intervenção na interação inseto - simbiote obrigatório levaria à infertilidade das fêmeas, resultando, conseqüentemente, na redução ou eliminação de populações de insetos (Sakamoto e Rasgon 2006).

O presente trabalho teve por objetivo identificar fatores que contribuem para o sucesso reprodutivo de *Euschistus heros* (Fabricius, 1798) (Hemiptera: Pentatomidae), como base para o correto entendimento do processo de reprodução nestes insetos, um aspecto simples da fisiologia, mas de vital importância para o entendimento dos mecanismos envolvidos no crescimento populacional desta praga importante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Morfologia do aparelho reprodutor

O aparelho reprodutor de insetos apresenta diferentes formas e estruturas, de acordo com a espécie, sofrendo processo de diferenciação durante o desenvolvimento pós-embrionário de insetos (Snodgrass 1956; Ross 1965; Lara 1977).

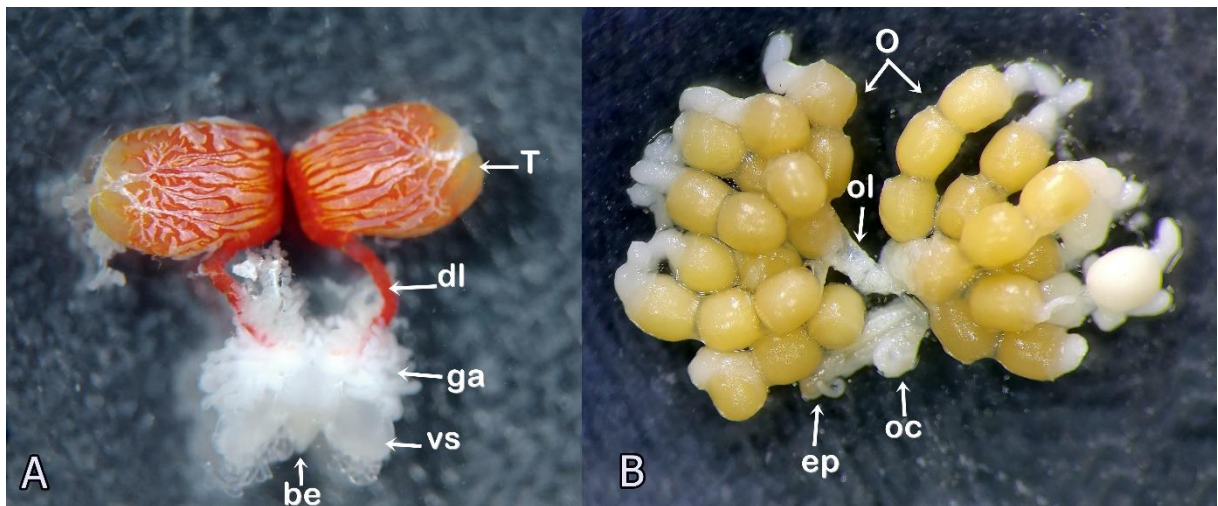


Figura 1. A) aparelho reprodutor de machos de *Euschistus heros*. Testículo (T), ducto lateral (dl), glândulas acessórias (ga), vesícula seminal (vs) e bulbo ejaculatório (eb). B) aparelho reprodutor de fêmeas de fêmeas de *Euschistus heros*. Ovário (O), oviduto lateral (ol), espermateca (ep) e oviduto comum (oc).

2.1.1. Aparelho reprodutor masculino

O aparelho reprodutor masculino dos insetos consiste em um par de testículos, um par de vasos deferentes, bulbo ejaculatório, um par de vesículas seminais, glândulas acessórias pareadas e um único ducto ejaculatório (Chapman 1998; Araújo et al. 2011, 2020). No entanto, modificações e adaptações nos sistemas reprodutores masculinos podem ser encontradas e podem servir como material de estudo para a compreensão do comportamento e da biologia reprodutiva de um grupo taxonômico (Chapman 1998; Dallai 2016).

Os testículos são tecidos especializados para a produção de espermatozoides e, na maioria das espécies de insetos, são pareados e cobertos por um epitélio simples chamado de bainha peritoneal testicular que geralmente possui variação de cores, podendo ser amarela (*Oncopeltus fasciatus* e *Pachybrachius bilobatus*),

vermelha (*Stenocoris furcifera* e *Euschistus heros*), laranja (*Acanonicus hahni* e *Galgupha sidae*); transparente (*Dictyla monotropidia* e *Pachycoris torridus*) (Phillips 1970; Wei et al. 2015; Gomes et al. 2013).

O número de espermatozoides por cisto é geralmente conservado de acordo com os táxons, e os espermatozoides são caracterizados por padrões de evolução morfológica, sendo reconhecidos como caracteres que auxiliam no estudo filogenético dos diferentes grupos de insetos (Phillips 1970; Baccetti 1972; Werner e Simmons 2008; Araújo et al. 2010).

Os vasos deferentes dos insetos referem-se aos tubos que saem dos testículos e se abrem para o ducto ejaculatório e são responsáveis pelo transporte dos espermatozoides para as vesículas seminais. Vasos deferentes são um par de tubos simples, consistindo principalmente de um epitélio espesso, uma membrana basal e um revestimento muscular, da superfície luminal interna à superfície basal externa (Bissell 1937; Riemann e Giebultowicz 1992). Uma porção do vaso deferente é diferenciada e dilatada para formar uma estrutura chamada de vesícula seminal, que é especializada no armazenamento de espermatozoides antes da sua transferência para o trato reprodutivo feminino (Snodgrass 1935; Chapman 2013; Gullan e Cranston 2014).

A vesícula seminal é responsável por armazenar o fluido seminal e os espermatozoides, contribuindo com 50% a 80% do volume ejaculado. Apesar das diferenças morfológicas entre as vesículas seminais de insetos, as características histológicas são geralmente semelhantes, sendo a vesícula constituída por um epitélio sobre uma lâmina basal e circundados por uma camada mais ou menos espessa de músculo estriado e de origem ectodérmica (Davey 1985; King et al. 1991).

As vesículas seminais de muitos insetos parecem não produzir nenhuma secreção, mas em alguns casos o epitélio da vesícula seminal apresenta ultraestrutura típica de célula secretora semelhante à glândula acessória, não servindo mais como órgão de armazenamento de espermatozoides (Odhiambo 1969; Couche e Gillot 1988; Xie e Hua 2010).

As glândulas acessórias produzem secreções que se agregam aos espermatozoides, exercendo seus efeitos em todas as fases da biologia reprodutiva da fêmea acasalada, desde o momento em que os espermatozoides são depositados no trato reprodutivo de fêmeas até a postura dos ovos (Tuzet 1977;

Chen 1984; Gillot 1988, 2003).

As secreções produzidas pelas glândulas acessórias geralmente carregam carboidratos (livres e complexos com proteínas), alguns lipídios (normalmente ligados a proteínas), e pequenas quantidades de aminoácidos e aminas. As proteínas são os componentes de maior importância dessas secreções, tanto em quantidade quanto em importância como moduladores da atividade reprodutiva feminina (Gillott et al. 1992; Gillott 2003).

O fluído seminal é composto por espermatozoides e secreções das glândulas acessórias e possui diversas funções importantes tanto para machos quanto para as fêmeas que o recebem (Poiani 2006). Dentre essas funções está a nutrição através de açúcares como galactose, glicose, frutose, celobiose, trealose e lactose, que são fontes de energia para os espermatozoides; proteção dos espermatozoides contra a ação proteolítica pela presença de inibidores de proteases, estendendo, assim, a longevidade dos espermatozoides; proteção contra atividade de microrganismos patogênicos e higienização do trato reprodutivo feminino (Wolfner 1997; Marchini et al. 1997; Chapman 2001).

O ducto ejaculatório é o responsável pelo transporte de espermatozoides e secreções de glândulas acessórias até o receptáculo feminino; é de origem ectodérmica e se estende da base do bulbo ejaculatório até o edeago (Tsai et al. 2004; Özyurt et al. 2013, 2018).

2.1.2. Aparelho reprodutor feminino

O sistema reprodutor feminino de insetos consiste em um par de ovários conectados aos ovidutos laterais, um oviduto comum, uma espermoteca, glândulas acessórias e ovipositor (Štys et al. 1998; Chapman 1998; Klowden 2007; Cremonez et al. 2017).

Os ovários de insetos diferem na forma como os nutrientes estão disponíveis para a nutrição dos oócitos e podem ser divididos em dois tipos: panoístico, no qual as oogônias originam exclusivamente oócitos, e meroístico, no qual oogônias dão origem a oócitos e células nutridoras.

Ovários meroístico são divididos em politróficos (células nutridoras acompanham os oócitos ao longo do ovaríolo) e telotróficos (células nutridoras permanecem localizadas no germário e conectadas aos oócitos por cordões nutridores) (Davey 1959; Štys e Biliński 1990; Chapman 1998; Nijhout 1998; Huynh

e St Johnston 2004; Lemos et al. 2005).

Os ovários dos hemípteros são compostos por um número variável de ovariolos telotróficos (Ma e Ramaswamy 1987; Nijhout 1998). Em cada ovariolo, o filamento terminal é seguido por um trofário que se conecta a um vitelário. O trofário contém trofócitos e oócitos presos.

Todas as células germinativas no ovariolo estão conectadas a uma região central livre de células da câmara trófica, denominada núcleo trófico: oócitos por cordões nutridores, trofócitos por projeções citoplasmáticas (Büning 1994; Szklarzewicz 1998).

Os ovariolos estão ligados proximalmente a um tubo fino, o pedicelo, que se conecta ao oviduto lateral. Ambos os ovidutos laterais se unem em um oviduto comum que se abre em uma câmara genital (Chapman 1998; Lemos et al. 2005; Hodin 2009).

A espermateca é responsável por armazenar e manter espermatozoides viáveis até a fertilização do oócito. O armazenamento de espermatozoides permite que as fêmeas se dissociem dos machos após o acasalamento. A maioria dos Heteroptera possui uma única espermateca ligada ao oviduto comum (Rider e Chapin 1991; Javahery 1994).

Nos pentatomídeos, a espermateca tem uma bolsa espermática elástica próxima ao bulbo que incha com a transferência de espermatozoides pelo acasalamento (Adams 2001). As glândulas acessórias femininas são comumente caracterizadas por uma estrutura simples, em que seu epitélio é composto por uma íntima cuticular cis-luminal, uma ou duas camadas de células, bem como uma lâmina basal transluminal (Gillott 1988).

As glândulas acessórias femininas produzem secreções que facilitam o transporte de ovos através do ovipositor e permitem a fixação deles ao substrato, aumentando a proteção deles durante a oviposição. E algumas espécies, essas secreções possuem propriedades antibacterianas, servindo para proteção dos ovos contra organismos patogênicos e/ou para que simbioses possam encontrar uma espécie de microambiente menos competitivo (Marchini et al. 1991, 1997; Dallai et al. 1996; Chapman 1998; Dossi e Consoli 2014).

O ovipositor é uma estrutura altamente especializada composta por apêndices cuticulares e grandes músculos esqueléticos; e não é apenas importante biologicamente para deposição dos ovos, mas também é de importância taxonômica

para a identificação de espécies (Cook e Balaraman 2011; Emeljanov 2014).

2.1.3. Aptidão reprodutiva de machos e fêmeas

A maioria dos sistemas de acasalamento de insetos é caracterizada por um maior investimento reprodutivo das fêmeas do que dos machos, por razões como a produção de ovos, gasto de energia para suportar o assédio pelos machos e selecionar potenciais parceiros (Thornhill e Alcock 1983; De Loof 2011; Pérez et al. 2013).

O conflito sexual procede de diferenças no comportamento de acasalamento entre os sexos, conduzindo a evolução de machos e fêmeas de maneiras diferentes. Normalmente, os machos são selecionados pelas fêmeas por características fenotípicas e comportamentais, como a exibição de padrão comportamental estereotípico de corte e ornamentação colorida. Essas características são fruto de processos de seleção natural dada a intensa competição intrasexual. Fêmeas, por outro lado, evoluíram características discretas, mas são as responsáveis pela seleção do parceiro, que, em alguns casos, também pode envolver o oferecimento de presentes nupciais, ou ainda de benefícios indiretos transferidos pelos machos (Andersson 1994; Yasui 1998).

O sucesso do acasalamento das fêmeas aumenta com a proporção de machos na população e é afetado por outros parâmetros, como densidade populacional, localização do habitat e tempo de emergência, e da capacidade de dispersão de machos e fêmeas (Emlen e Oring 1977; Rhainds 2010). Fatores como temperatura e disponibilidade e/ou qualidade de recursos nutricionais podem influenciar muito no investimento reprodutivo feminino, tanto no tamanho quanto no número de ovos produzidos (Thompson e Pellmyr 1991; Ernsting e Isaaks 1997; Fox e Czesak 2000). Para machos, o sucesso reprodutivo é o sucesso da paternidade (conhecido como precedência de esperma ou P_2). Assim, o sucesso reprodutivo para machos envolve a superação de três obstáculos: cópula, inseminação das fêmeas e fertilização de seus ovos (Arnqvist e Danielsson 1999; Thornhill e Alcock 2013).

Na maioria dos insetos, as fêmeas permitem vários acasalamentos com o mesmo (cópula repetida) ou com diferentes machos (cópulas múltiplas), esses sistemas de acasalamentos são conhecidos como monogamia quando machos e

fêmeas geralmente acasalam apenas com um parceiro e poliandria quando uma fêmea acasala com machos diferentes (Hosken et al. 2009; Kvarnemo e Simmons 2013). Mesmo que os machos da maioria dos táxons não ofereçam cuidado parental à prole, alguns benefícios são concedidos, como a transferência de hemolinfa para fêmeas do grilo *Eunemobius carolinus* (Scudder, 1877) (Orthoptera: Trigonidiidae) através de um esporão especializado localizado na perna metatorácica do macho (Piascik et al. 2010).

Machos também podem transferir às fêmeas secreções de glândulas salivares, fluido seminal e espermátóforos durante a cópula (Arnqvist e Nilsson 2000; Kempenaers 2007; Lewis e South 2012).

A ocorrência de poliandria em fêmeas pode ser explicada por duas hipóteses: I) recebimento de benefícios materiais (espermáticos e não espermáticos), que envolvem a transferência de substâncias contidas no fluido seminal ou a apresentação de presentes de valor nutricional; II) benefícios genéticos que estão associados ao acasalamento múltiplo e concentram-se principalmente no aumento da variabilidade genética da prole, nos maiores níveis de competição espermática e na oportunidade para as fêmeas selecionarem melhores parceiros e compensar os custos de acasalamentos repetidos ou múltiplos (Hunter et al. 1993; Reynolds 1996; Yasui 1998; Arnqvist e Nilsson 2000).

