

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

BIANCA CORRÊA CAPIZZANI

**FATORES ENVOLVIDOS NA ESCOLHA DO HOSPEDEIRO PELO CARUNCHO
DO FEIJÃO: *Zabrotes subfasciatus* (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE:
BRUCHINAE)**

Alfenas / MG

2021

BIANCA CORRÊA CAPIZZANI

**FATORES ENVOLVIDOS NA ESCOLHA DO HOSPEDEIRO PELO CARUNCHO
DO FEIJÃO: *Zabrotes subfasciatus* (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE:
BRUCHINAE)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas, pela Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG.
Orientador: Prof^o Dr. Angel Roberto Barchuk.

Alfenas / MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

C244f Capizzani, Bianca Corrêa.
Fatores envolvidos na escolha do hospedeiro pelo caruncho do feijão:
Zabrotes subfasciatus (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). / Bianca
Côrrea Capizzani. – Alfenas/MG, 2021.
118f. il. –
Orientador: Angel Roberto Barchuk.
Tese (Doutorado em Fisiologia) - Universidade Federal de Alfenas,
2021.
Bibliografia.

1. Fabaceae. 2. Compostos Orgânicos Voláteis. 3. Olfato. 4.
Microscopia Eletrônica de Varredura. I. Barchuk, Angel Roberto. II.
Título.

CDD-571.1

Bianca Corrêa Capizzani

Fatores envolvidos na escolha do hospedeiro pelo caruncho do feijão: *Zabrotes subfasciatus* (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE: BRUCHINAE)

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Fisiologia

Aprovada em: 07 de junho de 2021

Prof. Dr. Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
UNIFAL-MG

Profa. Dra. Roseli Soncini
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG
UNIFAL-MG

Prof. Dr. Fábio Santos do Nascimento
Instituição: Universidade Paulista
USP

Profa Dra Luana Beatriz dos Santos Nascimento
Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFRJ

Profa. Dra. Zila Luz Paulino Simões
Instituição: Universidade Paulista
USP



Documento assinado eletronicamente por **Angel Roberto Barchuk, Professor do Magistério Superior**, em 07/06/2021, às 18:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roseli Soncini, Professor do Magistério Superior**, em 07/06/2021, às 18:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luana Beatriz dos Santos Nascimento, Usuário Externo**, em 07/06/2021, às 18:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Zilá Luz Paulino Simões, Usuário Externo**, em 08/06/2021, às 09:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **FABIO SANTOS DO NASCIMENTO, Usuário Externo**, em 14/06/2021, às 18:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0515606** e o código CRC **F3B576D6**.

RESUMO

O comportamento de oviposição, comum em espécies endofíticas, determina a dieta de muitos insetos. É o caso do caruncho *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae), membro da subfamília Bruchinae, considerado uma das maiores pragas do feijão estocado em armazéns, pois deposita seus ovos e se alimenta de várias espécies de Leguminosae. Trabalhos recentes demonstram que há uma hierarquia na escolha do grão que servirá como alimento para seus descendentes, sendo: feijão > soja > lentilha ≥ grão de bico. No entanto, os fatores que determinam essa escolha ainda são desconhecidos, mesmo sendo de grande importância para a agricultura e a economia. Várias características das sementes podem ser responsáveis por determinar esta escolha. Porém, o fator determinante deve ser percebido pela fêmea antes de ovipositar. O tamanho e a textura da semente não parecem ser determinantes. Neste trabalho testamos a hipótese de que compostos voláteis emanados pelas sementes são os determinantes da escolha de hospedeiro por fêmeas de *Z. subfasciatus*. Para isso, objetivamos (a) identificar os compostos voláteis que são emanados por diferentes grãos (feijão, soja, lentilha e grão de bico) e reconhecidos pelas fêmeas durante o período de ronda, prévio à oviposição; (b) e analisar a participação das antenas no reconhecimento destas substâncias através da comparação entre fêmeas e machos. Inicialmente, fêmeas de *Z. subfasciatus* de até 24 h de idade foram colocadas em uma arena de escolha para testes múltiplos simultâneos. Em 4 placas de petri periféricas, foram colocados um tipo de grão (lentilha, soja, feijão ou grão de bico) por placa; a quinta placa ficou vazia (controle). Sendo assim, foram realizados testes mais específicos, em arena do tipo múltiplas pareadas. Porém, neste caso, duas placas de petri periféricas receberam o mesmo tipo de grão para disputas grãos vs controle e grãos vs grãos. A hierarquia observada foi: feijão ≥ soja > grão de bico > lentilha. Posteriormente, as fêmeas tiveram que escolher entre: tegumento, tecidos de reserva e meristemático, grão inteiro, grão inteiro umidificado e um controle sem sementes, para os 4 grãos analisados, com o intuito de identificar a parte do grão onde estão os compostos disponíveis para reconhecimento pelas fêmeas. Nenhuma diferença significativa foi observada. Para identificar os compostos voláteis presentes no feijão e no grão de bico, foram realizados ensaios de aeração dos grãos, seguidos por análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Foram identificadas 10 substâncias no feijão e 17 no grão de bico. Etenilbenzeno (estireno) se destacou como um composto muito abundante no feijão. A participação desses compostos na escolha do grão ainda precisa ser investigada. Na análise para avaliar a participação das antenas sobre a escolha dos

grãos, fêmeas e machos foram divididos em quatro grupos distintos: (1) carunchos sem a antena direita, (2) carunchos sem a antena esquerda, (3) carunchos sem as duas antenas e (4) controle (carunchos com ambas as antenas) e colocados em arena do tipo múltiplas pareadas. A presença de pelo menos 1 antena, tanto em fêmeas quanto em machos, foi determinante para que os carunchos fossem direcionados para a placa que continha algum tipo de grão. O mesmo não foi observado em *Z. subfasciatus* sem as duas antenas que não foram capazes de identificar onde os grãos estavam. No entanto, apenas as fêmeas apresentaram uma preferência pelo feijão com relação ao grão de bico. Já os machos, demonstraram maior sensibilidade à presença dos grãos ao utilizarem a antena direita quando comparado à antena esquerda. Análises das antenas de fêmeas e machos, por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), mostram elementos sensoriais potencialmente envolvidos na captura da informação olfatória, e existência de dimorfismo sexual. As fêmeas possuem grande quantidade de sensilas basicônicas, conhecidas por responderem a voláteis de plantas. Os machos possuem mais sensilas tricóideas, com função mecano e quimiorreceptora, que normalmente respondem a feromônios. Em conjunto, estes resultados demonstram uma preferência das fêmeas pelo feijão; que os compostos voláteis estão presentes em toda a semente; que a composição química apresentada pelos grãos tem o estireno em destaque nas sementes de feijão e o hexanal juntamente com o octanal em destaque nas semente de grão de bico; que as antenas são fundamentais para o reconhecimento destes compostos pelos insetos, mas apenas as fêmeas demonstram preferência entre os diferentes grãos; e que as antenas apresentam diferentes elementos sensoriais em machos e fêmeas da espécie, podendo ocorrer lateralização fisiológica nas antenas dos machos. Experimentos em andamento deverão revelar os alcances da participação dos compostos identificados nas sementes como infoquímicos envolvidos na seleção de hospedeiros para oviposição e desenvolvimento em *Z. subfasciatus*.

Palavras-chave: Fabaceae. Compostos voláteis. Olfato. Microscopia Eletrônica de Varredura.

ABSTRACT

The oviposition behavior, common in endophytic species, determines the diet of several insects. As in the case of the weevil *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae), member of the subfamily Bruchinae, considered one of the biggest pests of beans stored in warehouses, as it lays its eggs and feeds on several species of Leguminosae. Recent work shows that there is a hierarchy in the choice of grain that will serve as food for their descendants, being: beans > soy > lentils \geq chickpeas. However, the factors that determine this choice are still unknown, even though they are of great importance for agriculture and the economy. Several characteristics of the seeds may be responsible for determining this choice. However, the determining factor must be perceived by the female before ovipositing. The size and texture of the seed does not seem to be decisive. In this work we test the hypothesis that volatile compounds emanating from seeds are the determinants of host choice by females of *Z. subfasciatus*. For that, we aim (a) identify the volatile compounds that are emanated by different grains (beans, soy, lentils and chickpeas) and recognized by the females during the round period, prior to oviposition; (b) and to analyze the participation of the antennae in the recognition of these substances through the comparison between females and males. Initially, females of *Z. subfasciatus* up to 24 h of age were placed in an arena of choice for multiple simultaneous tests. In 4 peripheral petri dishes, one type of grain (lentil, soy, beans or chickpeas) was placed per plate; the fifth plate was empty (control). Therefore, more specific tests were performed, in a multiple paired arena. However, in this case, two peripheral petri dishes received the same type of grain for grains vs. control and grains vs. grains disputes. The observed hierarchy was: beans \geq soybeans > chickpeas > lentils. Subsequently, as they have to choose between: tegument, reserve and meristematic tissues, whole grain, humidified whole grain and a seedless control, for the 4 grains form, in order to identify which part of the grain has compounds recognized by the females. No difference was observed. To identify the volatile compounds, present in beans and chickpeas, the grains were submitted to aeration testing, followed by gas chromatography analysis coupled with mass spectrometry. Were found 10 substances in beans and 17 in chickpeas. Ethylene benzene (styrene) stood out as a very abundant compound in beans. the compounds contribution in the choice of the grain has yet to be investigated. In the analysis to assess the participation of antennas on the choice of grains, females and males were divided into four distinct groups: (1) weevils without the right antenna, (2) weevils without the left antenna, (3) weevils without both antennas and (4) control (weevils with both antennas) and placed in a multiple paired arena. The presence of at least 1 antenna,

both in females and in males, was determining for the weevils to be directed towards the plate containing some type of grain. The same was not observed in *Z. subfasciatus* which, without two antennas, were unable to identify the location of the grains. However, only females showed a preference for beans over chickpeas. Males, on the other hand, demonstrated greater sensitivity to the presence of grains when using the right antenna when compared to the left antenna. Analyzes of the antennae of females and males, by Scanning Electron Microscopy (SEM), show sensory elements potentially involved in the capture of olfactory information, and the existence of sexual dimorphism. Females have a large amount of basiconic sensillae, know respond to plant volatiles. Males have more trichoidal sensillae, with mechano- and chemoreceptor function, which normally respond to pheromones. Together, these results demonstrate a female preference for beans; that volatile compounds are present throughout the seed; that chemical composition presented by the grains has styrene highlighted in bean seeds and hexanal together with octane highlighted in chickpea seeds; that the antennae are fundamental for the recognition of these compounds by the insects, but only the females show preference among the different grains; and that the antennae present different sensory elements in males and females of the species, and physiological lateralization may occur in the antennae of the males. Ongoing experiments should reveal the scope of participation of the compounds identified in the seeds as infochemicals involved in the selection of hosts for oviposition and development in *Z. subfasciatus*.