Entretanto, para os machos, cada acasalamento múltiplo representa dispêndio de tempo e energia para a produção de novas secreções pelas glândulas acessórias, podendo dessa forma resultar na diminuição do seu sucesso reprodutivo (Oberhauser 1988; Yasui 2001). Muitas espécies desenvolveram estratégias reprodutivas flexíveis que permitem aos indivíduos otimizar sua aptidão ajustando seu esforço reprodutivo em resposta ao seu estado ou condição ambiental (Svensson e Sheldon 1998; Fox e Czesak 2000).

Lewis (2004) mostrou que a realização de múltiplas cópulas não foram benéficas para machos de *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) devido ao alto gasto de energia na abordagem das fêmeas e na produção de novos espermatozoides, sendo preferível a realização de cópulas repetidas como estratégia para defesa dos espermatozoides, visto que muitas espécies podem ajustar o número de espermatozoides ou o tamanho do espermátóforo de acordo com os sinais proximais da idade, tamanho ou status de acasalamento da fêmea.

A mesma estratégia foi observada em machos de *Dryomyza anilis* (Fallén, 1820) (Diptera: Dryomyzidae) (Otronen 1994).

Em fêmeas, a realização de cópulas repetidas ou múltiplas oferece vantagens e desvantagens, dependendo do táxon. Em fêmeas de *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Pentatomidae), cópulas repetidas reduziram o número médio de ovos e a fecundidade (Fortes e Consoli 2011), enquanto para fêmeas de *Edessa mediatubunda* (Fabricius, 1794) (Hemiptera: Pentatomidae) o acasalamento repetido aumentou a fecundidade, mas foi caro em termos de redução da longevidade em comparação com as fêmeas virgens (Silva et al. 2012). Em fêmeas de *T. castaneum* não foram encontrados benefícios adicionais com a realização de múltiplas cópulas (Pai e Yan 2020); em *Atrophaneura alcinous* (Klug, 1836) (Lepidoptera: Papilionidae), acasalamentos múltiplos tiveram um efeito negativo na longevidade das fêmeas, sem qualquer benefício à fecundidade (Kawagoe et al. 2001).

Em contrapartida, múltiplas cópulas em *Tuta absoluta* (Meyrick, 1917) (Lepidoptera: Gelechiidae) foram benéficas, aumentando a fecundidade, fertilidade e longevidade das fêmeas (Lee et al. 2014). Fêmeas de *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera: Pteromalidae) que realizaram múltiplas cópulas sofreram menos assédio do que fêmeas que realizaram uma cópula e utilizaram essa condição como estratégia por conveniência (Boulton e Shuker 2016). Fêmeas de *T. castaneum* que realizaram múltiplas cópulas produziram descendentes machos com maior capacidade de inseminação em comparação com aqueles produzidos por mães monândricas (Pai e Yan 2002).

Os percevejos tendem a ter um declínio no número de espermatozoides, o que torna um fator limitante para o sucesso reprodutivo desses insetos. Com isso, são iteróparos e exibem múltiplas cópulas ao longo de sua vida, levando ao reabastecimento de espermatozoides e ao aumento do valor adaptativo das fêmeas (Panizzi 2000; Thornhill e Alcock 1983; Sousa et al. 2006).

2.2. Vitelogênese

A vitelogênese é crucial para a reprodução dos insetos e compreende a síntese de vitelogenina e o acúmulo de vitelo no ooplasma (Valle 1993). Espécies ovíparas apresentam em seus ovos proteínas do vitelo (YP), sendo a vitelina (Vn) a

principal delas, tendo como precursor a vitelogenina (Vg). Vitelogenina é uma glicolipofosfoproteína oligomérica, com monômeros consistindo em duas ou mais subunidades (apoproteínas), podendo ser grandes (150 kDa a 200 kDa) e/ou pequenas (40 kDa a 65 kDa) (Raikhel e Dhadialla, 1992; Lee et al. 2015). É importante para a maturação do ovo e desenvolvimento embrionário (Wu et al. 2021). É geralmente sintetizada extra-ovariamente pelo tecido adiposo, secretada na hemolinfa e incorporada por oócitos competentes via endocitose mediada por receptor (Swevers et al. 2005; Snigirevskaya; Raikhel 2005; Lee et al. 2015).

Todo esse processo heterossintético é chamado de vitelogênese (Raikhel e Dhadialla 1992). Estudos mostram que a vitelogênese de insetos é controlada por dois hormônios, o sesquiterpenoide hormônio juvenil (JH) e o ecdisteroide 20-hidroxiecdisona (20E, forma ativa da ecdisona). Tanto o JH quanto o 20E podem estimular vários aspectos da vitelogênese, mas variam entre as ordens de insetos, dependendo das características reprodutivas (Wyatt e Davey 1996; Raikhel et al. 2005; Tufail e Takeda 2008; Song e Zhou 2020).

Em Heteroptera, a vitelogênese é regulada principalmente pelo hormônio juvenil, que também controla o acesso da molécula de Vg ao oócito, enquanto os ecdisteroides produzidos pelas células foliculares do ovário e por outros tecidos são responsáveis pela estimulação da síntese desta proteína do vitelo pelo tecido adiposo (Davey 1997, 1993; Tufail et al. 2010; Richard et al. 1998).

Na vitelogênese, as moléculas de Vg são modificados por glicosilação, lipidação, fosforilação e clivagem proteolítica distintivamente em diferentes grupos de insetos, e se acumulam via pinocitose para formar vitelina no oócito em desenvolvimento (Dhadialla e Raikhel 1990; Giorgi et al. 1999; Sappington et al. 2002; Tufail et al. 2005). Vgs são armazenadas como Vn na forma cristalina após a incorporação aos oócitos e fornecem aminoácidos, lipídios, carboidratos, vitaminas, microelementos e outros nutrientes para o embrião em desenvolvimento (Tufail e Takeda 2008).

Vitelogenina foi identificada pela primeira vez por Tefler (1954) na hemolinfa de *Hyalophora cecropia* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Saturniidae), demonstrando que essa proteína era específica de fêmeas e que participava na formação do vitelo. Pan (1969) identificou o tecido adiposo como sendo a principal fonte dessa proteína e a denominou de vitelogenina por ser precursora da vitelina (Vn) ou “proteína do vitelo” (YP).

Normalmente, as “proteínas do vitelo” de insetos são divididas em quatro tipos: (I) as YPs (como as Vgs da maioria das espécies de insetos) que são sintetizadas nas células do tecido adiposo de maneira sexo-específica e sequestradas pelos oócitos em desenvolvimento; (II) YPs que são produzidas tanto nas células do tecido adiposo feminino quanto nas células dos folículos ovarianos de maneira sexo-específica e incorporadas aos oócitos em desenvolvimento (YPs de Cyclorrhapha); (III) YPs que são sintetizadas nas células foliculares ovarianas e incorporadas aos oócitos em desenvolvimento de maneira sexo-específica [proteína específica do ovo em *Bombyx mori* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Bombycidae)]; e (IV) YPs que são produzidos nas células do tecido adiposo de forma sexo inespecífica e secretadas na hemolinfa e internalizados pelos oócitos em desenvolvimento (como a proteína de 30 kD de *B. mori*) (Tufail et al. 2014).

Apesar de ser considerada proteína específica de fêmeas, estudos mostram que Vgs também podem ser encontradas em machos de algumas espécies, mesmo que em pequenas quantidades (Piulachs et al. 2003; Blariza et al. 2016), mostrando que proteínas Vgs não somente desempenham o papel na formação do embrião, mas também desempenham funções distintas dessa (Zhang et al. 2011). Estudos com o bicho-da-seda *B. mori* relataram forte atividade antibacteriana da Vg contra as bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e Gram-negativa *Escherichia coli* (Li et al. 2008; Singh et al. 2013). No percevejo *Pyrrhocoris apterus* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Pyrrhocoridae), Vg mostrou ter atividade de defesa contra o nematoide *Steinernema carpocapsae* (Weiser, 1955) (Rhabditida: Steinernematidae) (Kodrik et al. 2019), capacidade de redução do estresse oxidativo e de regulação da dinâmica hormonal em operárias de *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) (Hymenoptera: Apidae) (Seehuus et al. 2006; Nelson et al. 2007).

Os processos de síntese e acúmulo de Vg têm sido objeto de estudos, particularmente em relação à fisiologia reprodutiva, endocrinologia e bioquímica. Esses estudos resultaram no sequenciamento de Vg em 25 espécies de insetos pertencentes a seis ordens diferentes (Lee et al. 2000; Tufail e Takeda 2008). A variação do gene e da proteína Vg em diversas espécies de insetos pode refletir a seleção evolutiva e a estratégia de adaptação ao ambiente (Garcia et al. 2010).

2.3. Microrganismos associados ao sistema reprodutor de insetos

Como todos os outros organismos, os insetos vivem em estreita associação com microrganismos, os quais influenciam profundamente sua ecologia e evolução, conferindo novas características fenotípicas ao hospedeiro, permitindo assim a expansão para nichos ecológicos anteriormente inacessíveis e subsequente diversificação (Takiya 2006; Janson 2008; Kaufman et al. 2000).

Microrganismos, como bactérias, podem estar associados ao seu inseto hospedeiro de forma permanente ou transitória, e tais associações desempenham funções essenciais no desenvolvimento, proteção e nutrição de insetos (Feldhaar 2011; Minard et al. 2013). Historicamente, os simbioses são divididos em dois grupos. O grupo descrito como simbioses obrigatórios ou primários são mutualistas e costumam apresentar função nutricional e normalmente ocorrem em insetos que se alimentam de dietas pobres nutricionalmente, como o sangue, a seiva e a celulose. O outro grupo é representado por simbioses facultativos ou secundários; estes apresentam uma diversidade de efeitos, variando do mutualismo à patogenicidade. Ambos os grupos podem habitar o espaço endocelular, a cavidade hemocélica, o lúmen intestinal ou a superfície do tegumento de insetos (Baumann, 2005; Moran et al. 2008; Douglas 2015).

Insetos pertencentes à ordem Hemiptera apresentam diversidade nas associações com microrganismos, como as bactérias presentes na superfície da massa dos ovos de *Acrosternum hilare* (Say), necessárias ao desenvolvimento e sobrevivência das ninfas (Prado e Almeida 2009), e *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter) e *Enterococcus faecalis* (Andrewes & Horder) associadas ao ventrículo 4 de *Nezara viridula*, as quais são necessárias ao crescimento e sobrevivência ninfas deste percevejo (Hirose et al. 2006). Essas associações podem permitir ao hospedeiro explorar diferentes dietas que apresentam composição nutricional deficiente, desde a seiva de plantas até o sangue de vertebrados (Sudakaran et al. 2017). A simbiose também pode modular o desenvolvimento do hospedeiro (Karamipour et al. 2016), a sua imunidade a patógenos e macrófagos, e a reprodução dos seus hospedeiros (Laughton 2016; Mahadav 2008; Prado et al. 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Criação e manutenção de *Euschistus heros*

A população estoque de *E. heros* foi mantida em caixas de criação (31,9x31,9x10,9 cm) em condições controladas ($25\pm 1^\circ\text{C}$; $60\pm 10\%$ UR; fotofase de 12 h). Os insetos foram mantidos em dieta natural a base de vagem verde de feijão e sementes de amendoim. Água destilada foi disponibilizada em algodão umedecido. O alimento foi trocado uma vez por semana e a água renovada duas vezes na semana. Nas caixas de criação com insetos adultos foram adicionados de dois a três discos de algodão para servirem de substrato para oviposição, sendo os discos de algodão retirados e substituídos por novos a cada troca de alimento. Os discos de algodão contendo ovos foram colocados em caixas menores (25,8x17,8x8,5 cm), contendo tubos com água destilada (5 mL) vedados com algodão hidrófilo para evitar a dessecação dos ovos. As ninfas obtidas eram então transferidas para caixas de criação (31,9x31,9x10,9 cm) e alimentadas assim como descrito anteriormente.

3.2. Efeito do número de cópulas na aptidão reprodutiva de fêmeas de *Euschistus heros*

Ninfas de 4° e 5° instares foram separadas em caixas plásticas de criação (21x18x18 cm) para a melhor observação e coleta de adultos recém-emergidos. Os adultos foram separados por sexo imediatamente após a emergência e mantidos em copos plásticos (1000 mL). A alimentação e o manuseio foram idênticos aos descritos no item 3.1. Os insetos foram mantidos em condições controladas ($25\pm 1^\circ\text{C}$; $60\pm 10\%$ UR; fotofase de 12 h) até completarem 10 dias de idade (período de pré-cópula), quando foram pesados para a utilização de machos (60 – 70 mg) e fêmeas (70 – 80 mg).

Esses adultos foram utilizados para o estudo do efeito do número de cópulas na aptidão reprodutiva de fêmeas de *E. heros*, avaliando-se o efeito do número de cópulas repetidas e de múltiplas cópulas. Além da seleção de machos dentro de um intervalo de peso determinado, medições da tíbia da perna metatorácica direita também foram realizadas para a avaliação do efeito do tamanho do macho na aptidão reprodutiva das fêmeas. As medições da tíbia foram realizadas através de fotografias feitas com auxílio da Câmera Moticam 2000 acoplada ao estereomicroscópio Nikon SMZ 168.

As medições foram realizadas em aumento de 10x em imagens digitalizadas no software TpsDig2 (Rholf, 2015).

3.2.1. Cópula repetidas

Os casais foram individualizados em copos plásticos (1000 mL) e as fêmeas permaneceram acompanhadas do seu parceiro até a obtenção do número de cópulas desejadas (1, 2, 3 e 4 cópulas). A ocorrência de cópula era avaliada periodicamente das 8 às 18h. Após esse período os machos eram isolados e retornados ao recipiente de acasalamento com a mesma fêmea apenas no início do outro período. Conforme o número de cópulas desejado (1 a 4) era alcançado, o macho era imediatamente fixado em 70% etanol e armazenado a -20°C para a posterior extração da vesícula seminal para a determinação de infecção bacteriana. Cada tratamento (número de cópulas) contou com 25 repetições (1 repetição = 1 casal).

3.2.2. Cópulas múltiplas

Para a observação do efeito da realização de múltiplas cópulas na aptidão reprodutiva de fêmeas de *E. heros*, o procedimento de observação de realização da cópula foi semelhante ao anteriormente descrito. Porém, os machos eram substituídos por novos machos virgens após a realização de cada cópula, até que o número desejado de cópulas (1 a 4) fosse alcançado. Os machos eram imediatamente fixados em 70% etanol logo após a cópula e armazenados a -20°C para posterior extração de DNA da vesícula seminal e realização de reações de PCR diagnóstico para a verificação da presença de bactérias associadas. Cada tratamento (número de cópulas) contou com 25 repetições (1 repetição = 1 casal), sendo analisado um total de 25, 50, 75 e 100 machos para fêmeas que realizaram, respectivamente, 1, 2, 3 e 4 cópulas.