Keywords: Fabaceae. Volatile compounds. Smell. Scanning Electron Microscopy.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por sempre ouvir cada uma das minhas orações, guiar os meus caminhos e por me fortalecer todos os dias. Já foram muitos obstáculos superados. Ele é tão bom que me enviou uma família insubstituível, um companheiro de vida maravilhoso e algumas amizades verdadeiras, que eu pretendo conservar até o fim.

Agradeço a minha família, que sempre me apoiou e incentivou na busca pelos meus sonhos. Meus pais são um exemplo de luta e conquista dos objetivos. É neles que eu me inspiro quando penso na pessoa que devo e quero ser. E meus irmãos, eu não trocaria por nada. Me orgulho demais da família que tenho, é um amor imensurável!

Agradeço ao meu namorado e a família dele, por todo o apoio, compreensão, conversas de desabafo e momentos incríveis. Não foi fácil aguentar a distância, nem meus momentos de estresse, mas compensarei com uma vida inteira de momentos juntos. Você veio por encomenda Rafael, e demorou porque Deus caprichou. Te amo não só por isso, mas sim por esse seu jeito único, e por sermos esse casal tão especial!

Agradeço ao meu orientador, que me aceitou como aluna de doutorado, mesmo sabendo que era um projeto em algo totalmente novo para mim. Foram três anos de intenso aprendizado. Conseguimos colaborações e elaboramos os experimentos. Por vezes foram trabalhos 24horas/7dias da semana. Fui até apelidada como “filha do Roberto” por me parecer com ele em alguns pontos, pela empolgação em pensar nos experimentos e por ficar lendo artigos até mesmo nos finais de semana. Tivemos momentos de reunião e também de descontração. Chegou a hora de colher os frutos.

Agradeço aos amigos que vieram como presentes do Doutorado. Cada um deles merece até mais que um parágrafo.

Valdeci foi como um irmão. Às vezes eu agia como irmã mais velha e outras vezes era ele o mais maduro (capricorniano né?!). Moramos juntos, lanchamos juntos, trabalhamos juntos, por vezes rimos e choramos juntos. Fomos considerados os sensíveis do grupo, mas também éramos a dupla pronta para ajudar em qualquer situação, muitas vezes por baixo dos panos. Foi e sempre será uma amizade mútua e verdadeira.

Josi, que também morou comigo um tempinho e foi uma amiga para desabafar, falar de mapa astral, experimentos, comida, enfim, o importante é que gostávamos de falar. Bem, quem me conhece sabe que falo até demais, então dá para imaginar como era. Mas também éramos alegres, organizadas, e sérias com o trabalho. Me ajudou em alguns momentos difíceis e de

desânimo. Torcemos juntas pelo resultado do concurso dela, que enfim foi convocada. Espero que a gente ainda mantenha contato por muito tempo, apesar da correria dos trabalhos.

Juliana, técnica do laboratório, que ao meu ver é uma peça chave para o andamento de tudo ali. Me ajudou com experimentos necessários e ensinou a parte teórica e prática de algumas técnicas importantes. Posso resumir dizendo que ela é uma pesquisadora admirável, que realmente sabe muito de muita coisa e merece grande sucesso e valorização na área e na vida. Sempre coloca dedicação e empenho em tudo o que se propõe a fazer.

Adriana, que para mim foi muito mais do que a secretária do Programa Multicêntrico. Sempre solícita e disposta à ajudar. Trabalhamos em algumas atividades durante o tempo em que fui representante discente. Minhas visitas a sua casa sempre rendiam muitas risadas com ela e sua filha Amanda. Obrigada, de verdade, pela companhia e amizade das duas.

Luciana, amiga que demonstrou força e empatia em muitas situações vividas. Além de amiga, me ofereceu sua casa para morar, quando abri mão da minha para que fosse possível realizar os experimentos do projeto, os quais eram em outras cidades. Lu, você não faz ideia do quanto sou grata por toda a sua ajuda e amizade.

Agradeço ao grupo de pesquisas e ao LABAINT, pelos momentos de conversas e reuniões e pelas nossas descontrações e desabafos em diversos momentos de desespero.

Agradeço à minha prima Carolina, ao marido dela (Rodrigo) e à amiga Liliane, por todos os momentos juntos, pela amizade e pela força que me deram quando fiz experimentos em Ribeirão Preto-SP. Foi muito bom conviver e conversar com vocês durante aqueles dias. Espero que tenhamos momentos assim depois do doutorado também, independente do trabalho.

Agradeço aos alunos de Iniciação Científica que co-orientei nesse projeto. A Natália, que me acompanhou e ajudou com as arenas infinitas. Ótima aluna e pessoa. Sou grata por confiar em mim e me acompanhar até na mudança de laboratório. À Aline, que me ajudou na separação de tegumentos e endosperma + embrião dos grãos para as análises de extração de óleos essenciais. Tivemos conversas engrandecedoras nesses momentos. Descobri também que ela era uma ótima cantora. E o Lucas que me acompanhou na parte mais molecular do projeto, sempre animado para aprender. As vezes acho que ele se parece muito comigo e também com o Prof. Roberto, no jeito brincalhão porém interessado e dedicado. Desejo muito sucesso aos três, pessoal e profissionalmente.

Agradeço aos amigos externos à UNIFAL: Daiane Rodrigues e Lucas Leite, pela amizade, por todas as conversas que tivemos durante o tempo que morei em Alfenas e por serem tão incríveis no trabalho que fazem!

Agradeço ao Cesar do xerox e ao Restaurante Marmita Xike por serem tão simpáticos e pelo trabalho de extrema qualidade que pude aproveitar durante o tempo do doutorado.

Agradeço às empresas que doaram sementes para a realização de experimentos deste trabalho: EMBRAPA, Sementes Nova Aliança e COPAMIL.

Agradeço às colaborações que tivemos: 1) Professor Luiz Alberto Beijo, professor permanente do Programa em Estatística Aplicada e Biometria – PPGEAB / Departamento de Estatística – UNIFAL- MG, que disponibilizou horários para explicações e discussões sobre a parte estatística do projeto; 2) Professor José M. S. Bento e seu aluno de doutorado Hugo Rainho Leoncini, do Laboratório de Ecologia Química e Comportamental de insetos / Departamento de Entomologia ESALQ-USP, que me ensinaram as técnicas de aeração dos grãos e auxiliaram durante a realização dos experimentos; 3) Professora Maria José dos Santos Wisniewski (Zezé), do Laboratório de Limnologia / UNIFAL-MG, por ser extremamente atenciosa e disponibilizar uma lupa com régua, possibilitando uma medição mais precisa das diferenças de tamanho entre os carunchos (dados prévios que não entraram na tese mas serviram como base para experimentos realizados para artigo, o qual está em processo de escrita); 4) José e Tereza, técnicos do Laboratório Multiusuários USP-RP, por toda a ajuda nos experimentos piloto de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); 5) Professor Eduardo Alvez, professor titular e chefe do Departamento de Fitopatologia / Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME-UFLA-MG) e a técnica do laboratório Aline Norberto, pelo auxílio na realização dos experimentos de MEV das antenas dos *Z. subfasciatus*, bem como pela disponibilização do microscópio; 6) Rodrigo Araújo, amigo e Acadêmico investigador do Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Maule - Universidad Católica del Maule, Chile, que me apresentou ao Professor Cristian A. Villagra Gil, professor associado do Instituto de Entomologia / Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación – Universidad de Chile, o qual veio a me ajudar nas análises dos resultados da MEV das antenas dos *Z. subfasciatus*. Sou enormemente grata pela inspiração, apoio e pelo interesse demonstrado.

Agradeço a CAPES e a UNIFAL pela oportunidade e também pela concessão de bolsa de estudos, sem a qual seria impossível a realização do meu doutorado. Também aos professores Alexandre Giusti-Paiva e Giovane Galdino pelo apoio que ofereceram durante o meu ingresso no Programa e à bibliotecária Fátima, por toda a atenção e paciência demonstrada ao ajudar nos ajustes de normalização do trabalho.