As fêmeas permaneceram nos mesmos recipientes para a avaliação diária e coleta de dados relacionados à fecundidade (número de ovos/fêmea), fertilidade (% de ovos viáveis/fêmea) e longevidade (dias). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Dados de peso das fêmeas foram adicionados à análise. Todos os dados foram submetidos a análises de variâncias após a verificação da normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk e da homogeneidade das

variâncias pelo teste de Bartlett. Os dados de fecundidade, fertilidade, longevidade e comprimento da tíbia das fêmeas entre os diferentes tratamentos foram comparados pelo teste Tukey ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram feitas no programa RStudio (versão 2023.03.0+386) e análises gráficas pelo Microsoft® Excel® (Versão 2302 Build 16.0.16130.20332).

3.3. Determinação da infecção da vesícula seminal de machos de *E. heros* por bactérias

A dissecação de machos para a obtenção da vesícula seminal foi realizada em solução salina estéril de NaCl a 0,85%. As vesículas obtidas foram individualmente colocadas em 100 μ L de etanol absoluto e armazenadas a -20°C .

As vesículas foram submetidas a extração de DNA genômico (gDNA) seguindo o protocolo de fenol : clorofórmio de Gilbert et al. (2007). Com auxílio de pistilos, as amostras foram maceradas em 400 μ L de solução tampão de digestão (100 mM Tris Buffer, 100 mM NaCl, 3 mM de CaCl_2 , 2% SDS), 4 mM ditioneitol (DTT) e 15 μ L de solução de proteinase K a 20 mg/mL e incubadas a 55°C *overnight*.

Posteriormente, um volume de 400 μ L de fenol foi adicionado à amostra para homogeneização em vórtex até a formação de emulsão. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 14.600 g por 5 min para a separação das fases, sendo a fase superior (contendo o gDNA) transferida para um novo tubo e adicionados 400 μ L de clorofórmio. A amostra foi homogeneizada em vórtex e centrifugada (14.600 g x 5 min), sendo o processo repetido uma vez. Um volume de 400 μ L de isopropanol gelado e 100 μ L de 3 mM acetato de sódio (pH 5,2) foram adicionados ao sobrenadante coletado. A amostra foi misturada em vórtex e armazenada a -80°C por 40 min, seguida de centrifugação (16.000 g x 30 min x 4°C) para a coleta do sedimento. O sedimento obtido foi lavado com 1mL de 85% etanol gelado e recoletado após centrifugação (16.000 g x 10 min x 4°C).

Esse processo se repetiu duas vezes. Ao término das lavagens as amostras foram mantidas em temperatura ambiente para completa evaporação do etanol. O sedimento foi ressuspensão em 30 μ L de água tratada com 0,01% de pirocarbonato dietílico (DEPC) e as amostras armazenadas a -20°C até a sua utilização. A integridade, qualidade e pureza do DNA extraído foram avaliadas por eletroforese em gel de agarose a 0,8% (p/v), contendo 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de brometo de etídio em

tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA, pH 7,2) a 5 V/cm, para posterior visualização em transiluminador UV acoplado a fotodocumentador, bem como pela obtenção da razão das leituras de absorbância a 260 e 280 nm por espectrofotometria.

3.3.1. Frequência de ocorrência de infecção bacteriana da vesícula seminal de machos de *E. heros*

As amostras de gDNA obtidas foram submetidas a reações diagnósticas de PCR para a detecção de infecções da vesícula seminal de machos de *E. heros* por bactérias. Para as reações diagnósticas foram utilizados iniciadores universais para a detecção de eubactérias (Eub338: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG; Eub518: ATTACCGCGGCTGCTGG) (Amann et al. 1990), bem como para a detecção de duas bactérias (LII-WS-Eh91c e LII-WS-Eh24a) anteriormente descritas como sendo associadas à vesícula seminal de *E. heros* (Scopel e Cònsoli, 2018).

Para a realização de PCR diagnóstico dessas bactérias, as sequências do gene 16S do RNA ribossomal disponíveis no genbank (LII-WS-Eh91c: número de acesso MH172487; LII-WS-Eh24a: número de acesso MH172483) foram utilizadas para o desenvolvimento de iniciadores senso específicos para cada uma das bactérias alvo, LII-WS-Eh91c (*Staphylococcus sciuri*; EH91c-370: CTCTGTTGTTAGGGAAGAAC) e LII-WS-Eh24a (*Yokenella regensburgei*; EH24a-371: ACTTTCAGCGAGGAGGAA GG). Os iniciadores senso específicos foram utilizados em conjunto com o iniciador reverso universal Eub518, mencionado anteriormente.

As amplificações diagnósticas foram realizadas com o sistema comercial GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega™), sendo as reações compostas por 1x Green GoTaq buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTPs, 0,32 μM iniciador senso e antissenso, 0,5 unidade de GoTaq DNA Polimerase, 1 μL de gDNA e água livre de nuclease para um volume final de 25 μL de reação. As reações foram realizadas a 95°C por 2 min (1 ciclo); 95 °C por 30s, temperatura de anelamento adequada à temperatura de dissociação (T_m) de cada conjunto de iniciadores por 60s, 72 °C por 1 min (35 ciclos); seguido de 1 ciclo a 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 μg/mL de brometo de etídio em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 7,2) a 5 V/cm e visualizado em transiluminador de ultravioleta (UV) acoplado a foto-

documentador.

Amostras classificadas como contendo (1) ou não (0) infecção por bactérias pela análise dos amplicons produzidos nas amplificações diagnósticas após a resolução deles em géis de agarose. O padrão de amplicons obtido em cada amostra permitiu reconhecer vesículas que apresentavam infecções únicas ou conjuntas por *Staphylococcus sciuri* e *Yokenella regensburgei* ou ainda que apresentavam infecção por outro tipo de eubactéria. A ocorrência de infecções na vesícula seminal de machos de *E. heros* foi avaliada para machos virgens após 3, 6, 9 e 12 dias da emergência, machos que realizaram de 1 a 4 cópulas, e machos que copularam uma única vez com fêmeas virgens ou com fêmeas previamente copuladas por 2 ou 3 machos.

3.3.2. Análise quantitativa da microbiota bacteriana associada à vesícula seminal de machos de *E. heros* acasalados

A abundância das principais bactérias que infectam a vesícula seminal de machos de *E. heros*, *Yokenella regensburgei* e *Staphylococcus sciuri*, foi determinada por PCR quantitativo utilizando-se de amostras de gDNA da vesícula seminal proveniente de machos que realizaram cópulas repetidas. Os iniciadores utilizados nas reações de qPCR para *S. sciuri* e *Y. regensburgei* foram os mesmos utilizados nas reações de PCR diagnóstico. As amplificações de qPCR foram conduzidas nas seguintes condições: 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 20 s e 72°C por 20 s e 60°C, usando reações contendo 1 µL de gDNA; 5 µL de SYBR Green qPCR 2x Master Mix; 0,2 µL de cada de cada iniciador (senso e antissenso) (12,5 µmol) e água livre de nuclease para completar o volume final de reação de 10 µL. Todas as reações foram executadas no sistema Applied Biosystems ViiATM7 Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster, CA). Cada amostra analisada (repetição biológica) contou com a utilização de triplicata técnica.

Os valores médios de Ct obtidos para cada bactéria alvo foram submetidos a análises de normalidade e heterocedasticidade, antes de serem submetidos a análise de variância não paramétrica (teste Kruskal-Wallis), sendo as médias comparadas pelo teste de Dunn ($z < 0,05$).

3.4. Análise do padrão proteico da hemolinfa e da expressão do gene da vitelogenina em fêmeas de *E. heros* ao longo dos períodos de pré e pós-cópula

Análises do padrão proteico quantitativo e qualitativo da hemolinfa e da expressão do gene da vitelogenina no tecido adiposo de fêmeas de *E. heros* foram realizadas ao longo da fase de pré-cópula (1, 3, 6 e 10 dias após a emergência - DAE) e de pós-cópula (1, 2, 3 e 10 dias após a cópula - DAC).

A coleta de hemolinfa foi realizada por um pequeno orifício na superfície do corpo do inseto. Foram coletados 4 μ L de hemolinfa, os quais foram imediatamente adicionados a 36 μ L solução anticoagulante refrigerada (98 mM NaOH, 0,19 M NaCl, 1,5 mM EDTA, 46 mM ácido cítrico, pH 4,5, em água DEPC). As amostras foram centrifugadas (2.000 g x 2 min), o sobrendante obtido foi coletado e armazenado a -20°C, para análises posteriores do padrão quantitativo e qualitativo das proteínas da hemolinfa de *E. heros*. Após a coleta da hemolinfa, as fêmeas foram imediatamente dissecadas em solução aquosa de NaCl a 0,85% para a extração do tecido adiposo, o qual foi coletado diretamente em 1mL de TRIzol® e imediatamente armazenado a -80°C para a posterior extração do RNA total, para posterior determinação da expressão do gene da vitelogenina.

3.4.1. Análise quantitativa das proteínas totais na hemolinfa de fêmeas adultas de *E. heros*

A concentração total de proteínas na hemolinfa de *E. heros* foi avaliada pelo teste colorimétrico de Bradford, utilizando o produto comercial Pierce™ Coomassie Plus (Thermo Scientific™).

Em cada poço de uma placa de poliestireno de 96 poços foi adicionado 10 μ L de amostra e 300 μ L do reagente Coomassie Plus. As amostras foram agitadas por 30s, incubadas por 10 min em temperatura ambiente e submetidas a leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro Epoch™ Microplate Spectrophotometer.

A concentração de proteínas nas amostras foi determinada utilizando-se de curva-padrão produzida com soro de albumina bovina, assim como recomendado pelo fabricante. Cada ponto amostral contou com dez repetições (1 repetição = 1 fêmea). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo os dados submetidos à análise de variância (ANOVA) após análise da normalidade pelo teste

de Shapiro-Wilk e heterocedasticidade pelo teste de Bartlett, sendo as médias comparadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

3.4.2. Análise qualitativa de proteínas na hemolinfa de fêmeas adultas de *E. heros*

As alterações qualitativas na hemolinfa de fêmeas de *E. heros* foram avaliadas pela observação do padrão eletroforético determinado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) em sistema de gel descontínuo com dodecilsulfato de sódio (SDS), sendo utilizado gel de empacotamento a 5% e gel de separação a 7,5%, utilizando o equipamento Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems (Bio-Rad).

Cada gel de separação foi preparado utilizando 2,5 mL da solução A (30% acrilamida; 0,8% bis-acrilamida), 2,5 mL da solução B (2M Tris HCl pH 8.8; 10% SDS), 5 mL dH₂O, 50 µL de solução aquosa de persulfato de amônio a 10% e 5 µL de tetrametiletenodiamina (TEMED). A solução do gel de separação foi aplicada no conjunto de placas e cobertos com dH₂O até sua total polimerização. Posteriormente, foi preparado o gel de empacotamento utilizando 0.67 mL da solução A, 1mL da solução C (1M Tris HCL pH6.8; 10% SDS) e aplicado sobre o gel de separação. Em seguida, o molde tipo pente foi encaixado no gel de empacotamento para a formação dos poços das amostras. Volume adequado das amostras foi misturado ao tampão 4x da amostra (1 M Tris-HCL, pH 6.8; 1g SDS; 0,1% azul de bromofenol blue; 100% glicerol; 14.3 M β-mercaptoetanol), correspondendo a 1,5 µL de hemolinfa. As amostras foram submetidas ao tratamento térmico (95°C x 10 min) seguido por breve centrifugação para coleta do líquido condensado nas paredes do tubo. A separação das proteínas foi realizada em tampão de eletroforese em pH 8.3 (25 mM Tris, 192 mM glicina, 0,1% SDS), em voltagem constante de 100 V. Para a determinação da massa das proteínas, foi utilizado o marcador padrão de peso Broad Range SDS-PAGE Standards (Bio-Rad). As corridas foram interrompidas logo após o marcador de frente atingir o limite inferior do gel. Os géis foram removidos, lavados em água destilada (3x por 5 min) e corados utilizando-se do reagente GelCode™ Blue Stain (24 h), sob agitação constante. Após o período de coloração, os géis foram transferidos para água destilada e lavados (2x por 5 min) para a remoção do excesso de corante e digitalizados para análise. As diferentes bandas reveladas foram identificadas e suas abundâncias determinadas utilizando o

software GelAnalyzer versão 19.1.

O experimento contou com quatro períodos amostrais (1, 3, 6 e 10 dias após a emergência - DAE) para fêmeas em fase de pré-cópula e três períodos amostrais para fêmeas que realizaram a cópula (3, 6 e 10 dias após a cópula - DAC). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 repetições (1 fêmea = 1 repetição), os dados de densidade de proteínas foram submetidos a análise de variância (ANOVA) como não houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos, não foi preciso aplicar um teste post-hoc.

3.4.3 Expressão gênica e disponibilidade de vitelogeninas na fase adulta de fêmeas de *E. heros*

Amostras de tecido adiposo foram maceradas com auxílio de pistilos esterilizados e submetidas à extração de RNA total usando o reagente Trizol, seguindo as orientações do fabricante. Antes da extração a bancada e todas as ferramentas, como pipetas e luvas, foram esterilizadas com etanol 70% e o reagente de descontaminação RNase away™ (Invitrogen™) de forma a deixar livre de RNAases. Após o descongelamento das amostras, foi adicionado um volume de 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol.

As amostras foram agitadas por 15 s e colocadas em temperatura ambiente por 3 min antes da centrifugação (12.000 g x 15 min x 4°C). A fase superior foi transferida para um novo tubo ao qual foi adicionado 500 µL de isopropanol gelado, depois misturado em vórtex e incubado por 10 min em temperatura ambiente e centrifugado (12.000 g x 10 min x 4°C).

O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado duas vezes em 1 mL de 75% etanol gelado e recuperado após centrifugação (7.500 g x 5 min x 4°C). O sedimento obtido foi deixado secar à temperatura ambiente, sendo ressuspenso em 20 µL de água DEPC e armazenado a -80°C até a síntese de sscDNA. A quantidade de RNA foi verificada por obtenção da razão das leituras de absorbância a 260 e 280 nm por espectrofotometria (Epoch™ Microplate Spectrofotometer).

As amostras foram tratadas seguindo o protocolo do produto RQ1 RNase-Free DNase (Promega™) para eliminar qualquer DNA contaminante e uma nova leitura foi feita em espectrofotômetro para a determinação da concentração de RNA total.

Para a reação de síntese de sscDNA foi utilizado o kit Platus Transcriber

RNase H-cDNA First Strand (Sinapse Inc). Um μL de iniciador Oligo(dT)₁₈ foi adicionado a 2 μg de RNA total obtido de *pools* (composto de tecido adiposo de 3 fêmeas) e água DEPC foi adicionada até o volume final de 12 μL para a reação. As amostras foram incubadas a 65°C por 5 min, transferidas ao gelo para a adição de 4 μL de 5x Reaction Buffer, 1 μL RNase Inhibitor (20 U/ μL), 2 μL de dNTP (10mM) e 1 μL da enzima H Minus Transcriptase Reversa (200 U/ μL), totalizando um volume de 20 μL . A amostra foi novamente incubada a 42°C por 60 min, seguido de 70°C por 5 min. Ao final da reação o sscDNA foi armazenado a -20°C para as reações de RT-qPCR.