Por fim, agradeço a cada dificuldade, cada desafio e cada conquista em meu caminho. E, principalmente, à imensa oportunidade que tive de desenvolver melhor meu autoconhecimento neste tempo. Afinal, é isso que nos faz evoluir pessoal e profissionalmente.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt) da Universidade Federal de Alfenas, sob orientação do Prof. Dr. Angel Roberto Barchuk, com o apoio das seguintes entidades:

- Fundação CAPES Ministério da Educação (Código de Financiamento 001).
- FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais.
- CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Dimorfismo sexual apresentado pela espécie <i>Z. subfasciatus</i>	25
Figura 2-	Ilustração do processo de oviposição, realizado por fêmeas de <i>Z. subfasciatus</i> , e do desenvolvimento do tipo holometábolo realizado pela espécie.....	26
Figura 3-	Fluxograma experimental.....	35
Figura 4-	Grãos utilizados durante os experimentos.....	37
Figura 5-	Ilustração das arenas experimentais.....	41
Figura 6-	Arenas de escolha.....	43
Figura 7-	Participação das antenas no processo de escolha do hospedeiro por <i>Z. subfasciatus</i>	47
Figura 8-	Atividade de escolha do hospedeiro por <i>Z. subfasciatus</i>	52
Figura 9-	Perfil do <i>timing</i> de escolha do hospedeiro por fêmeas de <i>Z. subfasciatus</i>	54
Figura 10-	Atividade de escolha do hospedeiro pelo <i>Z. subfasciatus</i> : Ordem de concorrência – Fêmeas (controle vs grão).....	56
Figura 11-	Atividade de escolha do hospedeiro pelo <i>Z. subfasciatus</i> : Ordem de concorrência – Fêmeas (grão vs grão).....	57
Figura 12-	Escolha do hospedeiro por machos do <i>Z. subfasciatus</i> : Ordem de concorrência.....	58
Figura 13-	Análise da atividade por diferentes partes do grão.....	60
Figura 14-	Perfil do <i>timing</i> de escolha apresentado pelas fêmeas de <i>Z. subfasciatus</i> quanto à atração por partes específicas do hospedeiro.....	62
Figura 15-	Cromatogramas das amostras de feijão (A) e grão de bico (B).....	64
Figura 16-	Análise do envolvimento das antenas no processo de reconhecimento e escolha do hospedeiro.....	67
Figura 17-	Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das antenas de fêmeas e machos do <i>Z. subfasciatus</i>	69
Figura 18-	Dimorfismo sexual associado ao comprimento das antenas de <i>Z. subfasciatus</i>	70
Figura 19-	Testes comportamentais em arenas com tubos de ligação de diferentes tamanhos.....	73

Figura 20 - Classificação filogenética da família Leguminosae/subfamília Faboideae..... 75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Descrição dos cultivares dos grãos utilizados em experimentos na arena de testes múltiplos pareados.....	37
Quadro 2 -	Compostos voláteis produzidos por sementes de feijão-comum, <i>Phaseolus vulgaris</i>	65
Quadro 3 -	Compostos voláteis produzidos por sementes de grão de bico, <i>Cicer arietinum</i>	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Ordem Coleoptera; Família Chrysomelidae; subfamília Bruchinae.....	17
1.2	Seleção de hospedeiros por insetos fitófagos	18
1.3	Besouros especializados em utilizar sementes	19
1.4	A agricultura de leguminosas e a importância dos Bruquineos como pragas	21
1.5	Biologia de <i>Zabrotes subfasciatus</i>	23
1.6	Interação inseto - hospedeiro: respostas fisiológicas do inseto a compostos voláteis.....	27
2	PROBLEMA E HIPÓTESE	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	Objetivo geral	33
3.2	Objetivos específicos.....	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Visão geral dos experimentos.....	34
4.2	Populações de carunchos – <i>Z. subfasciatus</i>	35
4.3	Sementes.....	36
4.4	Arena experimental.....	39
4.5	Testes de atração/rejeição em arenas.....	42
4.6	Determinação da composição de voláteis dos grãos	43
4.6.1	<i>Ensaio de extração por aeração</i>	43
4.6.2	<i>Separação e identificação dos voláteis</i>	44
4.7	Retirada das antenas do <i>Z. subfasciatus</i> seguida por testes comportamentais múltiplos pareados.....	45
4.8	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	47
4.9	Análises estatísticas	49
5	RESULTADOS	51
5.1	Hierarquia de preferência por hospedeiros de <i>Z. subfasciatus</i> : testes múltiplos simultâneos.....	51
5.2	Perfil do <i>timing</i> de escolha de hospedeiros por <i>Z. subfasciatus</i>	53
5.3	Hierarquia de preferência por hospedeiros de <i>Z. subfasciatus</i> : testes múltiplos pareados.....	55

5.4	Hierarquia de preferência por partes das sementes hospedeiras de <i>Z. subfasciatus</i>	59
5.5	Perfil do <i>timing</i> de escolha por partes de sementes hospedeiras de <i>Z. subfasciatus</i>	61
5.6	Compostos voláteis presentes em sementes hospedeiras	63
5.7	Análise da importância das antenas do <i>Z. subfasciatus</i> no processo de busca e reconhecimento do hospedeiro: comparação de resposta à escolha do grão por machos e fêmeas.....	66
5.8	Morfologia externa das antenas de <i>Z. subfasciatus</i>	68
6	DISCUSSÃO	71
6.1	As fêmeas do <i>Z. subfasciatus</i> (não os machos) usam o cheiro das sementes para escolher o hospedeiro.....	71
6.2	Voláteis potencialmente envolvidos na escolha de hospedeiros por fêmeas de <i>Z. subfasciatus</i>	75
6.3	Morfologia e identificação de estruturas corporais envolvidas com a recepção de estímulos olfatórios.....	79
7	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS	85
	APÊNDICE	111

1 INTRODUÇÃO

Os tópicos apresentados abaixo apresentam uma breve introdução acerca do tema discutido neste trabalho. Eles permitem que o leitor tenha uma visão geral do assunto, com base em uma revisão da literatura que visa proporcionar um melhor entendimento.

1.1 Ordem Coleoptera; Família Chrysomelidae; subfamília Bruchinae

Os insetos representam a maior Classe dentro do Reino Animal, formados por mais de 800.000 espécies catalogadas. Alguns entomologistas acreditam, inclusive, que o número atual de espécies vivas pode somar entre 5 e 10 milhões (STORK, 2018).

Apesar de serem popularmente conhecidos como pragas, pestes ou portadores de doenças, eles propiciam benefícios ao meio ambiente e a outros animais, incluindo os humanos. Realizam a polinização de plantas; a produção do mel, da cera e da seda; atuam no processo de ciclagem do solo, na dispersão de sementes, na filtração da água, e em diversas atividades importantes para o ambiente (MALMQVIST *et al.*, 2004; JANKIELSOHN, 2018; WOOD *et al.*, 2018; KITCHING; DAHLSJO; EGGLETON, 2020).

A Ordem Coleoptera integra os besouros e caracteriza o maior grupo dentro da Classe Insecta. É representada por 400 mil espécies descritas, o equivalente a 30% do total de espécies animais conhecidas (GRIMALDI; ENGEL, 2005; HUNT *et al.*, 2007; CHAPMAN, 2009). A Ordem Coleoptera está constituída por 4 subordens: Archostemata, Myxophaga, Adephaga e Polyphaga, que somadas resultam em um total entre 162 e 169 famílias (CROWSON, 1981; LAWRENCE, 1982; AUDINO, 2007; MCKENNA *et al.*, 2019). Destas, 30 mil espécies são encontradas no Brasil. Os élitros são característica exclusiva da Ordem Coleoptera, normalmente usados para proteção. A metamorfose é do tipo completa (ovo-larva-pupa-adulto), e foram os primeiros holometábolos a evoluir, conquistando vários nichos ecológicos (EVANS, 1975).

Como consequência da ampla variedade em espécies, os besouros demonstram diversos estilos de vida e comportamento: espécies com hábitos diurnos e noturnos, parasitas e mutualistas, generalistas e especialistas, carnívoras e herbívoras, detritívoras e coprófagas, etc

(FOOTITT; ADLER, 2009). Também, seus representantes necrófagos a colocam como a 2ª maior Ordem de interesse forense (ALMEIDA, 2009). A reprodução é sexuada, sendo comum apresentarem dimorfismo sexual e, frequentemente, o substrato que serve de alimento ou abrigo é também utilizado para a postura de ovos. Também, casos de partenogênese podem ocorrer em bruiquídeos da família Chrysomelidae (GALLO *et al.*, 2002).

Chrysomelidae é uma das maiores famílias dentro da Ordem Coleoptera. A segunda mais numerosa, com cerca de 2 mil gêneros e 37 mil espécies descritas. É composta por 12 subfamílias: Bruchinae, Cassidinae, Chrysomelinae, Criocerinae, Cryptocephalinae, Donaciinae, Eumolpinae, Galerucinae, Lamprosomatinae, Sagrinae, Spilopyrinae e Synetinae, dentre as quais 4.400 espécies foram descritas no Brasil (COSTA, 2000; BOUCHARD *et al.*, 2011). Chrysomelidae é apontada como a 2ª maior família entre os herbívoros (RILEY *et al.*, 2002). Apresenta herbivoria essencialmente monófaga ou oligófaga, e polifagia desenvolvida secundariamente (JOLIVET, 1988; 1992). São insetos dotados de alta importância econômica e ecológica, devido à distribuição cosmopolita e à dieta predominantemente fitófaga, tanto na fase larval quanto na fase adulta (CHABOO, 2007). Suas larvas e adultos se alimentam de raízes, ramos, folhas e sementes de vegetais superiores, e alguns se alimentam de pólen (KONSTANTINOV; VANDENBERG, 1996). Apesar de causarem danos a plantações, são consideradas uma boa alternativa para o controle biológico de plantas daninhas. Canibalismo também pode ocorrer neste grupo (MAFRA-NETO; JOLIVET, 1994; MAFRA-NETO, 1996).

Dentro da família Chrysomelidae existe uma pequena subfamília denominada Bruchinae. Ela possui 1650 espécies descritas, das quais 9 são consideradas cosmopolitas e aproximadamente 30 são de interesse econômico (KINGSOLVER, 2004). Apesar de predarem 36 famílias de plantas, têm a família Fabaceae como hospedeira preferida (JANZEN, 1969; JOHNSON, 1981). São estritamente espermatófitos, podendo ser usados como agentes de controle em plantas hospedeiras, por causarem danos severos as sementes (RADFORD *et al.*, 2001; BRIANO *et al.*, 2002; LINZMEIER *et al.*, 2004). A subfamília Bruchinae ocorre em todos os continentes, exceto na região da Antártida. Apresenta mais de 1500 espécies, distribuídas em cerca de 60 gêneros, sendo um número significativo delas especializado na utilização de componentes oriundos de plantas importantes para a economia, essencial para a reprodução dessas espécies (SHELLIE-DESSERT; BLISS, 1991; ALVAREZ *et al.*, 2005).

1.2 Seleção de hospedeiros por insetos fitófagos

A maioria dos insetos é classificada como fitófago especialista (FEDER, 1995). Fitófagos são aqueles que se alimentam de vegetais. Podem utilizar uma planta não apenas como alimento, mas também como refúgio, abrigo, sítio de acasalamento e para ovipositar (DIAS-PINI *et al.*, 2016). Eles possuem a habilidade de perceber diferentes substâncias e incorporá-las aos seus hábitos alimentares (SCHOONHOVEN, 2005). O tipo de alimento é diretamente relacionado à fisiologia e ao comportamento do consumidor (SLANSKY; RODRIGUES, 1987). Eles devem reconhecer seu hospedeiro e conseguir acessá-lo, de maneira a obter os nutrientes em quantidades necessárias para um bom desempenho da prole: sobrevivência e reprodução (JANZ, 2002).

Nos insetos holometábolos fitófagos os imaturos têm movimentos restritos. Logo, o comportamento de oviposição de adultos e o desenvolvimento larval em grãos são fatores decisivos para a escolha do hospedeiro. A morfologia, a qualidade nutricional, a abundância de sementes, e os sítios livres de predadores ou competição, determinam a distribuição das espécies na Terra (REMMERT, 1982; JOHNSON; KISTLER, 1987; BERNAYS; GRAHAM, 1988; SIEMENS *et al.*, 1991; BARROS, 1999).

Sinais visuais influenciam na atração tanto para alimentação como para oviposição (ARIMURA *et al.*, 2009). Compostos químicos de plantas também desempenham um importante papel (RUPESH *et al.*, 2013).

Aqueles que utilizam sementes, tal como os bruquíneos, ainda têm desconhecidos os fatores que determinam a escolha de um hospedeiro e as etapas que podem levar a um aumento ou diminuição dos cultivares utilizados (SIEMENS *et al.*, 1991).

1.3 Besouros especializados em utilizar sementes

Os besouros da subfamília Bruchinae (Coleoptera: Polyphaga: Cucujiformia: Chrysomeloidea: Chrysomelidae: Bruchinae) constituem um dos principais grupos de insetos capazes de predação de sementes durante a fase larval (BONDAR, 1936). São excelentes modelos animais para o estudo de aspectos evolutivos e fisiológicos relacionados à oviposição e à seleção de hospedeiros. Afinal, apresentam fácil manejo, sendo possível simular o ambiente de estocagem de grãos em laboratório (FOX; TATAR, 1994).

A subfamília Bruchinae é caracterizada por possuir espécies em que os imaturos se alimentam apenas de sementes, uma ótima fonte nutricional. Essas sementes possuem várias

características físicas e químicas que podem resultar em efeitos atraentes ou repelentes, de forma a impedir que sejam atacadas por qualquer predador. Essa quantidade de defesas também pode ser o fator responsável por atrair e selecionar possíveis predadores, resultando em grande especificidade na escolha realizada pelos bruquíneos. Ainda que existam 35 famílias de hospedeiros já descritas, a maioria das 1.300 espécies dessa subfamília (84%) alimenta-se praticamente de uma só família hospedeira: Fabaceae, também conhecida e aqui referenciada como Leguminosae. São ainda desconhecidos os fatores que determinam o uso de um determinado táxon como hospedeiro (JANZEN, 1969; SOUTHGATE, 1979; JOHNSON, 1981, 1989; JOHNSON *et al.*, 2003).

A seleção de um hospedeiro para oviposição envolve habilidades para encontrar, reconhecer e aceitar a semente ideal. Foi demonstrado que a abundância do hospedeiro, a textura da cobertura das sementes, a competição e o tamanho dos grãos afetam a oviposição em Bruchinae (OSHIMA *et al.*, 1973; JANZEN, 1978; NUANZE *et al.*, 1992). Além disso, os bruquíneos parecem utilizar estímulos olfatórios na localização dessa semente, tanto no momento da escolha (realizada geralmente pela fêmea adulta, durante a oviposição) quanto na fase de adaptação larval (respostas fisiológicas). Um bom exemplo, é o comportamento de oviposição de fêmeas do *Callosobruchus chinensis* L. (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae), que são atraídas por sementes saudáveis, mas não por sementes infestadas com larvas da mesma espécie (IGNACIMUTHU *et al.*, 2000).

De acordo com Rees (1996), a maioria das espécies de importância econômica, como as que atacam grãos armazenados, está agrupada em apenas sete famílias: Bostrichidae, Cucujidae, Curculionidae, Dermestidae, Silvanidae, Tenebrionidae e Bruchidae (atual Chrysomelidae). E uma grande parcela desses animais pode ser encontrada vivendo em regiões tropicais da Ásia, África, América Central e do Sul, procriando em grãos de importância econômica e consumindo valiosas proteínas. Inclusive, algumas espécies são conhecidas pela destruição que causam em leguminosas (SOUTHGATE, 1979).

Os bruquíneos apresentam grande destaque dentre as espécies de coleópteros, com representantes bastante restritivos na escolha do alimento, o que pode variar de acordo com o gênero (BONDAR, 1936; HOWE, 1972; JOHNSON, 1981). Eles assumem grande importância econômica, visto que sua reprodução ocorre principalmente em sementes de leguminosas, tanto no campo quanto em armazéns (HOWE, 1972). Podem levar a diminuição da qualidade e da viabilidade das sementes, de forma a comprometer sua germinação (SANTOS *et al.*, 1994; FIGUEIRA; CARVALHO, 2003). Em alguns casos os danos alcançam até 89%, de acordo com Ferraz e Carvalho (2001) em estudos com *Cassia fistula*.

Há cerca de 5.500 anos, o homem começou a cultivar, estocar e comercializar sementes de leguminosas (KAPLAN, 1965). Porém, condições de abundância fizeram com que os besouros se tornassem um dos maiores predadores das sementes estocadas. Isso inclui várias espécies de besouros, até mesmo algumas que a princípio estavam separadas geograficamente (MEIK; DOBIE, 1986).

América Central e a América do Sul foram as zonas de origem, adaptação e cultivo do feijão comum. Estes locais constituem o ponto inicial da difusão do *Zabrotes subfasciatus* e do *Acanthoscelides obtectus*, duas espécies da subfamília Bruchinae. O aumento da comercialização e do cultivo das sementes de feijão possibilitou a expansão dessas espécies para várias regiões do planeta, estabelecendo-se em muitas delas (SOUTHGATE, 1978).

Tendo em vista que o alimento ou substrato de oviposição deixou de ser um fator limitante, *Z. subfasciatus* e *A. obtectus* passaram a se destacar como os principais predadores do feijão (CREDLAND; DENDY, 1992). Embora atualmente, *Z. subfasciatus* limite a sua oviposição a poucos hospedeiros: *Phaseolus lunatus* e *P. vulgaris*, a espécie pode utilizar como substrato para oviposição, ainda que em menor quantidade, *Vigna unguiculata* e *Cicer arietinum* (DENDY; CREDLAND, 1991; TEIXEIRA; ZUCOLOTO, 2003; TEIXEIRA; GRIS, 2011; CORRÊA *et al.*, 2020).

1.4 A agricultura de leguminosas e a importância dos Bruquineos como pragas

As leguminosas são plantas pertencentes à ordem Fabales e à Família botânica Fabaceae (ou Leguminosae) e constituem a terceira maior família entre as angiospermas. São consideradas cosmopolitas, ocupando principalmente ambientes de regiões tropicais, subtropicais, temperadas e com grande representação em florestas neotropicais (GENTRY, 1988; LEWIS *et al.*, 2005). Dividem-se em seis subfamílias: Caesalpinioideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Duparquetioideae e Faboideae (LPWG, 2017). Seus representantes incluem mais de 700 gêneros e por volta de 20.000 espécies, as quais produzem frutos do tipo legume, ou vagem, que ao secar se abrem liberando as sementes (CRONK; PENNINGTON, 2006; ENCYCLOPAEDIA BRITANNICA – FABACEAE).

As leguminosas são consideradas de grande importância econômica, social e ecológica (BARROSO *et al.*, 2007). Utilizadas desde a invenção da agricultura, há cerca de 10.000 anos, tanto em casos de enriquecimento do solo para plantações, quanto para a alimentação. Possuem

grãos com alto valor nutritivo - “alimento dos pobres” (MESSINA, 1999; ABREU; BIAVA, 2005; SOUZA; LORENZI, 2005; BARROSO *et al.*, 2007; MESQUITA *et al.*, 2007; HERLING, 2016). Dentro dessa família, a subfamília Faboideae é considerada a mais importante do ponto de vista econômico. O grão de bico (*Cicer arietinum*), a ervilha (*Pisum sativum*), a lentilha (*Lens culinaris*), o feijão (*Phaseolus vulgaris*), a soja (*Glycine max*), entre outros, são bons exemplos, interessantes sobretudo pelo conteúdo proteico disponível em seus grãos (BARROSO *et al.*, 2007; MINNEY *et al.*, 1990).