O sscDNA obtido foi utilizado para a análise do padrão de expressão de dois transcritos (Eh2229 e Eh8055) identificados putativamente como vitelogenina (Vg), os quais foram recuperados do transcrito de *E. heros* disponível no Laboratório de Interações em Insetos (USP/Esalq). Iniciadores específicos para os transcritos de Vg Eh2229 (Eh2229vg2_4122: CGCTCCTTGTTATCCTAAGG; Eh2229vg2_4299: GGTCTTTCCTTCAACTTCCG) e Eh8055 (Eh8055vg2_2063: CTGACACCCCTGAAATTTCG; Eh8055vg2_2149: GCTGTGCCACTGATTGAAG) foram desenhados e analisados utilizando os programas Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), Oligo Analyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyze>) e PCR Primer Stats (https://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html). Os iniciadores (Ef-1 α _174: TGCGGTGGTATTGACAAGAG; Ef-1 α _284: GTTTGTCAAGAACCCAAGCG) do gene do fator de alongamento 1 alpha (EF-1 α) relatados por Li et al. (2013), foram utilizados para a amplificação deste gene, o qual foi utilizado como gene de referência para a normalização das amplificações obtidas para os genes de interesse.

As amostras de sscDNA foram analisadas em três repetições biológicas (repetição biológica = tecido adiposo de fêmea) e em triplicata técnica. As reações de qPCR foram conduzidas nas seguintes condições; 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 s, 60°C por 20 s e 72°C por 20 s e 62°C, usando reações contendo 2,5 de sscDNA, 1X de GoTaq® qPCR Master (5 μL), 12,5 μMol de cada iniciador (senso e antissenso) (0,2 μL de cada), 0,3 μMol CXR Reference Dye (0,1 μL) e água livre de nuclease para completar o volume final de reação em 10 μL . Todas as reações foram executadas em um sistema Applied Biosystems ViiA™7 Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster, CA).

Para determinar o nível de expressão relativa (normalizado) do gene da

vitelogenina, foi usado o modelo de eficiência calibrada proposto por Pfaffl (2001). Os valores médios de Ct de cada reação violaram os pressupostos para homogeneidade (p-valor= 0.01528 pelo teste de Bartlett) e com isso o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado para identificar possível diferenças na quantidade de Vg expressa entre os tratamentos.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do número de cópulas na aptidão reprodutiva de fêmeas de *E. heros*

4.1.1. Cópulas repetidas

A fecundidade, fertilidade e longevidade das fêmeas de *E. heros* não foi afetada pelo número de cópulas repetidas realizadas (Tabela 1). No entanto, foi possível verificar que o número de cópulas realizadas por *E. heros* afetou o ritmo diário de postura de fêmeas, sendo que fêmeas que realizaram uma única cópula atingiram 50% da sua fecundidade total apenas 21 dias após a cópula, enquanto as fêmeas que realizaram mais de uma cópula depositaram 50% do total de ovos produzidos entre 13 e 16 dias após a cópula (Figura 2).

Tabela 1. Parâmetros biológicos de fêmeas de *E. heros* que realizaram número variável de cópula com um único macho (cópula repetida)

Nº de cópulas	Fecundidade (ovos/fêmea)	Fertilidade% (ovos viáveis)	Longevidade (dias)
1	82,0±71,5a	17,8±14,5b	60,0±34,1a
2	58,3±64,5a	14,0±23,3ab	51,1±34,8a
3	90,7±81,3a	23,0±22,1a	56,9±30,5a
4	97,4±67,3a	14,3±19,8ab	59,5±34,1a

Média±desvio padrão seguidos por letras na coluna diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$)

4.1.2. Cópulas múltiplas

A realização de cópulas múltiplas interferiu na aptidão reprodutiva de fêmeas de *E. heros* (Tabela 2). Fêmeas que copularam com até quatro machos diferentes foram mais fecundas e longevas do que as fêmeas que realizaram número menor de cópulas (Tabela 2). Análises do ritmo diário de postura indicam que as fêmeas que realizaram apenas uma cópula tiveram interrupção do seu período de oviposição aos 75 dias após a cópula, enquanto as fêmeas que realizaram maior número de cópulas estenderam o seu período de oviposição até próximo a 100 dias após a cópula (Figura 3).

Tabela 2. Parâmetros biológicos de fêmeas de *E. heros* que realizaram número variável de cópulas com machos diferentes (cópula múltipla)

Nº de cópulas	Fecundidade (ovos/fêmea)	Fertilidade% (ovos viáveis)	Longevidade (dias)
1	65,4±49,0b	20,6±27,2b	42,9±36,9b
2	70,4±68,7b	16,4±18,0b	41,3±33,8b
3	91,0±63,1ab	32,9±16,7a	55,6±31,7ab
4	130,0±57,5a	13,1±15,7b	66,8±24,4a

Média±desvio padrão seguidos por letras na coluna diferem entre si pelo teste Tukey ($p < 0,05$)

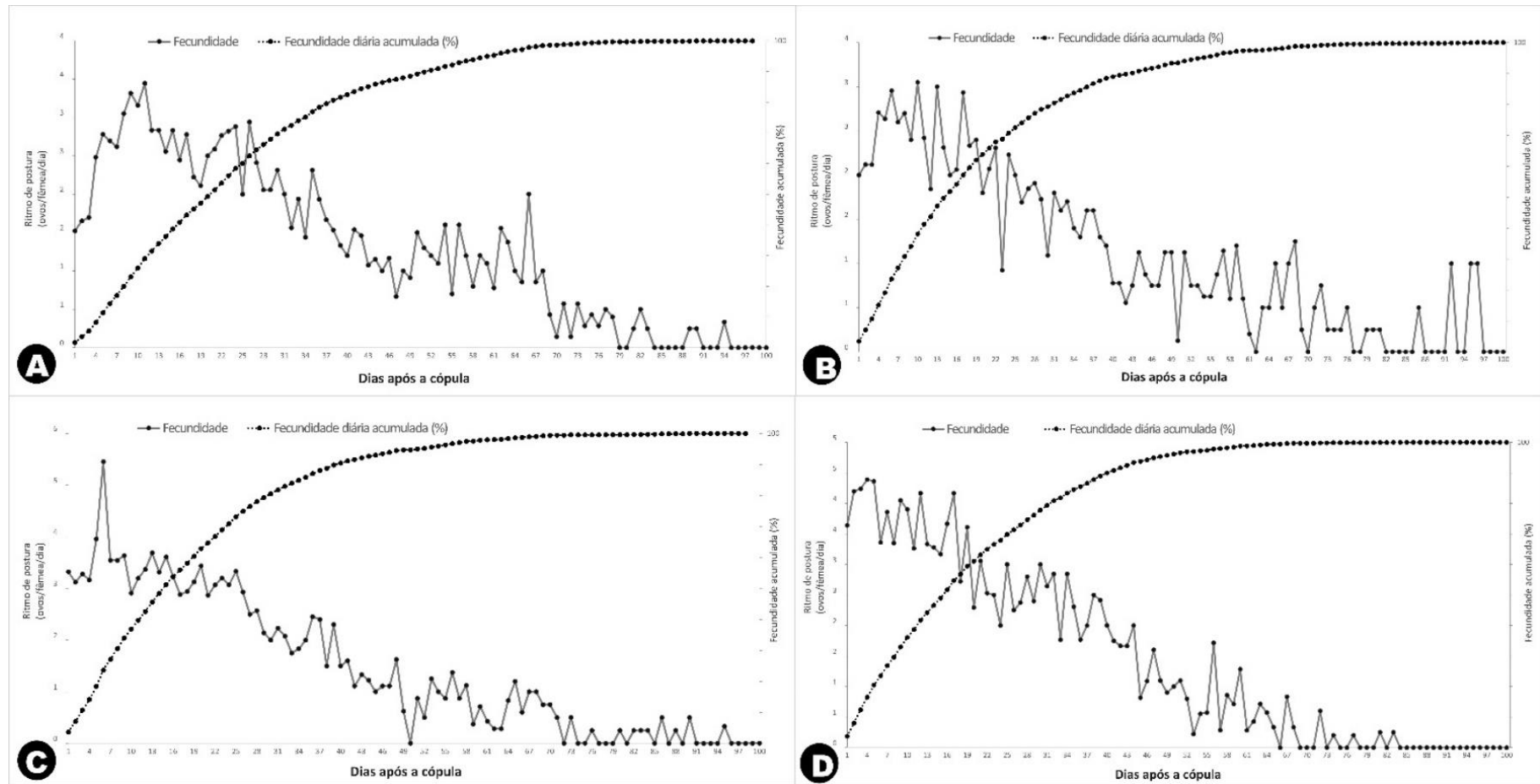


Figura 2. Ritmo de postura diário e velocidade de reprodução (fecundidade diária acumulada) de fêmeas de *Euschistus heros* que realizaram número variável de cópulas com o mesmo macho ($25\pm 1^\circ\text{C}$; $60\pm 10\%$ UR; fotofase 12h). A) uma cópula, B) duas cópulas, C) três cópulas, D) quatro cópulas.

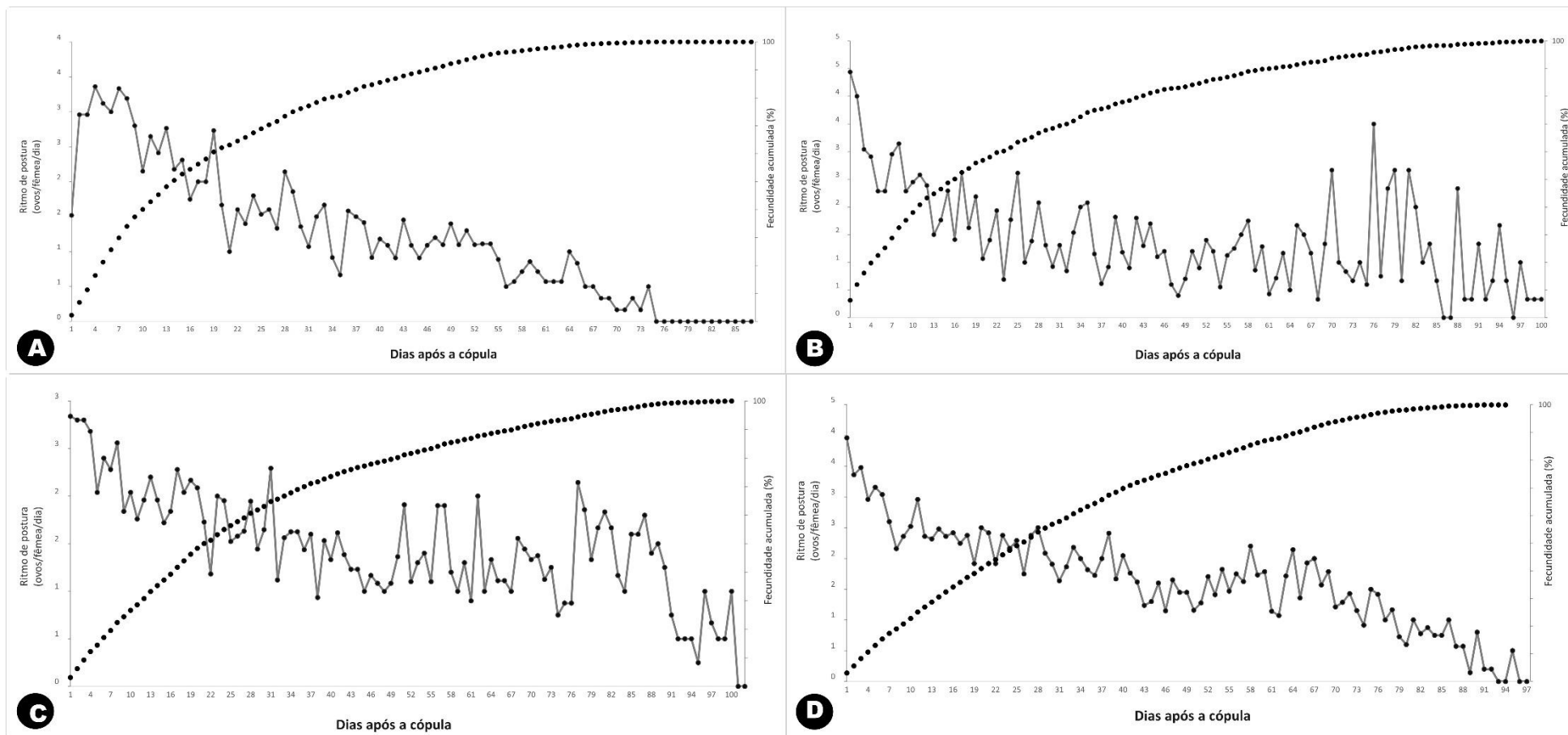


Figura 3. Ritmo de postura diário e velocidade de reprodução (fecundidade diária acumulada) de fêmeas de *Euschistus heros* que realizaram número variável de cópulas com machos diferentes ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$; $60\pm 10\%$ UR; fotofase 12h). A) uma cópula, B) duas cópulas, C) três cópulas, D) quatro cópulas.

4.2 determinação da infecção da vesícula seminal de machos de *E. heros* por bactérias

4.2.1 PCR diagnóstico para detecção de infecções em machos de *E. heros*

A vesícula seminal de machos apresenta infecção latente por bactérias, visto que 100% dos machos virgens de diferentes idades analisados testaram positivo para infecção bacteriana em sua vesícula seminal. A infecção da vesícula é dada predominantemente pelas bactérias *Y. regensburgei* e *S. sciuri*, que podem ocorrer em infecções únicas ou duplas. Há também outras bactérias que infectam a vesícula seminal de machos na ausência de infecções por *Y. regensburgei* e *S. sciuri*. As análises também demonstram que a infecção conjunta da vesícula por *Y. regensburgei* e *S. sciuri* se torna mais frequente em idades mais tardias dos machos, com a consequente redução da frequência de infecções por eubactérias distintas de *Y. regensburgei* e *S. sciuri* (Figura 4).