O consumo de leguminosas foi incorporado a hábitos alimentares locais de muitas regiões. A ervilha em países asiáticos, o “feijão comum” em países da América Latina e da África, e até mesmo na culinária de países do Oriente Médio, que utilizam amplamente o grão de bico e a lentilha (BARRUETO-GONZALEZ, 2008). Entretanto, é comum que diversos grãos dessa família sofram com o ataque de insetos durante o período de desenvolvimento da planta ou até mesmo durante o armazenamento. Esses insetos são classificados como insetos fitófagos e descritos como insetos praga, ou pragas agrícolas. Eles apresentam um tamanho populacional capaz de provocar vários danos às plantas, e em seus produtos e subprodutos, de forma a reduzir a quantidade e a qualidade de produtos agrícolas produzidos pelo homem (IMENES; IDE, 2002).

Cerca de 20 espécies, pertencentes a seis gêneros de Bruchinae, são capazes de se desenvolver em grãos de leguminosas armazenados e consumidos pela população (SOUTHGATE, 1979). Por isso, existe uma grande necessidade de desenvolvimento de estudos comportamentais e fisiológicos que envolvam essas espécies. Também, devido ao aumento da demanda de leguminosas no Brasil, faz-se necessário um maior investimento em condições de armazenamento destes grãos. Pois, durante o armazenamento, as sementes estão sujeitas a danos causados tanto por fatores abióticos quanto por insetos praga (GABAN; GUARNIERI, 2015).

O principal inseto praga de grãos armazenados é o *Z. subfasciatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). A infestação ocorre quando a planta ainda está em campo (fêmeas penetram nas vagens para ovipositar) ou, principalmente, quando os grãos já estão estocados em armazéns (GIRÃO FILHO, 2014). As larvas, ao eclodirem, penetram no grão, consumindo o mesmo. Mais especificamente, consumindo os cotilédones (MOLES; WESTOBY, 2004; SPERANDIO; ZUCOLOTO, 2004). Essas estruturas, também conhecidas como folhas germinais, tem papel fundamental no desenvolvimento da planta, durante a germinação e em fases iniciais (OLIVEIRA; MORAES, 1999). Elas armazenam nutrientes que são transportados

para áreas responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento do vegetal, de modo a diminuir gradualmente de tamanho até que murcham e caem (GARCÍA-CEBRÍAN *et al.*, 2003).

Os nutrientes fornecidos pelos cotilédones são substâncias de reserva (principalmente carboidratos, também lipídios e proteínas), minerais, hormônios e fotoassimilados, todos importantes para o desenvolvimento e estabelecimento da plântula. Qualquer dano a esse órgão pode resultar em prejuízo no desenvolvimento da planta, podendo até inviabilizar o grão (MULLEN, 1996; PEREIRA; SALVADORI, 2006; HAYASHI *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2018).

Espécies fitófagas provocam grandes perdas ao se alimentarem do grão ou de partes dele. Tais perdas podem ser consideradas sob diferentes aspectos: perda de peso dos grãos, do poder germinativo e do vigor da semente, do valor nutritivo, perda quanto à redução do padrão comercial e da qualidade por conta da contaminação da massa de grãos, etc. De modo complementar a esses prejuízos, somam-se também os danos indiretos que ocorrem em decorrência do favorecimento da entrada de microrganismos, como fungos, por exemplo (HOHMANN; CARVALHO, 1989). Ainda, devido à produção comercial em grande escala de apenas poucas espécies de leguminosas, muitos dos bruquíneos encontrados em armazéns possuem capacidade de se reproduzir em uma vasta diversidade de grãos (HOWE; CURRIE, 1964). Todavia, cada bruquíneo é considerado um consumidor típico de um grão específico (HOWE; CURRIE, 1964).

Diante dos fatos observou-se que o *Z. subfasciatus* é capaz de selecionar o alimento, desde que seu desenvolvimento ocorra integralmente dentro de um único grão, o qual normalmente é o *P. vulgaris* - ‘feijão comum’ (CREDLAND; DENDY, 1992). Posto isto, o conhecimento da biologia deste animal e dos mecanismos anatômicos e fisiológicos envolvidos nas respostas à interação inseto-hospedeiro é importante também para a agricultura.

1.5 Biologia de *Zabrotes subfasciatus*

Os carunchos da espécie *Z. subfasciatus* são pequenos besouros, conhecidos como pragas agrícolas (BOHEMAM, 1833). Eles têm sua origem em regiões tropicais e subtropicais das Américas Central e do Sul, encontrando-se amplamente distribuídos no Chile e nos Estados Unidos (BONDAR, 1936). Eventualmente, podem ser encontrados em regiões de clima temperado e frio (ROSSETTO, 1966, DECHECO *et al.*, 1986). São conhecidos como uma das

principais pragas do “feijão comum” (*P. vulgaris* L. - Fabaceae), utilizando-o como hospedeiro, principalmente durante o período de armazenamento (DENDY; CREDLAND 1991; HAINES 1991). As perdas geradas por ele em grãos armazenados alcançam 13% na região tropical (SOARES *et al.*, 2014; GUZZO *et al.*, 2018).

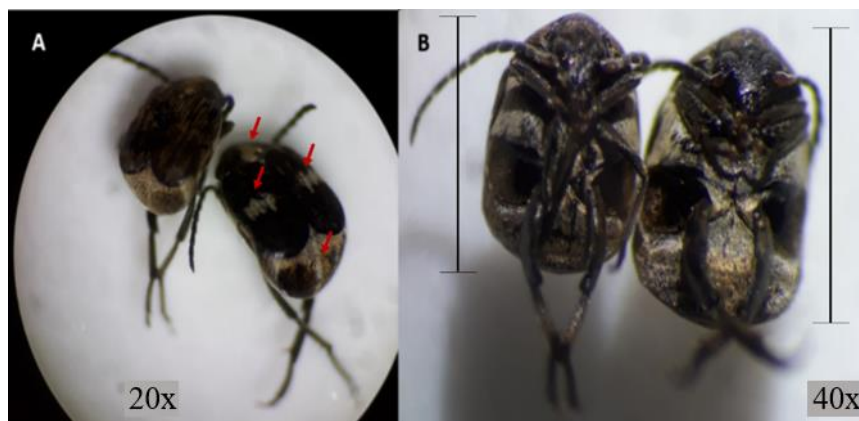
Sabe-se que *Z. subfasciatus* originalmente predou *Phaseolus lunatus*, e, provavelmente, suas larvas desenvolviam-se em ancestrais selvagens do feijão comum, na América Central e norte da América do Sul. Há também relatos que fazem referência a ataques de *Z. subfasciatus* a sementes de *P. vulgaris*, *P. lunatus* e *Vigna unguiculata* em regiões tropicais da América do Sul, América Central, Ásia e África (DAVIES, 1972; CARVALHO; ROSSETTO, 1968; HOWE; CURRIE, 1964; MENDES FERREIRA, 1960; SINGH *et al.*, 1979).

Suspeita-se que a espécie chegou a Europa por meio de feijões infestados e, a partir daí, vem sendo capaz de utilizar também outros tipos de legume como hospedeiros, ampliando seu leque de possibilidades para reprodução (MEIK; DOBIE, 1986).

Os indivíduos de *Z. subfasciatus* apresentam dimorfismo sexual (FIGURA 1). Quando adultos medem de 1,8 a 2,5 mm de comprimento, apresentam coloração castanho escura e, quando em repouso, seus élitros deixam a mostra o último segmento abdominal, o pigídeo.

Na figura 1 é possível observar que as fêmeas apresentam um tamanho corporal maior que o dos machos e também quatro manchas de cor creme nos élitros, enquanto os machos são inteiramente pardos (GALLO *et al.*, 1988; YOKOYAMA, 2006).

Figura 1 - Dimorfismo sexual apresentado pela espécie *Z. subfasciatus*.



Fonte: Do Autor (2021).

Nota: *Zabrotes subfasciatus*: (A) Vista dorsal, macho (à esquerda) e fêmea (à direita). Setas apontam para as quatro manchas de cor creme, características de fêmeas da espécie. (B) Vista ventral, macho (à esquerda) e fêmea (à direita). Barras delimitam o tamanho corporal. Observação em lupa com aumentos de 20x e 40x, respectivamente.

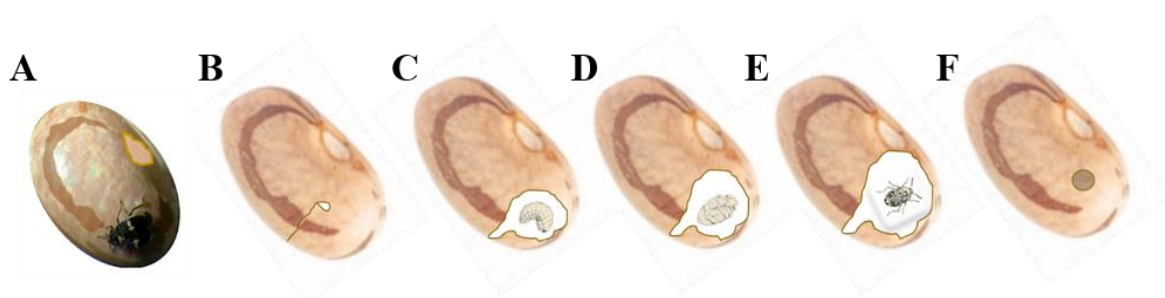
As fêmeas de *Z. subfasciatus* (Coleoptera: Bruchinae) podem se reproduzir de forma a ovipositar em sementes que foram expostas por abertura da vagem (deiscência) ou como consequência da manipulação prévia de outros predadores (BALACHOWSKY, 1962). Entretanto, diferentemente dos outros bruquíneos, elas precisam de um contato direto com os grãos para estimular o desenvolvimento ovariano (CREDLAND; DENDY, 1992). Pode ser este o motivo que levou os *Z. subfasciatus* a se adaptarem melhor em armazéns do que em campo (CARVALHO; ROSSETO, 1968).