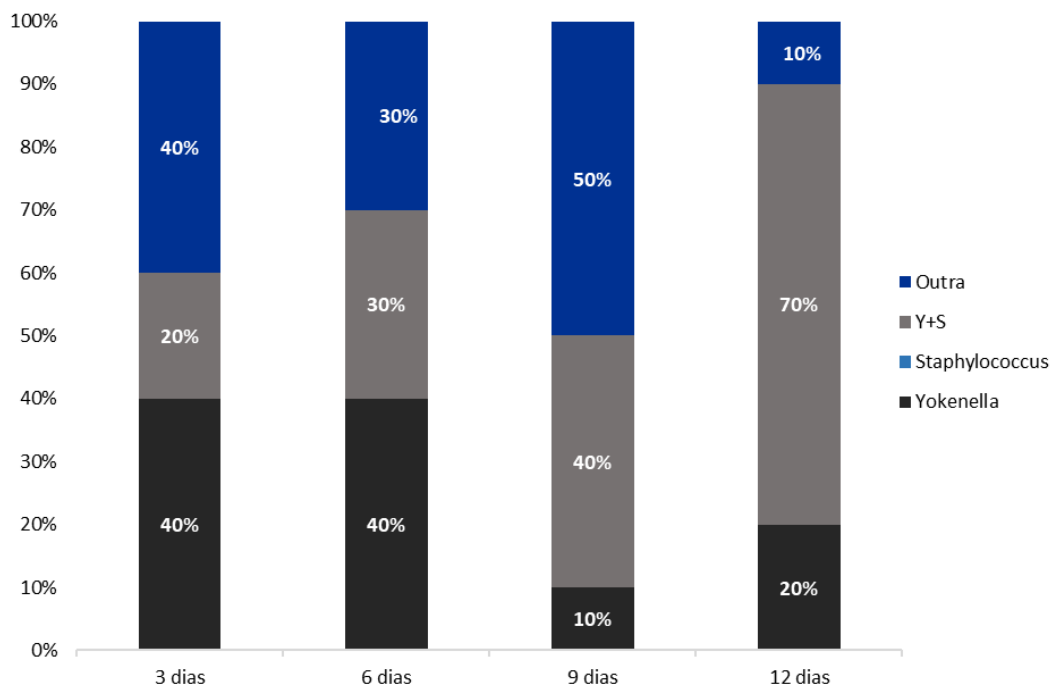


Figura 4. Abundância relativa de bactérias *Yokenella regensburgei* e *Staphylococcus sciuri* em machos de *Euschistus heros* virgens (3, 6, 9 e 12 dias de vida)

A frequência e o padrão de infecção da vesícula seminal de machos de *E. heros* não foram afetados pela realização de um número distinto de cópulas. Machos que realizaram de 1 a 4 cópulas apresentaram 100% de infecção da vesícula seminal, sendo as infecções únicas ou duplas por *Y. regensburgei* e *S. sciuri* as

mais frequentes (Figura 5). Isso foi observado para aqueles machos que realizaram uma única cópula, mas que copularam com fêmeas previamente copuladas por 2 ou 3 machos (Figura 6). Nesse caso, o único aspecto a ter chamado a atenção foi a ausência de infecções únicas por *Y. regensburgei* em machos que copularam com fêmeas previamente copuladas com 3 machos e o avanço progressivo de infecções duplas da vesícula com *Y. regensburgei* e *S. sciuri* à medida que machos copulam com fêmeas previamente copuladas. O índice de infecções duplas passou de 51% nos machos que copularam com fêmeas virgens para 96% nos machos que copularam com fêmeas previamente copuladas com 3 machos (Figura 6).

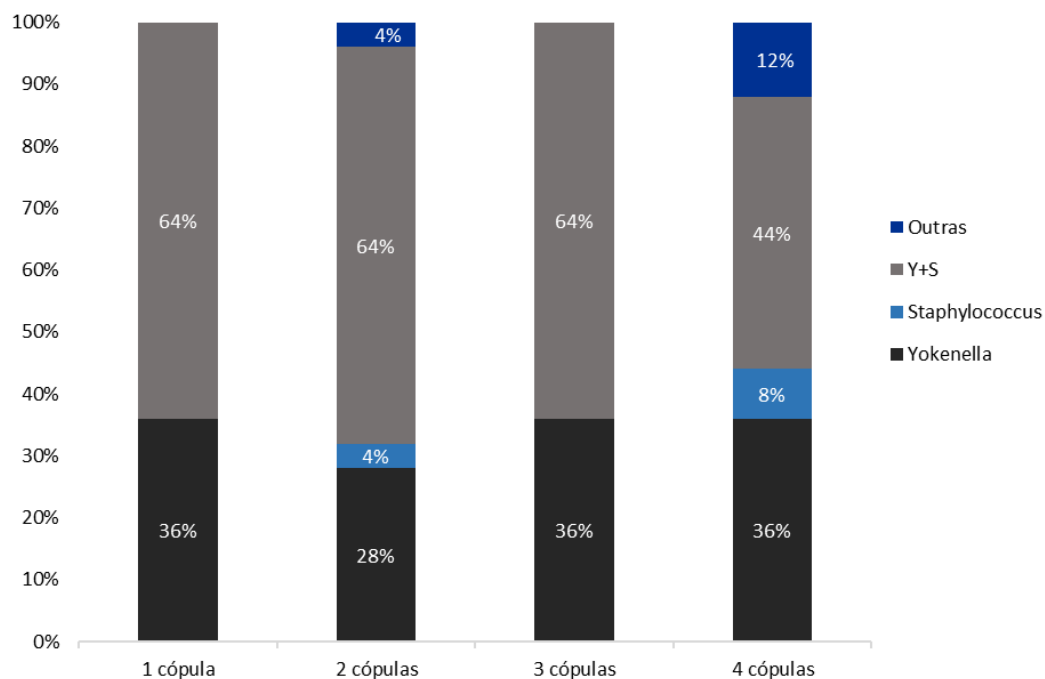


Figura 5. Abundância relativa de bactérias *Yokenella regensburgei* e *Staphylococcus sciuri* em machos de *Euschistus heros* que realizaram cópula com a mesma fêmea (cópula repetida).

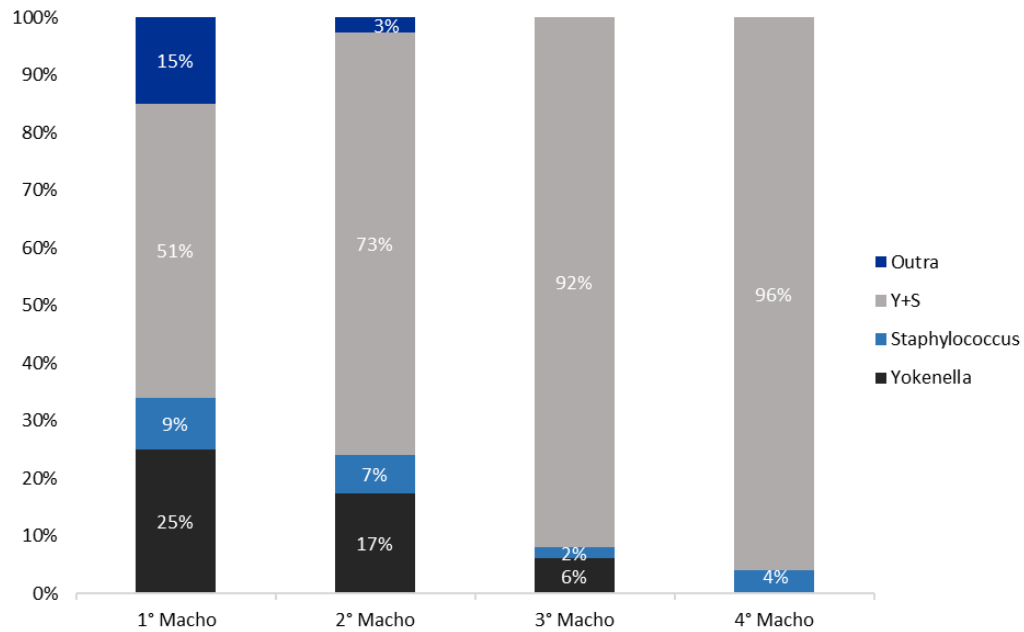


Figura 6. Abundância relativa de bactérias *Yokenella regensburgei* e *Staphylococcus sciuri* em machos de *Euschistus heros* que copularam pela 1ª, 2ª, 3ª e 4ª vez com fêmeas de *Euschistus heros* pré-acasaladas.

4.2.2 Análise quantitativa da microbiota bacteriana associada à vesícula seminal de machos de *E. heros* acasalados

A abundância relativa de *Y. regensburgei* (24a) e *S. sciuri* (91c) na vesícula seminal de machos que realizaram de 1 a 4 cópulas. Os valores de Ct obtidos para cada uma das bactérias demonstra a maior abundância de *Y. regensburgei* em relação a *S. sciuri* na vesícula seminal de machos de todos os tratamentos analisados. Os dados obtidos também indicam uma grande variação na intensidade de infecção da vesícula entre machos de diferentes tratamentos. relativos dos dados da bactéria 24a não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Kruskal-Wallis ($X^2=2.192$; p-valor =0.5334) (Figura 7). Enquanto os Ct's para a bactéria 91c apresentaram diferença pelo teste Kruskal-Wallis ($X^2=7.8986$; p-valor = 0.04815), um teste post-hoc de Dunn foi aplicado e machos que copularam duas vezes diferiram estatisticamente de machos que copularam quatro vezes (teste $z=0.0414$).

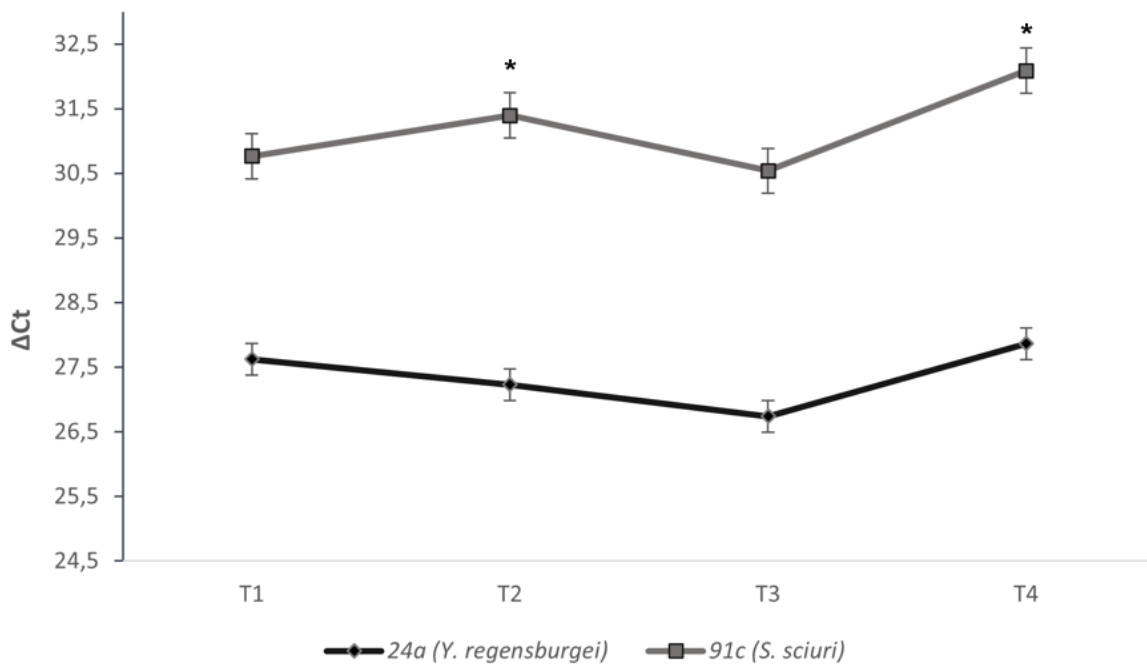


Figura 7. Quantificação relativa de bactérias do gene 24a (*Yokenella regensburgei*) e do gene 91c (*Staphylococcus sciuri*) provenientes da vesícula seminal de machos de *Euschistus heros* que realizaram cópula com a mesma fêmea. (*) indica diferença entre as médias pelo teste Dunn ($z=0.0414$).

4.3 Análise quantitativa de proteínas na hemolinfa de fêmeas adultas de *E. heros*

A concentração total de proteínas na hemolinfa de fêmeas durante a fase de pré-cópula é bastante variável, ocorrendo um pico aos 6 DAE, o qual é seguido por um declínio aos 10 DAE. Após esse período há um incremento na concentração total de proteínas até 3 DAC, quando a concentração total de proteínas na hemolinfa se aproxima ao maior valor observado aos 6 DAE. A concentração total de proteínas se mantém elevada nos períodos posteriores da pós-cópula observados, ocorrendo apenas pequena oscilação na concentração total de proteínas (Figura 8).

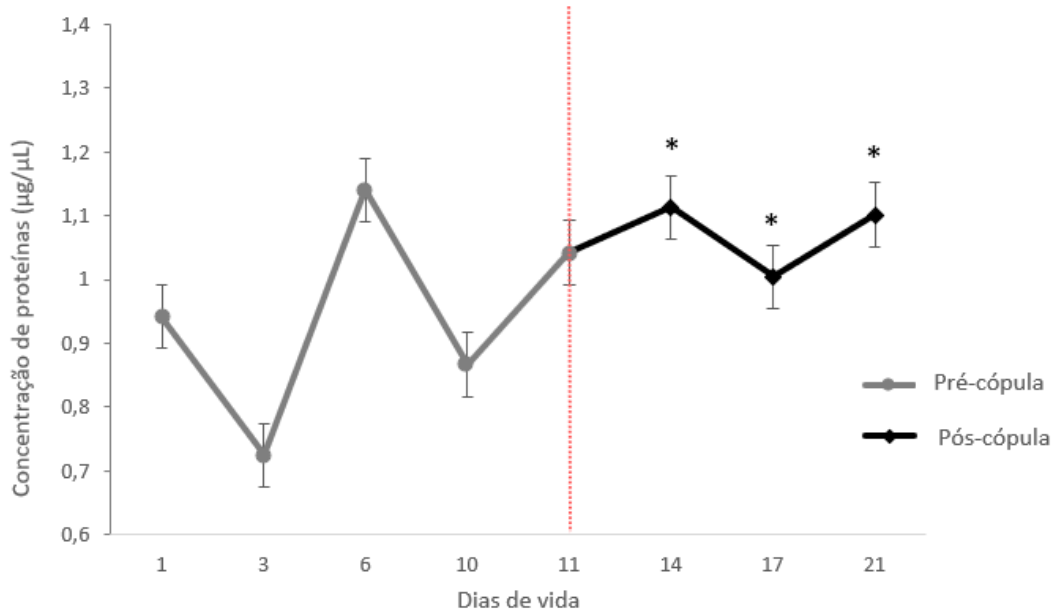


Figura 8. Concentração de proteínas totais ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) disponíveis na hemolinfa de fêmeas de *Euschistus heros* nos períodos de pré-cópula (1, 3, 6 e 10 dias após a emergência) e pós-cópula (1, 3, 6 e 10 dias após a cópula).

4.4 Análise qualitativa de proteínas na hemolinfa de fêmeas adultas de *E. heros*

A análise qualitativa da composição proteica da hemolinfa de fêmeas de *E. heros* durante os períodos de pré- e pós-cópula demonstrou haver diferenças qualitativas e quantitativas para as diferentes proteínas detectadas (Figura 9). Foram observadas oito proteínas que ocorreram consistentemente na hemolinfa de fêmeas ao longo das fases de pré e de pós-cópula. As proteínas observadas variaram de 36 a 231 kDa, sendo as mais abundantes na hemolinfa aquelas de 77 e 49 kDa, as quais representaram cerca de 50% do conteúdo relativo das proteínas disponíveis na hemolinfa (Figura 10). Apenas três proteínas, a de 36, 111 e de 174 kDa apresentaram aumento na sua abundância relativa à medida que a fêmea passou da fase de pré- para a fase de pós-cópula (Figura 10).

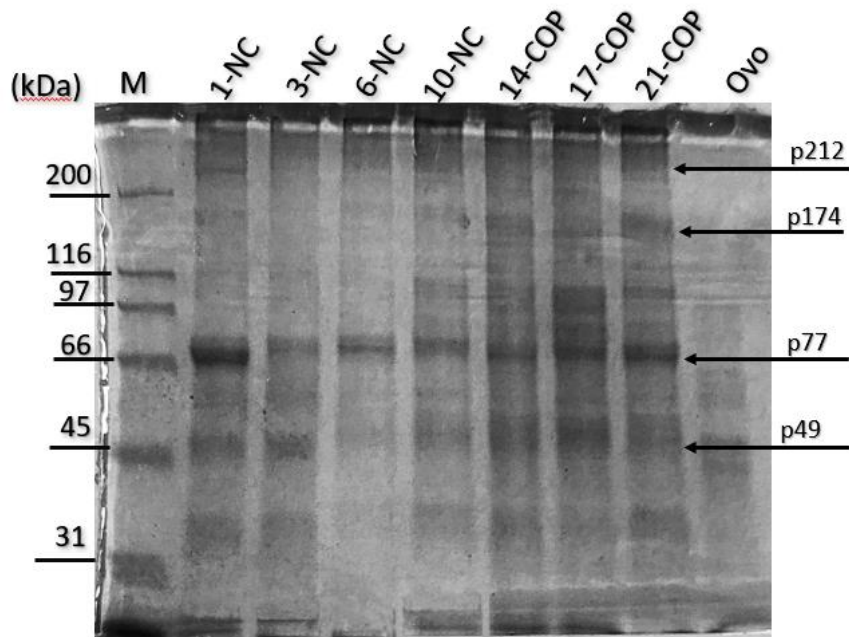


Figura 9. – Padrão proteico da hemolinfa de fêmeas de *Euschistus heros* em período de pré-cópula (1, 3, 6, 10 dias) e pós-cópula (14, 17, 21 dias) determinado em 7,5% SDS-PAGE. Marcador molecular - (M); Fêmea não-copulada de 1 dia de vida (1-NC); Fêmea não-copulada de 3 dias de vida – (3-NC); Fêmea não-copulada de 6 dias de vida - (6-NC); Fêmea não-copulada de 10 dias de vida - (10-NC); Fêmea copulada de 14 dias de vida – (14-COP); Fêmea copulada de 17 dias de vida – (17-COP); Fêmea copulada de 21 dias de vida – (21-COP); Ovo.

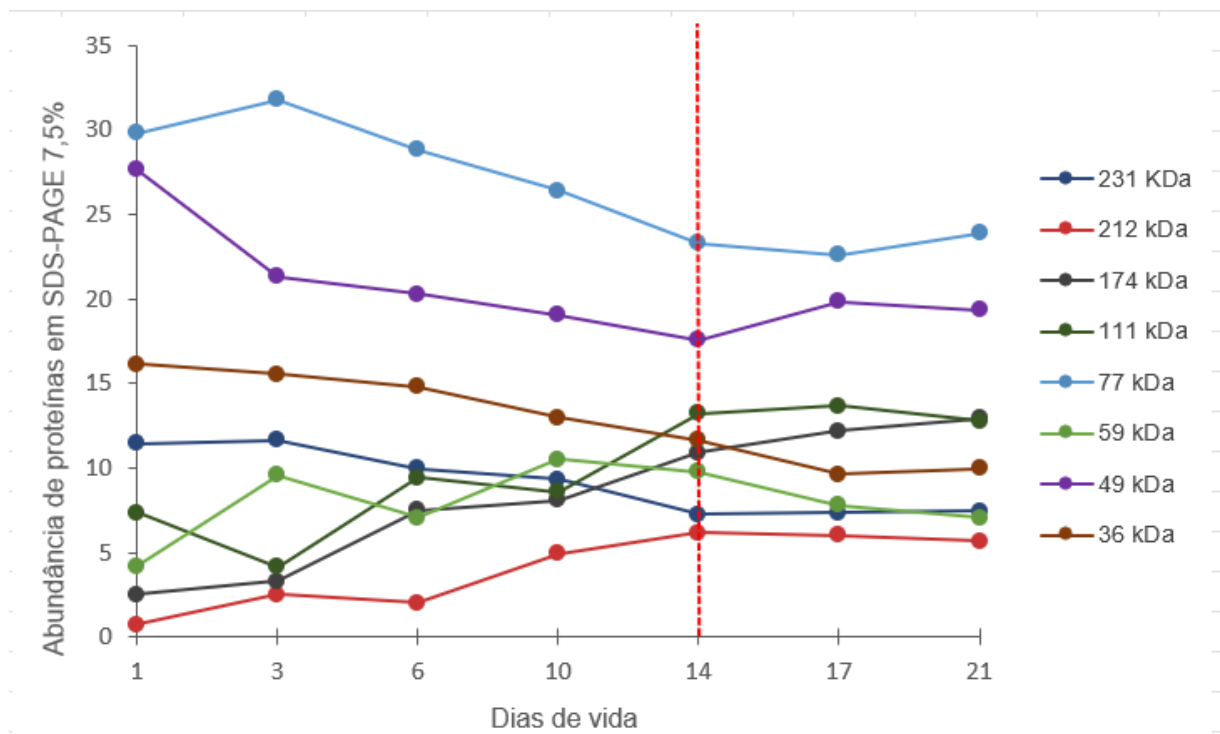


Figura 10. Abundância de proteínas detectadas em gel SDS-PAGE 7,5% na hemolinfa de fêmeas de *Euschistus heros* em período de pré-cópula (1, 3, 6, 10 dias) e pós-cópula (14, 17, 21 dias)

4.5 Expressão dos genes de vitelogeninas

Os valores de expressão do gene da vitelogenina 2 (*Vg2*) de *E. heros* são apresentados em relação a expressão desse gene obtida para fêmeas aos 1 DAE. Os valores de expressão observados indicam uma menor expressão do *Vg2* em todos os períodos analisados quando comparados à expressão observada aos 1 DAE. A expressão do *Vg2* decresce progressivamente no período de pré-cópula da emergência até 3 DAC, momento em que a expressão volta a sofrer incremento, atingindo o valor máximo de expressão observado aos 10 DAC (Figura 11).

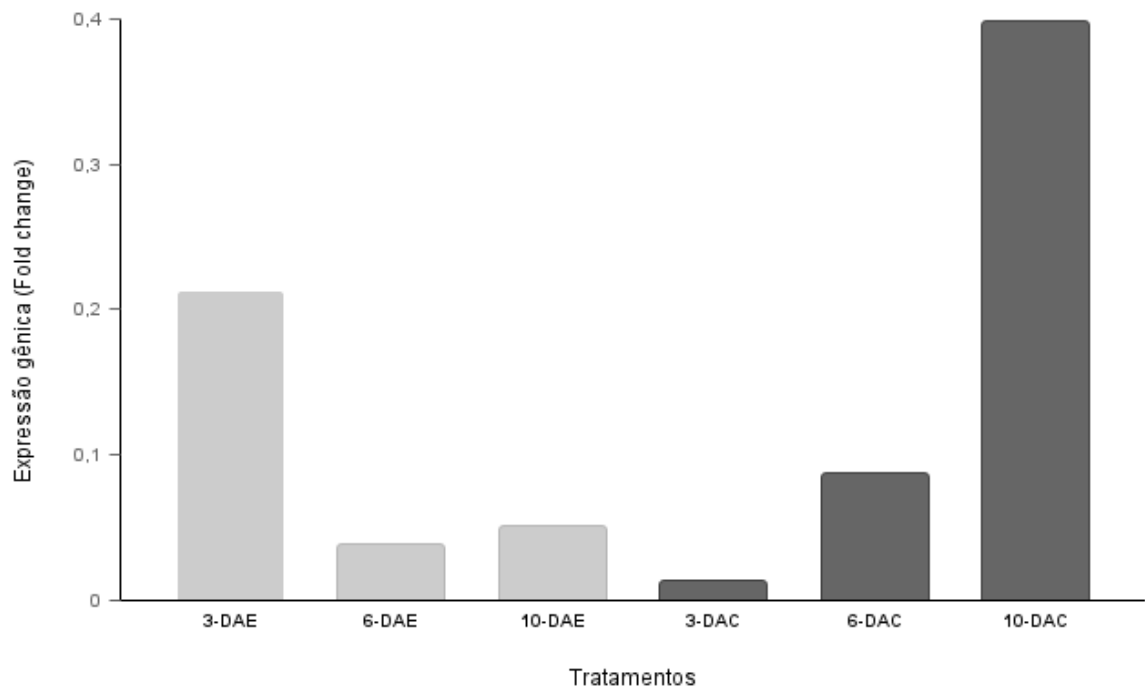


Figura 11. Expressão do gene da vitelogenina 2 no tecido adiposo de fêmeas de *Euschistus heros* durante os períodos de pré- (3-DAE; 6-DAE e 10-DAE) e pós-cópula (3-DAC; 6-DAE e 10-DAE).

5 DISCUSSÃO

As estratégias de reprodução adotadas por insetos são bastante variáveis e dependem da história evolutiva dos diferentes grupos de insetos e as decisões de alocação de recursos para o desenvolvimento dos tecidos somáticos e reprodutivos (Awmack e Leather 2002). O número de cópulas é um dos fatores a influenciar a fisiologia da reprodução de fêmeas de insetos, podendo trazer benefícios ao sucesso reprodutivo ou adicionar custos à reprodução, reduzindo a aptidão reprodutiva de fêmeas (Arnqvist e Nilsson 2000; Jennions e Petrie 2000).

Fêmeas de *E. heros* não apresentaram alterações significativas em atributos biológicos relacionados à sua aptidão reprodutiva ao realizar até quatro cópulas repetidas, mas apresentou fecundidade e longevidade aumentadas ao realizar cópulas com múltiplos machos. A ausência de benefícios ou custos associados a eventos repetidos de cópula em *E. heros* diferem dos efeitos observados para *Nezara viridula* (Fortes e Consoli 2011), em que fêmeas apresentaram redução em sua aptidão reprodutiva com a realização de inúmeras cópulas repetidas. A aptidão reprodutiva de fêmeas de *E. heros* copuladas com machos distintos são semelhantes aos encontrados por Arnqvist e Nilsson (2000), que comprovaram que as fêmeas ganham diretamente com os múltiplos acasalamentos em termos de aumento da produção de descendentes ao longo da vida apesar do efeito negativo na longevidade. Worthington e Kelly (2016) verificaram que as fêmeas de *Gryllus texensis* (Orthoptera: Gryllidae), ao realizarem acasalamentos múltiplos, apresentaram um período de oviposição mais longo em relação as fêmeas com uma única cópula. No entanto, algum aspecto da fisiologia e/ou do comportamento do inseto interfere na contribuição feita em cópulas repetidas com o mesmo macho, visto que nesse caso não foi observado nenhum benefício a reprodução das fêmeas após a realização de várias cópulas, sugerindo que a capacidade que os machos apresentam de contribuir com nutrientes através da transferência de fluido seminal está restrita à sua primeira cópula. Durante a realização dos experimentos de cópula foi observado que fêmeas aceitavam a realização de uma segunda cópula com o mesmo macho mais rapidamente do que com um macho diferente, rejeitando até mesmo o comportamento de corte realizado pelo macho. Alterações no comportamento de aceitação de novos parceiros para a realização de cópulas podem ocorrer devido a transferência de compostos moduladores da fisiologia de fêmeas junto ao ejaculado. Esses compostos podem, por exemplo, inibir a

receptividade sexual de fêmeas a qual é desejável para garantir o sucesso reprodutivo dos machos por evitar competição espermática, garantindo assim que os espermatozoides transferidos tenham sucesso na fertilização dos oócitos a serem depositados pelas fêmeas (Simmons 2002; Wigby e Chapman 2004; Kvarnemo e Simmons 2013). No entanto, esses compostos moduladores não explicariam os benefícios encontrados com a realização de cópulas múltiplas e a ausência desses benefícios em fêmeas que realizaram cópulas repetidas.

Em ambos os experimentos de cópula realizados, a fertilidade observada para fêmeas de *E. heros* foi muito reduzida (Turelli 1994; Eady e Jackson 2000; Knell e Webberley 2004). A baixa fertilidade observada para fêmeas de *E. heros*, independentemente do número de cópulas realizadas, pode estar associada à transferência de microrganismos que infectam a vesícula seminal de machos desse inseto, assim como observado por Robert e Webberley (2004) que demonstraram que doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) podem reduzir a fertilidade e aumentar a mortalidade do hospedeiro. Duas espécies de bactéria se mostraram como agentes infecciosos comuns da vesícula seminal de *E. heros*, *Y. regensburgei* e *S. sciuri*. Essas bactérias ocorreram em praticamente todas as vesículas seminais analisadas, seja de machos virgens ou machos que realizaram número distinto de cópulas.

Yokenella regensburgei é uma bactéria Gram-negativa da família Enterobacteriaceae que já foi encontrada no intestino médio de *Pyrrhocoris apterus* (Kosakaro et al. 1984), em *Boisea trivittata* (Say, 1825) (Heteroptera: Rhopalidae) (Meyers e Leigh 2020) e em *Reticulitermes chinensis* Snyder (Isoptera: Rhinotermitida) (Fang et al. 2016). Em *R. chinensis*, acredita-se que *Y. regensburgei* exerça a função de reciclagem de nitrogênio e degradação de celulose (Fang et al. 2016). *Staphylococcus sciuri* é comum em pulgões (Grigorescu et al. 2018) e pode aumentar as relações de mutualismo entre certas espécies de formigas e pulgões (Fisher et al. 2015), além de adaptar o hospedeiro a diferentes dietas, como em *Diabrotica virgifera* virgifera (LeConte) (Coleoptera: Chrysomelidae) (Chu et al. 2013). No entanto, *Yokenella regensburgei* e *Staphylococcus sciuri* estão associadas a inúmeras espécies de insetos com as quais estabelecem relações patogênicas (Podgwaite et al. 2013; Osborn et al. 2002; Medina et al. 2022).

A vitelogenina faz parte de um grupo importante de proteínas que são sintetizadas extraovarianamente e se tornam a principal proteína da vitelo, a vitelina

(Hagedorn 1979). Em insetos, as vitelogeninas possuem tamanho aproximado de 180 a 200, com subunidades de massa entre 50 e 140 kDa (Raikhel e Dhadialla 1992; Kotaki 2003). Ao analisar o perfil proteico de fêmeas de *E. heros*, observou-se que a expressão do gene da *Vg2* é reativada após a cópula, mesmo sendo a expressão relativa inferior àquela observada no primeiro dia após a emergência. A maior atividade de expressão gênica e o aumento da concentração de proteínas em circulação em preparação para a reprodução também pode ser visto pela maior concentração de proteínas totais na hemolinfa de fêmeas após a realização da cópula. Este resultado pode ser decorrente dos diversos fatores associados à cópula, como a transferência de nutrientes pelos machos durante a cópula (Friedel e Gilliot 1977; Lewis e South 2012) e atuação do hormônio juvenil como regulador da vitelogenina para a produção de ovos (Raikhel et al. 2005; Zhou 2020).