Até o presente momento não existe um conhecimento aprofundado sobre a influência de fatores ecológicos na fisiologia reprodutiva dos besouros da subfamília Bruchinae. Ainda assim, há estudos relacionando alguns bruquíneos a seus hospedeiros. Esses estudos revelam que as sementes e as vagens da planta hospedeira são capazes de aumentar o número de encontros sexuais da espécie. Os resultados refletem na estimulação da oogênese e na postura de ovos pelo inseto, de forma que as larvas já iniciem seu desenvolvimento ao entrarem em contato com o alimento que utilizarão (LABEYRIE, 1962; HUIGNARD, 1973; POUZAT, 1970; ALZOUMA; HUIGNARD, 1981; PIMBERT; PIERRE, 1983).

Em condições adequadas, as fêmeas do *Z. subfasciatus* depositam seus ovos elípticos sobre os grãos. Esses grãos são protegidos por uma substância secretada na hora da oviposição, a qual é responsável por fixá-los firmemente à semente (SOUTHGATE, 1979).

Segundo Carvalho e Rosseto (1968), a larva que eclode do ovo fixado no grão pelo *Z. subfasciatus* perfura o tegumento da semente e completa o seu desenvolvimento, alimentando-se somente do conteúdo ali encontrado (SOUTHGATE, 1979; CREDLAND; DENDY, 1992). Ao se desenvolver, transforma-se em pupa e, quando o desenvolvimento se completa, constrói uma janela circular na testa da semente, por onde sai para a vida adulta (FIGURA 2).

Figura 2 - Ilustração do processo de oviposição, realizado por fêmeas de *Z. subfasciatus*, e do desenvolvimento do tipo holometábolo apresentado pela espécie.



Fonte: Do Autor (2021).

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

As condições ideais para o desenvolvimento do *Z. subfasciatus* são de 32°C e 70% de umidade relativa do ar, com uma temperatura limite de 38°C (HILL, 1990; CORRÊA *et al.*, 2021). O período médio de desenvolvimento do ovo ao adulto é por volta de 34 dias, e depende da temperatura ambiente (DENDY; CREDLAND, 1991).

O máximo de fecundidade registrado por uma fêmea foi de 55 ovos, porém a média é cerca de 35 ovos por fêmea, com um pico de oviposição ocorrendo, geralmente, no terceiro ou quarto dia da emergência (DENDY; CREDLAND, 1991; TEIXEIRA; ZUCOLOTO, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2008).

O período de oviposição é de no máximo 12 dias, sendo raro ovipositarem nos últimos dias. Em média 75% dos ovos colocados sobre os grãos dão origem a um adulto (TEIXEIRA; ZUCOLOTO, 2012). E, quando adultos, os bruquíneos desempenham apenas função reprodutiva (ROMERO-NAPOLES, 2002; KINGSOLVER, 2004).

Ademais, na fase adulta os *Z. subfasciatus* geralmente não se alimentam (CORRÊA *et al.*, 2020). No momento da oviposição, as fêmeas escolhem grãos com recursos disponíveis em abundância para seus descendentes, garantindo que o desenvolvimento ocorra com sucesso

(CARVALHO; ROSSETTO, 1968). Elas determinam a quantidade e a qualidade do alimento que irá prepará-los para toda a vida (SINGER, 1986).

1.6 Interação inseto - hospedeiro: respostas fisiológicas do inseto a compostos voláteis

Estudos que visam as estratégias de seleção para a procura do melhor hospedeiro sugerem a existência de uma sequência de eventos, cuja ordem pode ser dividida em duas fases. A primeira é definida como “fase da procura”. Ela tem duração até o momento em que é firmado o contato com o alimento, ou com o potencial hospedeiro, através de informações visuais e olfatórias. A segunda é definida como “fase de reconhecimento”. Durante essa fase, o inseto se certifica que encontrou exatamente aquilo que procurava e permanece no sítio até o momento da ingestão ou oviposição (SCHOONHOVEN; VAN LOON; DICKE, 2005).

É notório que os insetos apresentam habilidade para diferenciar de forma precisa até mesmo as menores quantidades de uma mistura, ou ainda, de um odor específico presente no ambiente ao seu redor (THOMAZINI, 2009). Também é descrito que a comunicação química é a forma mais utilizada por esses animais durante a localização de seus hospedeiros. Insetos fitófagos comumente encontram os grãos ideais através de odores liberados pela estrutura vegetal e selecionam o seu hospedeiro através de recursos visuais e olfatórios (DIAS-PINI *et al.*, 2016).

Apesar de existirem diversos tipos de comunicação, a comunicação química é a única que podemos encontrar em todo e qualquer ser vivo. É utilizada tanto em relações intraespecíficas (organismos da mesma espécie) quanto interespecíficas (organismos de espécies diferentes) (BROWN; EISNER; WHITTAKER, 1970; LAW; REGNIER, 1971). Os compostos químicos envolvidos nesse tipo de comunicação são denominados semioquímicos (“sinais químicos” – NORDLUND, LEWIS, 1976) ou, de maneira mais específica, infoquímicos (DICKE; SABELIS, 1988; VILELA; DELLA LUCIA, 2001). E encontram-se divididos em dois grandes grupos: os feromônios e os aleloquímicos.

Os feromônios são substâncias liberadas por organismos vivos e detectadas por outros indivíduos da mesma espécie, de maneira a gerar mudanças comportamentais específicas (DICKE; SABELIS, 1988). Já os aleloquímicos possibilitam relações entre indivíduos de espécies diferentes e podem ser divididos, basicamente, em três grupos: alomônios, cairomônios e sinomônios. Os alomônios são compostos utilizados principalmente para defesa

do organismo, favorecendo, portanto, a espécie emissora do sinal; os cairomônios são substâncias liberadas que favorecem os receptores do sinal; e os sinomônios são aqueles capazes de favorecer tanto o emissor quanto o receptor do sinal (SILVA, 2005). Essas moléculas de odor são liberadas no ambiente e reconhecidas pelos animais através de sistemas associados à olfação.

No caso dos insetos, o reconhecimento de moléculas de odor ocorre através de órgãos olfativos periféricos, presentes basicamente nas antenas, podendo ser reconhecidas também através dos palpos labiais e/ou maxilares (HANSSON; STENSMYR, 2011). Eles recebem a informação sobre o odor presente no ambiente através de neurônios olfativos associados a sensilas. As sensilas recobrem a superfície do órgão, permitindo a passagem das moléculas e encaminham a informação ao cérebro do animal para gerar respostas ao estímulo (WICHER, 2015).

Quase todos os organismos vivos respondem a odores oriundos do ambiente e contam com um sistema olfatório para a sobrevivência e a reprodução (GRABE; SACHSE, 2018). Os animais, assim como as plantas, podem utilizar compostos voláteis para sua comunicação e interação com o ambiente (DUDAREVA *et al.*, 2006). Essas substâncias são importantes para diversas atividades comportamentais, tais como: a localização de presas, forma de defesa ou agressividade, no processo de seleção de plantas, na escolha de locais para oviposição, no cortejo e acasalamento para animais (feromônios), na organização de atividades sociais, entre outras (SONENSHINE, 1985; WALGENBACK *et al.*, 1987; BURKHOLDER, 1990; FOSTER; HARRIS, 1997; VILELA; DELLA LUCIA, 2001a; STÄDLER, 2002).

Atualmente, são conhecidos um mínimo de 1700 compostos voláteis que foram isolados de mais de 90 famílias de plantas (KNUDSEN; GERSHENZON, 2006). Esses compostos podem ser formados em diferentes partes das plantas, ou seja, pelas folhas, flores, frutos e raízes. Os voláteis vegetais chegam a somar por volta de 1% dos metabólitos secundários. Eles são representados por uma gama de substâncias (terpenóides, benzenóides/fenilpropanóides, derivados de ácidos graxos e de aminoácidos) e podem agir de maneira a atrair ou repelir predadores, sendo bem específicos em sua interação (DUDAREVA *et al.*, 2004).

De forma geral, os insetos possuem a habilidade de distinguir com precisão quantidades de um determinado odor, ou até mesmo de uma mistura deles, ainda que exista uma variedade de outros odores ao redor (THOMAZINI, 2009). Isso permite, por exemplo, que uma fêmea acasalada, à procura do local ideal para ovipositar, seja capaz de localizar a planta hospedeira mesmo que existam outras substâncias ao redor (SHOONHOVEN *et al.*, 2007). O

reconhecimento ocorre, principalmente, por meio da utilização de recursos olfatórios (GADENNE *et al.*, 2016).

Estudos realizados com fêmeas de *Z. subfasciatus* indicam que a semente de *P. vulgaris* por si só é capaz de estimular a oogênese, o que sugere que a atividade reprodutiva das fêmeas pode ser modulada por informações olfatórias, gustatórias e/ou táteis (PIMBERT; PIERRE, 1983). Estudos anteriores, realizados pelo mesmo grupo, já haviam assinalado que o comportamento de reconhecimento do hospedeiro, praticado por *Z. subfasciatus*, ocorria de forma que a fêmea do inseto andava sobre os grãos de maneira a examinar cuidadosamente a superfície do grão com suas antenas, maxilares e palpos labiais (PIMBERT, 1980).