Fêmeas em período de pré-cópula apresentaram durante o seu desenvolvimento oscilações nas quantidades de proteínas em sua hemolinfa, o que gera diversos questionamentos sobre esse comportamento no perfil proteico. Cremonez e colaboradores (2023) mostraram que a oogênese em fêmeas de *E. heros* ocorre independentemente da cópula, servindo também para explicar a oviposição por fêmeas virgens, assim como observado na mosca tsé-tsé (Odhiambo, 19710) e em *Nezara viridula* (Fortes et al. 2011). Esses oócitos não fertilizados sofrem reabsorção no ovário da fêmea, fenômeno esse chamado de oossorção e podem ser explicados pela falta de cópula ou fome (Fortes et al. 2011; Kotaki 2023). Isso explica o comportamento das oscilações nos diferentes períodos de pré-cópula das fêmeas de *Euschistus heros* observadas, apesar de serem mantidas em laboratório em condições controladas e com alimento disponível.

6 CONCLUSÕES

- O número de cópulas repetidas não interfere na aptidão reprodutiva de fêmeas de *Euschistus heros*, mas a realização de cópulas com múltiplos machos interfere positivamente na fecundidade e longevidade de fêmeas;
- A concentração total de proteínas na hemolinfa de fêmeas de *E. heros* aumenta após a realização da cópula;
- A realização da cópula não é necessária para a expressão do gene da vitelogenina 2 em fêmeas de *E. heros*, mas os níveis de expressão da *Vg2* são aumentados após a cópula;
- A vesícula seminal de machos de *E. heros* apresenta *Yokenella regensburgei* e *Staphylococcus sciuri* como as principais bactérias que infectam essa estrutura;
- A infecção da vesícula seminal de machos de *E. heros* por *Yokenella regensburgei* e *Staphylococcus sciuri* independe da realização de cópulas;
- A abundância de *Yokenella regensburgei* na vesícula seminal de machos de *E. heros* é superior àquela de *Staphylococcus sciuri*.

REFERÊNCIAS

Adamo SA, Kovalko I, Easy RH, Stoltz D (2014) A viral aphrodisiac in the cricket *Gryllus texensis*. *Journal of Experimental Biology*, 217:1970-1976. <https://doi.org/10.1242/jeb.103408>

Adams TS (2001) Morphology of the internal reproductive system of the male and female two-spotted stink bug, *Perillus bioculatus* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) and the transfer of products during mating. *Invertebrate Reproduction & Development* 39:45-53. <https://doi.org/10.1080/07924259.2001.9652466>

Aldrich JR (1988) Chemical ecology of the Heteroptera. *Annual Review of Entomology*.33:211-238 <https://doi.org/10.1146/annurev.en.33.010188.001235>

Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl D (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and environmental microbiology* 56:1919-1925. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1919-1925.1990>

Araújo VA, Oliveira AS, Cortes ICH, Viteri DJ, Dias LG (2020) Morphology of the male reproductive tract in two species of phytophagous bugs (Pentatomidae: Heteroptera). *J. Entomol. Zool. Stud*, 8:1608-1614.

Araújo VA, Lino-Neto J, de Sousa Ramalho F, Zanuncio JC, Serrão JE (2011) Ultrastructure and heteromorphism of spermatozoa in five species of bugs (Pentatomidae: Heteroptera). *Micron* 42:560-567. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.02.001>

Arnqvist G, Danielsson I (1999) Copulatory behavior, genital morphology, and male fertilization success in water striders. *Evolution* 53:147-156. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1999.tb05340.x>

Arnqvist G, Nilsson T (2000) The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal behaviour* 60:145-164. <https://doi.org/10.1006/anbe.2000.1446>

Awmack CS, Leather SR (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. Annual review of entomology 47:817-844. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145300>

Baccetti B (1972) Insect sperm cells. In Advances in insect physiology, 9^a ed. Academic Press, Cambridge pp 315-397. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(08\)60279-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60279-9)

Berasategui A, Shukla S, Salem H, Kaltenpoth M (2016) Potential applications of insect symbionts in biotechnology. Applied microbiology and biotechnology, 100: 1567-1577. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7186-9>

Blariza MJ, Leyria J, Canavoso LE, Soria NW, García BA (2016) Dynamics of expression of two vitellogenin genes in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans*: Analysis throughout pre-vitellogenesis and vitellogenesis. Acta tropica, 156:100-107. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.01.004>

Boulton RA, Shuker DM (2016) Polyandry is context dependent but not convenient in a mostly monandrous wasp. Animal Behaviour 112:119-125. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2015.12.001>

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

Chapman T (2001). Seminal fluid-mediated fitness traits in *Drosophila*. Heredity 87: 511-521. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00961.x>

Chu CC, Spencer JL, Curzi MJ, Zavala JA, Seufferheld MJ (2013) Gut bacteria facilitate adaptation to crop rotation in the western corn rootworm. Proceedings of the National Academy of Sciences 110:11917-11922. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301886110>

Cook JL, Balaraman R (2021) Morphological Study Of The Ovipositor Of Three Species Of Pleidae (Insecta: Hemiptera) Using The Scanning Electron Microscope. Texas Journal of Microscopy 52:23-27

Cremones PS, Matsumoto JF, Perier JD, Dunn TP, Pinheiro DO, Neves PM (2023) Morphological and Morphometric Parameters of the Reproductive Organs of

Euschistus heros (Hemiptera: Pentatomidae) Treated With a Sublethal Juvenile Hormone Analog. Journal of Agricultural Science 15:10-28
<https://doi.org/10.5539/jas.v15n3p10>

Cusson M, Yu CG, Carruthers K, Wyatt GR, Tobe SS, McNEIL JN (1994) Regulation of vitellogenin production in armyworm moths, *Pseudaletia unipuncta*. Journal of Insect Physiology 40:129-136. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(94\)90084-1](https://doi.org/10.1016/0022-1910(94)90084-1)

Davey KG (1985) The female reproductive tract. Comprehensive Insect Physiological Biochemistry and Pharmacology 1:15-36.

De Loof A (2011) Longevity and aging in insects: is reproduction costly; cheap; beneficial or irrelevant? A critical evaluation of the “trade-off” concept. Journal of Insect Physiology 57:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.08.018>

Dhadialla TS, Raikhel AS (1990) Biosynthesis of mosquito vitellogenin. Journal of Biological Chemistry, 265:9924-9933. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)38760-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)38760-5)

Dossi FCA, Cônsoli FL (2014). Gross morphology and ultrastructure of the female reproductive system of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). Zoologia 31:162-169. <https://doi.org/10.1590/S1984-46702014000200007>

Eady PE, Wilson N, Jackson M (2000) Copulating with multiple mates enhances female fecundity but not egg-to-adult survival in the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. Evolution, 54:2161-2165. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2000.tb01259.x>

Emlen ST, Oring LW (1977) Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. Science, 197:215-223. DOI: [10.1126/science.327542](https://doi.org/10.1126/science.327542)

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic acids research, 29:45 <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

Fang H, Chen W, Wang B, Li X, Liu SJ, Yang H (2016) Cultivation and characterization of symbiotic bacteria from the gut of *Reticulitermes chinensis*.

Applied Environmental Biotechnology 1:3-12
<http://dx.doi.org/10.18063/AEB.2016.01.004>

Fischer CY, Lognay GC, Detrain C, Heil M, Grigorescu A, Sabri A, Verheggen FJ (2015) Bacteria may enhance species association in an ant–aphid mutualistic relationship. *Chemoecology* 25:223-232. <https://doi.org/10.1007/s00049-015-0188-3>

Feldhaar H (2011) Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecological Entomology* 36:533-543. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2011.01318.x>

Fortes P, Consoli FL (2011) Are there costs in the repeated mating activities of female Southern stink bugs *Nezara viridula*?. *Physiological Entomology*, 36:215-219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2011.00786.x>

Fortes P, Salvador G, Cõnsoli FL (2011) Ovary development and maturation in *Nezara viridula* (L.)(Hemiptera: Pentatomidae). *Neotropical Entomology* 40:89-96. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2011000100013>

Fox CW (1993) Multiple mating, lifetime fecundity and female mortality of the bruchid beetle, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Functional Ecology* 7:203-208. <https://doi.org/10.2307/2389888>

Fox CW, Czesak ME (2000) Evolutionary ecology of progeny size in arthropods. *Annual review of entomology* 45:341-369. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.341>

Friedel T, Gillott C (1977) Contribution of male-produced proteins to vitellogenesis in *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Insect Physiology*, 23:145-151. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(77\)90120-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(77)90120-2)

Gäde G, Hoffmann KH (2005) Neuropeptides regulating development and reproduction in insects. *Physiological Entomology* 30:103-121. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2005.00442.x>

Garcia J, Munro ES, Monte MM, Fourrier MC, Whitelaw J, Smail DA, Ellis AE (2010) *Atlantic salmon* (*Salmo salar* L.) serum vitellogenin neutralises infectivity of

infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish & shellfish immunology* 29:293-297. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.04.010>

Genevcius BC, Caetano DS, Schwertner CF (2017) Rapid differentiation and asynchronous coevolution of male and female genitalia in stink bugs. *Journal of evolutionary biology* 30:461-473. <https://doi.org/10.1111/jeb.13026>

Gomes MO, Castanhole MMU, Souza HVD, Murakami AS, Firmino TSDS, Saran PS, Itoyama MM (2013). Morphological aspects of the testes of 18 species of terrestrial of Heteroptera from Northwestern São Paulo (Brazil). *Biota Neotropica*, 13:131-135. <https://doi.org/10.1590/S1676-06032013000300016>

Gilbert MTP, Moore W, Melchior L, Worobey M (2007) DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. *PloS one*, 2:272-275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000272>

Gillott C (2003) Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. *Annual review of entomology*, 48:163. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112657>

Gillott C (1992) Arthropoda-Insecta. In: *Reproductive Biology of Invertebrates*. Adiyodi KG, Adiyodi RG, 5^a ed. Wiley, New York, pp 345-400.

Gowaty PA, Anderson WW, Bluhm CK, Drickamer LC, Kim YK, Moore AJ (2007) The hypothesis of reproductive compensation and its assumptions about mate preferences and offspring viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:15023-15027. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706622104>

Grigorescu AS, Renoz F, Sabri A, Foray V, Hance T, Thonart P (2018) Accessing the hidden microbial diversity of aphids: an illustration of how culture-dependent methods can be used to decipher the insect microbiota. *Microbial ecology* 75:1035-1048. <https://doi.org/10.1073/pnas.1301886110>

Haddi K, Mendes MV, Barcellos MS, Lino-Neto J, Freitas HL, Guedes RNC, Oliveira EE (2016) Sexual success after stress? Imidacloprid-induced hormesis in males of the neotropical stink bug *Euschistus heros*. *PloS one*, 11:1-18 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156616>

Hagedorn HH, Kunkel JG (1979) Vitellogenin and vitellin in insects. Annual review of entomology, 24:475-505

Halwani AE, Niven DF, Dunphy GB (2001) Apolipoprotein-III in the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America, 48:135-143. <https://doi.org/10.1002/arch.1066>

Hiramatsu N, Cheek AO, Sullivan CV, Matsubara T, Hara A (2005) Vitellogenesis and endocrine disruption. In Biochemistry and molecular biology of fishes. Elsevier 6:431-471 [https://doi.org/10.1016/S1873-0140\(05\)80019-0](https://doi.org/10.1016/S1873-0140(05)80019-0)

Hirose E, Panizzi AR, Souza JT de, Cattelan AJ, Aldrich JR (2006) Bacteria in the gut of southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 99:91-95. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2006\)099\[0091:BITGOS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2006)099[0091:BITGOS]2.0.CO;2)

Hodin J (2009) She shapes events as they come: plasticity in female insect reproduction. Phenotypic plasticity of insects: mechanisms and consequences. 11:423-521.

Hosken DJ, Stockley P, Tregenza T, Wedell N (2009) Monogamy and the battle of the sexes. Annual Review of Entomology, 54:361-378. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090608>

Hunter FM, Petrie M, Otronen M, Birkhead T, Møller AP (1993) Why do females copulate repeatedly with one male?. Trends in Ecology & Evolution 8:21-26. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(93\)90126-A](https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90126-A)

Janson EM, Stireman III JO, Singer MS, Abbot P (2008). Phytophagous insect–microbe mutualisms and adaptive evolutionary diversification. Evolution: International Journal of Organic Evolution. 62:997-1012. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00348.x>

Jennions MD, Petrie M (2000) Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. Biological Reviews, 75:21-64. <https://doi.org/10.1017/S0006323199005423>

Karakaya G, Özyurt N, Candan S, Suludere Z (2012). Structure of the male reproductive system in *Coreus marginatus* (L.)(Hemiptera: Coreidae). Turkish Journal of Entomology, 36:193-204.

Karamipour N, Fathipour Y, Mehrabadi M (2016) Gammaproteobacteria as essential primary symbionts in the striped shield bug, *Graphosoma lineatum* (Hemiptera: Pentatomidae). Scientific reports 6:1-13. <https://doi.org/10.1038/srep33168>

Kaufman MG, Walker ED, Odelson DA, Klug MJ 2000 Microbial community ecology & insect nutrition. American Entomologist 46:173-185. <https://doi.org/10.1093/ae/46.3.173>

Kawagoe T, Suzuki N, Matsumoto K (2001) Multiple mating reduces longevity of females of the windmill butterfly *Atrophaneura alcinous*. Ecological Entomology 26:258-262. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2001.00326.x>

Kempnaers B (2007) Mate choice and genetic quality: a review of the heterozygosity theory. Advances in the Study of Behavior 37:189-278. [https://doi.org/10.1016/S0065-3454\(07\)37005-8](https://doi.org/10.1016/S0065-3454(07)37005-8)

King BF, Hattery RR, Lieber MM, Berquist TH, Williamson Jr B, Hartman GW (1991) Congenital cystic disease of the seminal vesicle. Radiology 178:207-211. <https://doi.org/10.1148/radiology.178.1.1984306>

Knell RJ, Webberley KM (2004). Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behaviour 79:557–581 doi:10.1017/s1464793103006365

Kodrík D, Ibrahim E, Gautam UK, Čapková FR, Bednářová A, Křišťůfek V, Jedlička P (2019) Changes in vitellogenin expression caused by nematodal and fungal infections in insects. Journal of Experimental Biology, 222:1-9 <https://doi.org/10.1242/jeb.202853>

Kosako Y, Sakazaki R, Yoshizaki E (1984) *Yokenella regensburgei* gen. nov., sp. nov.: a new genus and species in the family Enterobacteriaceae. Japanese Journal of Medical Science and Biology 37:117-124.

<https://doi.org/10.7883/yoken1952.37.117>

Kotaki T (2003) Oosorption in the stink bug, *Plautia crossota stali*: induction and vitellogenin dynamics. *Journal of Insect Physiology*, 49:105-113. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(02\)00254-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(02)00254-8)

Kvarnemo C, Simmons LW (2013) Polyandry as a mediator of sexual selection before and after mating. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368:1-16. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0042>

Laughton AM, Garcia JR, Gerardo NM (2016) Condition-dependent alteration of cellular immunity by secondary symbionts in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of insect physiology* 86:17-24. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.12.005>

Lee JM, Hatakeyama M, Oishi K (2000) A simple and rapid method for cloning insect vitellogenin cDNAs. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30:189-194. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(99\)00127-7](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(99)00127-7)

Lee MS, Albajes R, Eizaguirre M (2014) Mating behaviour of female *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae): polyandry increases reproductive output. *Journal of Pest Science*, 87:429-439. <https://doi.org/10.1007/s10340-014-0576-4>

Lewis S, South A (2012) The Evolution of Animal Nuptial Gifts. In *Advances in the Study of Behavior*. Elsevier, Massachusetts, pp 53-97 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394288-3.00002-2>

Lewis SM (2004) Multiple mating and repeated copulations: effects on male reproductive success in red flour beetles. *Animal Behaviour*, 67:799-804. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2003.05.013>

Li R, Xie W, Wang S, Wu Q, Yang N, Yang X, Zhang Y (2013) Reference gene selection for qRT-PCR analysis in the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *PloS one* 8:1-8 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053006>

Knell RJ, Webberley KM (2004) Sexually transmitted diseases of insects: distribution, evolution, ecology and host behaviour. *Biological Reviews*, 79:557-581. <https://doi.org/10.1017/S1464793103006365>

Mahadav A, Gerling D, Gottlieb Y, Czosnek H, Ghanim M (2008) Parasitization by the wasp *Eretmocerus mundus* induces transcription of genes related to immune response and symbiotic bacteria proliferation in the whitefly *Bemisia tabaci*. *BMC genomics* 9:1-11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-342>

Marchini D, Bernini LF, Marri L, Giordano PC, Dallai R (1991) The female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata*: antibacterial activity of the secretion fluid. *Insect biochemistry* 21:597-605. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(91\)90029-E](https://doi.org/10.1016/0020-1790(91)90029-E)

Marchini D, Marri L, Rosetto M, Manetti AG, Dallai R (1997) Presence of Antibacterial Peptides on the Laid Egg Chorion of the Medfly *Ceratitis capitata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 240:657-663. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7694>

Martin OY, Hosken DJ (2004) Copulation reduces male but not female longevity in *Saltella sphondylii* (Diptera: Sepsidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 17:357-362. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2003.00668.x>

Matozzo V, Gagné F, Marin MG, Ricciardi F, Blaise C (2008) Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: a review. *Environment international* 34:531-545. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.09.008>

Medina V, Rosso BE, Soria M, Gutkind GO, Pagano EA, Zavala JA (2022) Feeding on soybean crops changed gut bacteria diversity of the Southern green stinkbug (*Nezara viridula*) and reduced negative effects of some associated bacteria. *Pest Management Science*, 78:4608-4617. <https://doi.org/10.1002/ps.7080>

Meyers DJ, Leigh BA, Huntemann M, Clum A, Ritter S, Palaniappan K, Whitman WB (2020) Draft Genome Sequence of *Yokenella regensburgei* Strain WCD67, Isolated from the Boxelder Bug. *Microbiology resource announcements*, 9:10-1128 <https://doi.org/10.1128/MRA.00104-20>

Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A (2008). Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. Annual review of genetics 42:165-190. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130119>

Nakamura A, Yasuda K, Adachi H, Sakurai Y, Ishii N, Goto S (1999) Vitellogenin-6 is a major carbonylated protein in aged nematode, *Caenorhabditis elegans*. Biochemical and biophysical research communications, 264:580-583. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1549>

Nelson CM, Ihle KE, Fondrk MK, Page Jr RE, Amdam GV (2007) The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization. PLoS biology, 5:673-677 <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050062>

Oberhauser KS (1988) Male monarch butterfly spermatophore mass and mating strategies. Animal Behaviour 36:1384-1388. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(88\)80208-2](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(88)80208-2)

Odhambo TR (1971) The regulation of ovulation in the tsetse-fly, *Glossina pallidipes* Austen. Journal of Experimental Zoology, 177:447-454. <https://doi.org/10.1002/jez.1401770406>

Osborn F, Berlioz L, Vitelli-Flores J, Monsalve W, Dorta B, Lemoine VR (2002) Pathogenic effects of bacteria isolated from larvae of *Hylesia metabus* Cramer (Lepidoptera: Saturniidae). Journal of Invertebrate Pathology 80:7-12. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(02\)00037-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(02)00037-X)

Özyurt N, Candan S, Suludere Z (2018) Structure of the male reproductive system and spermatogenesis of *Codophila varia* (Fabricius, 1787) (Heteroptera: Pentatomidae) by light and scanning electron microscopy. Journal of the Entomological Research Society 20:101-110.

Özyurt N, Candan S, Suludere Z, Amutkan D (2013) Morphology and histology of the male reproductive system in *Graphosoma lineatum* (Heteroptera: Pentatomidae) based on optical and scanning electron microscopy. Journal of Entomology and Zoology Studies, 1:40-46.

Pai A, Yan G (2002) Polyandry produces sexy sons at the cost of daughters in

red flour beetles. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 269:361-368. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1893>

Pai A, Yan G (2020) Long-term study of female multiple mating indicates direct benefits in *Tribolium castaneum*. Entomologia experimentalis et applicata, 168:398-406. <https://doi.org/10.1111/eea.12906>

Prado SS, Almeida RP (2009) Role of symbiotic gut bacteria in the development of *Acrosternum hilare* and *Murgantia histrionica*. Entomologia Experimentalis et Applicata 132:21-29. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00863.x>

Pérez SD, Shelly TE, Yuval B (2013) Female mating failure and the failure of 'mating' in sterile insect programs. Entomologia Experimentalis et Applicata, 146:66-78. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2012.01312.x>

Phillips DM (1970) Insect sperm: their structure and morphogenesis. The Journal of cell biology, 44:243. [10.1083/jcb.44.2.243](https://doi.org/10.1083/jcb.44.2.243)

Piasek EK, Judge KA, Gwynne DT (2010) Polyandry and tibial spur chewing in the Carolina ground cricket (*Eunemobius carolinus*). Canadian journal of zoology, 88:988-994. <https://doi.org/10.1139/Z10-065>

Piulachs MD, Guidugli KR, Barchuk AR, Cruz J, Simões ZLP, Belles X (2003) The vitellogenin of the honeybee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. Insect biochemistry and molecular biology 33:459-465. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00021-3](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00021-3)

Podgwaite JD, D'Amico V, Zerillo RT, Schoenfeldt H (2013) Bacteria associated with larvae and adults of the Asian longhorned beetle (Coleoptera: Cerambycidae). Journal of Entomological Science 48:128-138. <https://doi.org/10.18474/0749-8004-48.2.128>

Poiani A (2006) Complexity of seminal fluid: a review. Behavioral Ecology and Sociobiology 60:289-310. <https://doi.org/10.1007/s00265-006-0178-0>

Prado SS, Golden M, Follett PA, Daugherty MP, Almeida RP (2009)

Demography of gut symbiotic and aposymbiotic *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae). *Environmental entomology* 38:103-109. <https://doi.org/10.1603/022.038.0112>

Rhainds M (2010) Female mating failures in insects. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 136:211-226. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2010.01032.x>

Richard DS, Watkins NL, Serafin RB, Gilbert LI (1998) Ecdysteroids regulate yolk protein uptake by *Drosophila melanogaster* oocytes. *Journal of insect physiology* 44:637-644. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(98\)00020-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00020-1)

Ryan RO, van der Horst DJ (2000) Lipid transport biochemistry and its role in energy production. *Annual review of entomology* 45:233-260. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.233>

Sakamoto JM, Rasgon JL (2006) Endosymbiotic bacteria of bed bugs: evolution, ecology and genetics. *American Entomologist* 52:119-122. <https://doi.org/10.1093/ae/52.2.119>

Scopel W, Cõnsoli FL (2018) Culturable symbionts associated with the reproductive and digestive tissues of the Neotropical brown stinkbug *Euschistus heros*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 111:2413-2424. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1130-9>

Sears MJ, Barbosa F, Hamel JA (2020) Prolonged and variable copulation durations in a promiscuous insect species: no evidence of reproductive benefits for females. *Behavioural Processes*, 179:1-6 <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2020.104189>

Seehuus SC, Norberg K, Gimsa U, Krekling T, Amdam GV (2006) Reproductive protein protects functionally sterile honeybee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103:962-967. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502681103>

Silva CCA, Laumann RA, Ferreira JBC, Moraes MCB, Borges M, Čokl A (2012) Reproductive biology, mating behavior, and vibratory communication of the

brown-winged stink bug, *Edessa meditabunda* (Fabr.) (Heteroptera: Pentatomidae). *Psyche* 2012:1-9 <https://doi.org/10.1155/2012/598086>

Simmons LW (2002) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. Princeton University Press, Western. <https://doi.org/10.1515/9780691207032>

Santos ALND (1980) Efeitos do hormônio juvenil na oogênese em fêmeas virgens e acasaladas de *Rhodnius prolixus*, Stal, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). Dissertação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(02\)00254-8](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(02)00254-8)

Singh NK, Pakkianathan BC, Kumar M, Prasad T, Kannan M, König S, Krishnan M (2013) Vitellogenin from the silkworm, *Bombyx mori*: an effective anti-bacterial agent. *PLoS One*, 8:1-8 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073005>

Soulages JL, Wells MA (1994) Lipophorin: the structure of an insect lipoprotein and its role in lipid transport in insects. *Advances in protein chemistry* 45:371-415. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(08\)60644-0](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(08)60644-0)

Sousa SL, Evangelista Júnior WS, Lima ER, Zanuncio JC, Fonseca MDG (2006) Sperm depletion: a cost for single mated females of *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851)(Heteroptera: Pentatomidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49:923-926. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132006000700009>

Štys P, Biliński S (1990) Ovariole types and the phylogeny of hexapods. *Biological Reviews* 65:401-429. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1990.tb01232.x>

Sudakaran S, Kost C, Kaltenpoth M (2017) Symbiont acquisition and replacement as a source of ecological innovation. *Trends in Microbiology* 25:375-390. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.014>

Takano-Lee M, Velten RK, Edman JD, Mullens BA, Clark JM (2003) An Automated Feeding Apparatus for In Vitro Maintenance of the Human Head Louse, *Pediculus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Journal of Medical Entomology*, 40:795-799. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.6.795>

Takiya DM, Tran PL, Dietrich CH, Moran NA (2006) Co-cladogenesis

spanning three phyla: leafhoppers (Insecta: Hemiptera: Cicadellidae) and their dual bacterial symbionts. *Molecular ecology* 15:4175-4191. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03071.x>

Taylor ML, Wigmore C, Hodgson DJ, Wedell N, Hosken DJ (2008) Multiple mating increases female fitness in *Drosophila simulans*. *Animal Behaviour*, 76:963-970. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2008.05.015>

Telfer WH (1954) Immunological Studies of Insect Metamorphosis: li. The Role of a Sex-Limited Blood Protein in Egg Formation by the Cecropia Silkworm. *The Journal of general physiology* 37:539-558. <https://doi.org/10.1085/jgp.37.4.539>

Thornhill R, Alcock J (2013) The evolution of insect mating systems. In *The Evolution of Insect Mating Systems*. Harvard University Press, Harvard <https://doi.org/10.4159/harvard.9780674433960>

Trenczek T, Engels W (1986) Occurrence of vitellogenin in drone honeybees (*Apis mellifica*). *International journal of invertebrate reproduction and development*, 10:307-311. <https://doi.org/10.1080/01688170.1986.10510254>

Tsai JF, Yang MM, Yang CT (2004) Redefinition of ejaculatory reservoir s. str. in Pentatomomorpha (Hemiptera: Heteroptera). *Annals of the Entomological Society of America*, 97:790-795. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2004\)097\[0790:ROERSS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2004)097[0790:ROERSS]2.0.CO;2)

Tufail M, Takeda M (2008) Molecular characteristics of insect vitellogenins. *Journal of insect physiology* 54:1447-1458. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.08.007>

Tufail M, Nagaba Y, Elgendy AM, Takeda M (2014). Regulation of vitellogenin genes in insects. *Entomological Science*, 17:269-282. <https://doi.org/10.1111/ens.12086>

Turelli M (1994) Evolução de micróbios indutores de incompatibilidade e seus hospedeiros. *Evolution*, 48:1500-1513. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1994.tb02192.x>

Valle D (1993) Vitellogenesis in insects and other groups: a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 88:1-26. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761993000100005>

Vincent JFV (1976) How does the female locust dig her oviposition hole? Journal of Entomology Series A, General Entomology 50:175-181. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1976.tb00133.x>

Werner M, Simmons LW (2008) Insect sperm motility. Biological Reviews, 83:191-208. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00039.x>

Wigby S, Chapman T (2004) Sperm competition. Current Biology, 14:100-103.

Wolfner MF (1997) Tokens of love: functions and regulation of *Drosophila male* accessory gland products. Insect biochemistry and molecular biology, 27:179-192. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(96\)00084-7](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(96)00084-7)

Wu Z, Yang L, He Q, Zhou S (2021) Regulatory mechanisms of vitellogenesis in insects. Frontiers in Cell and Developmental Biology 8:1-11 <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.593613>

Xie S, Hua B (2010) Ultrastructure of the seminal vesicle and sperm storage in Panorpidae (Insecta: Mecoptera). Micron 41:760-768. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2010.05.012>

Yasui Y (1998) The genetic benefits of female multiple mating reconsidered. Trends in Ecology & Evolution, 13:246-250. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01383-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01383-4)

Yasui Y (2001) Female multiple mating as a genetic bet-hedging strategy when mate choice criteria are unreliable. Ecological Research 16:605-616. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1703.2001.00423.x>

Wei D, Li HM, Yang WJ, Wei DD, Dou W, Huang Y, Wang JJ (2015) Transcriptome profiling of the testis reveals genes involved in spermatogenesis and marker discovery in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. Insect molecular biology, 24:41-57. <https://doi.org/10.1111/imb.12134>

Worthington AM, Kelly CD (2016) Direct costs and benefits of multiple mating: Are high female mating rates due to ejaculate replenishment?. *Behavioural Processes* 124:115-122.

Zhang S, Wang S, Li H, Li (2011) Vitellogenin, a multivalent sensor and an antimicrobial effector. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43:303-305 <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.11.003>