Em interações do tipo inseto-planta é essencial encontrar e selecionar o hospedeiro ideal. Ele é capaz de preencher as necessidades nutricionais e representa um sítio adequado para oviposição (BRUCE *et al.*, 2005). A procura por esse hospedeiro é realizada com base em uma combinação de recursos visuais, olfatórios e gustatórios os quais consistem basicamente em órgãos especializados na captação e transmissão de estímulos olfativos e mecânicos (FERNANDEZ; HILKER, 2007). Esses órgãos realizam suas funções com grande sensibilidade e especificidade, sendo capazes de perceber mudanças químicas no ambiente, como diferenças na concentração ou na composição de compostos. Por esse motivo, os compostos orgânicos voláteis tornaram-se alvos em pesquisas voltadas para o controle seletivo de insetos praga (BURKHOLDER, 1990).

Os receptores olfativos neuronais são frequentemente encontrados nas antenas e, portanto, é também provável que substâncias voláteis produzidas pela planta hospedeira sejam detectadas por essas estruturas (SATO; TOUHARA, 2009; CAREY; CARLSON, 2011; HANSSON; STENSMYR, 2011). A extremidade do maxilar e os palpos labiais igualmente possuem receptores. Seus receptores exibem função gustativa, estando os dos palpos particularmente ativos durante a fase de reconhecimento da planta hospedeira (PIMBERT, 1983). Esses receptores são denominados sensilas e são frequentemente associadas com o perfil comportamental e com a escolha do hospedeiro (SCHNEIDER, 1964; OCHIENG *et al.*, 2000). A caracterização dessas estruturas em diversas espécies de besouros é descrita por muitos estudos através de técnicas de microscopia eletrônica de varredura - MEV (RITCEY; MCLVER, 1990; JOURDAN *et al.*, 1995; MERIVEE *et al.*, 1998, 1999, 2002; BARTLET *et al.*, 1999; LOPES *et al.*, 2002; SAID *et al.*, 2003). Entretanto, poucos trabalhos enfatizam a subfamília Bruchinae (HU; ZHANG; WANG, 2009; URBANEK; TUSZCZEK; KAPUSTA, 2016).

As sensílas podem apresentar funções mecano, químio, termo e higrorreceptoras. A função exercida é associada com a morfologia apresentada (CHAPMAN, 1998). Também é descrito que sensilas do tipo tricoide, caética e basicônica são encontradas em segmentos antenais e em palpos de insetos. As sensílas tricóideas têm função químio e também mecanorreceptora. Respondem a estímulos mecânicos, a feromônios e a substâncias atrativas - compostos voláteis, liberados por possíveis hospedeiros (ZACHARUK, 1980; STEINBRECHT; GNATZY, 1984; STEINBRECHT, 1987; HALLBERG *et al.*, 1994; KEIL, 1997; STEINBRECHT, 1997; HANSSON, 1999; HILL, 2009). As sensilas caéticas podem ter função quimiorreceptora de contato (ZACHARUK, 1985; BARTLET *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2016). E as sensilas basicônicas demonstram ter função olfatória. Normalmente apresentam superfície com um grande número de poros (ZACHARUK, 1985; HANSSON, 1999; KELLING *et al.*, 2002; MISSBACH *et al.*, 2014).

Já as sensilas stilocônica e coelocônica, por exemplo, não são encontradas em antenas, estando presentes apenas em segmentos terminais de palpos bucais e maxilares. Apresentam, respectivamente, função quimiorreceptora e termo/higrorreceptora. São associadas ao reconhecimento de compostos não voláteis de sementes de plantas, por função gustatória, e frequentemente encontradas em palpos de larvas e em estágios iniciais do desenvolvimento de insetos (ISHIKAWA; HIRAO, 1963; ALTNER *et al.*, 1983; STEINBRECHT, 1998; NAGNAN-LE MEILLOUR *et al.*, 2000; TANG *et al.*, 2014). Além disso, é conhecida a presença de múltiplas sensilas também em estruturas corporais como apêndices bucais, patas e ovipositor. Elas seriam menores e estariam presentes em menor quantidade na estrutura reprodutiva (RICE, 1977, 1982; CRNJAR *et al.*, 1989; VAN LENTEREN *et al.*, 2007; KLINNER *et al.*, 2016). Aliás, trabalhos já concluídos demonstraram que besouros do feijão fazem uso de sensilas, tanto das antenas quanto dos palpos maxilares, na intenção de identificar seu hospedeiro (BRUCE *et al.*, 2005; FIELD *et al.*, 2000; SZENTESI, 1976). Os palpos possuem quimiorreceptores que participam do processo de reconhecimento da superfície das sementes utilizadas pelo inseto (POUZAT, 1981).

Sinais ambientais percebidos pelos carunchos parecem desencadear as respostas fisiológicas, particularmente aquelas associadas a reprodução. As respostas do *Z. subfasciatus* à presença do hospedeiro mostram-se muito mais acentuadas quando o contato é com a semente do que quando é com a vagem (PIMBERT, 1983). Dessa forma, pode-se inferir que quando os grãos ainda estão dentro da vagem não ocorre um contato profundo do inseto com os voláteis. Talvez seja esse o motivo das respostas fisiológicas parecerem menos intensas nesse contexto. Posto isto, é fato a necessidade de estudos mais aprofundados das estruturas associadas às

respostas fisiológicas em insetos perante o reconhecimento de compostos orgânicos voláteis liberados pelas plantas no ambiente.

2 PROBLEMA E HIPÓTESE

Trabalhos prévios mostraram a existência em *Z. subfasciatus* da seguinte hierarquia de preferência de hospedeiros para oviposição: feijão > soja > lentilha \geq grão de bico (TEIXEIRA *et al.*, 2008). Foi demonstrado ainda que esta hierarquia pode ser parcialmente modificada mediante experimentos de seleção artificial, sugerindo a existência de plasticidade fenotípica capaz de permitir mudanças evolutivas que incluam a utilização de novos hospedeiros (TEIXEIRA *et al.*, 2008; 2009; 2016). Esta capacidade adaptativa requer que a fêmea de alguma maneira reconheça o substrato de oviposição, o aceite ou o rejeite. Várias características das sementes podem ser responsáveis por determinar o comportamento final. Entre elas se encontram a textura e o tamanho da semente e, ainda, compostos das sementes como aminoácidos, inibidores de proteinases, alcalóides, além de substâncias voláteis (compostos orgânicos voláteis, em inglês VOCs) (JANZEN, 1981; SZENTESI, 2003). Porém, como hipotetizado por Teixeira et al. (2008), o fator determinante da escolha deve ser percebido pela fêmea antes de ovipositar. O tamanho e a textura da semente parecem não ser determinantes (MARTELETO; LOMÔNACO; KERR, 2009). Assim, neste trabalho sustentamos a hipótese de que compostos voláteis emanados pelas sementes são os determinantes da escolha de hospedeiro por fêmeas de *Z. subfasciatus*. Estes compostos agiriam sobre as fêmeas atraindo-as às sementes para serem usadas como substrato de oviposição desencadeando respostas fisiológicas do eixo olfação-cérebro-hormônios reprodutivos-ovogênese.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral identificar mecanismos fisiológicos envolvidos na seleção de hospedeiro por fêmeas de *Z. subfasciatus*.

3.2 Objetivos específicos

Encontram-se listados abaixo os objetivos específicos do presente trabalho:

- a) avaliar a probabilidade de atração/rejeição em fêmeas de *Z. subfasciatus* (criados em feijão) por sementes de diferentes espécies de leguminosas (feijão, grão de bico, lentilha e soja);
- b) investigar as possíveis diferentes respostas de diversas partes da semente (tegumento e endosperma + embrião) no comportamento de atração/rejeição sobre fêmeas de *Z. subfasciatus*;
- c) identificar os compostos voláteis presentes em sementes do hospedeiro e possivelmente responsáveis pelos efeitos de atração/rejeição do *Z. subfasciatus*;
- d) analisar a participação das antenas no processo de seleção do hospedeiro;
- e) apontar características morfológicas e fisiológicas de indivíduos adultos potencialmente envolvidas no reconhecimento de voláteis hospedeiros-específicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Visão geral dos experimentos

Para testar a hipótese de que os *Z. subfasciatus* são atraídos por compostos voláteis liberados pelos grãos foram realizados testes comportamentais. Os testes ocorreram em arenas de dois tipos: múltiplas simultâneas (todas as opções de grãos testadas ao mesmo tempo) e múltiplas pareadas (duas opções testadas por vez). Após, era necessário saber se os compostos atraentes presentes nos grãos estavam localizados em uma parte específica das sementes ou dispersos por toda a semente. Então, para responder a esta questão, foram realizados testes em arenas de forma a confrontar grãos inteiros vs partes desses grãos (tegumento e endosperma + embrião).

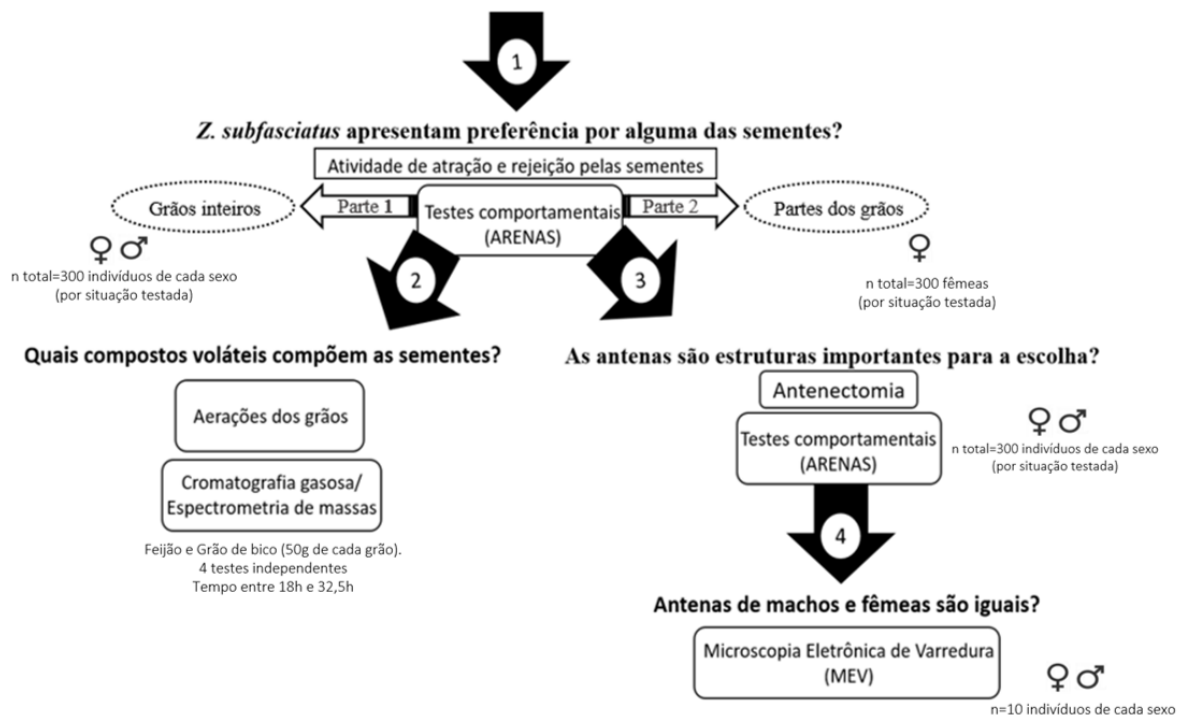
Sementes de feijão e de grão de bico foram as escolhidas para ter seus compostos extraídos por processos de aeração, como forma de investigar quais seriam os voláteis liberados por esses grãos. E as aerações foram seguidas de análises por cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas, para a identificação das substâncias presentes em cada um dos grãos.

Como forma de averiguar a participação das antenas durante a procura e reconhecimento do hospedeiro ideal, testes comportamentais foram realizados com carunchos antenectomizados (sem a antena direita, sem a antena esquerda e sem as duas antenas simultaneamente) em contato com sementes de feijão (hospedeiro usual) e de grão de bico (hospedeiro mais evitado).

Antenas de machos e fêmeas do *Z. subfasciatus* foram preparadas e analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), para investigar a ocorrência de dimorfismo sexual em estruturas sensitivas de reconhecimento químico.

A figura 3 apresenta um esquema representativo dos procedimentos realizados (fluxograma experimental).

Figura 3 - Fluxograma experimental



Fonte: Do autor (2021).

Legenda: Representação esquemática da sequência de experimentos realizados para análise comportamental e química. Os números 1, 2, 3 e 4 dentro das setas escuras indicam a sequência de experimentos realizada durante o desenvolvimento do trabalho.

4.2 Populações de carunchos – *Z. subfasciatus*

As populações matrizes de *Z. subfasciatus* foram coletadas em feijões (*P. vulgaris*) oriundos de residências e armazéns de leguminosas nas cidades de Alfenas e de Poços de Caldas, Minas Gerais. Foram mantidas em estufas entomológicas (fabricação própria) sob condições controladas de temperatura (29°C) e umidade (70%), criadas em quantidade abundante de hospedeiro (feijão, *P. vulgaris*) e fotoperíodo ambiente (simulando armazém). O estabelecimento de colônias e a criação das populações de *Z. subfasciatus* foram adaptados de Teixeira e colaboradores (TEIXEIRA; ZUCOLOTO, 2003; BARROS-DE-SOUZA; TEIXEIRA, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2008).

As populações de *Z. subfasciatus* utilizadas no desenvolvimento deste trabalho foram mantidas em condições ambientes de temperatura, umidade e fotoperíodo, assim como são encontradas nos armazéns comerciais. Foram criadas em frascos transparentes de plástico (1L e 2 L) ou de vidro (500 mL). Os recipientes eram devidamente identificados e vedados por um

pedaço de tecido (tule) preso a um elástico. Dessa forma, o ambiente se mantinha bem aerado e o tecido impedia o escape dos animais. Os frascos eram chacoalhados gentilmente em alguns dias da semana para favorecer a aeração do ambiente. Ao nascerem, os adultos eram selecionados aleatoriamente e utilizados em experimentos. Caso não houvesse experimentos, eram mantidos em recipientes de cultivo por cerca de 15 dias, permanecendo em contato com o feijão para se reproduzirem e as fêmeas ovipositarem (100 casais de adultos para cada 50 gramas de feijão). Após esse período, eram retirados e descartados, e novos organismos apareciam em até 15 dias, seguindo uma sequência de desenvolvimento com duração de aproximadamente 32 dias (VALENCIA *et al.*, 1986). As sementes utilizadas no experimento foram analisadas previamente, e por qualquer sinal de dano foram descartadas.

4.3 Sementes

As amostras de sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), grão de bico (*Cicer arietinum* L.), soja (*Glycine max*) e lentilha (*Lens culinaris*) foram compradas no Mercado Central da cidade de Poços de Caldas, Minas Gerais, para a realização de experimentos com arenas em testes múltiplos simultâneos (FIGURA 4). Durante os experimentos ocorreram revezamentos utilizando o feijão orgânico (marca: COOPER natural – feijão carioca tipo 1), o qual também foi comprado em Poços de Caldas. Foi comprovado que o inseto escolhia o grão orgânico em proporções similares aos grãos do armazém. Para os experimentos em arenas de testes múltiplos pareados, foram utilizadas amostras de sementes das mesmas espécies de grãos, mas que foram doadas pela EMBRAPA e pela Empresa Sementes Aliança Nova Era LTDA, maiores informações encontram-se no quadro 1.

Figura 4 - Grãos utilizados durante os experimentos.



Fonte: Do autor (2021).

Legenda: (A) Feijão (*P. vulgaris*), (B) grão de bico (*C. arietinum*), (C) soja (*G. max*) e (D) lentilha (*L. culinaris*).

Quadro 1 - Descrição dos cultivares dos grãos utilizados em experimentos de arenas múltiplas pareadas.

Grão	Cultivar/ Variedade	Origem/Doador
Feijão Carioca	BRS Estilo	Sementes Aliança Nova Era LTDA EPP Site: www.sementesaliança.com.br
Soja	BRS 284	EMBRAPA Secretaria de Inovação e Negócio (SIN), Londrina-PR Site: www.embrapa.br
Lentilha	BRS Silvina	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Brasília-DF Site: www.embrapa.br/hortaliças
Grão de bico	BRS Aleppo	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Brasília-DF Site: www.embrapa.br/hortaliças

Fonte: Do Autor (2021).

Feijão (*Phaseolus vulgaris*)

P. vulgaris é vulgarmente conhecida como feijão comum. Seu gênero totaliza mais de 50 espécies e tem o Brasil como maior produtor (PINHEIRO; DE FARIA, 2005; PROLLA, 2006; FAO, 2019). Nessa semente são encontrados nutrientes essenciais como proteínas, sais

minerais (ferro, cálcio, magnésio e zinco), vitaminas (com um destaque para as do complexo B), e fibras (MESQUITA, 2007). Geralmente apresenta 1-octen-3-ol e 3-hexenol em sua composição, podendo também conter alcanos, aldeídos, hidrocarbonetos aromáticos, alcoois, cetonas, terpenos e furanos, dependendo do cultivar (OOMAH; LIANG, 2007).

Grão de Bico (*Cicer arietinum*)

Ocupa o terceiro lugar a nível de importância econômica no mundo, sendo o primeiro e o segundo lugares ocupados, respectivamente, pelo feijão e pela soja (MANARA; RIBEIRO, 1992; ICRISAT, 2013). É conhecido por ser um bom recurso na obtenção de energia, proteínas, vitaminas (A, B6, C, E e K), fibras e minerais (cálcio, fósforo, potássio, zinco, magnésio, ferro e sódio) (SÁNCHEZ-OCANÁ, 2009). Possui compostos fitoquímicos capazes de beneficiar a saúde, sendo aceito inclusive para tratamentos medicinais, em determinadas regiões da China (WOOD; GRUSAK, 2007).

Trabalhos prévios revelaram que a semente possui ácidos fenólicos (SOSULSKI; DABROWSKI, 1984), isoflavonoides (ZHAO *et al.*, 2009), e outros 132 compostos que apareceram em análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Estudos realizados em 2006 encontraram mais de 230 metabólicos secundários no gênero *Cicer*. Análises de amostras de cotilédones germinados, folhas, raízes, mudas, nódulos e sementes de *C. arietinum* também continham diversas substâncias, sendo parte delas caracterizada como compostos voláteis (STEVENSON; ASLAM, 2006).

Soja (*Glycine max*)

A soja é considerada a leguminosa com maior teor de proteínas e óleos. Por este motivo, tornou-se uma semente muito utilizada na alimentação animal, inclusive de humanos (MACIEL; POLETINE, 2004). Além de ser uma semente rica em proteínas, vitaminas, sais minerais e isoflavona, ela também apresenta fibras solúveis e insolúveis, e ácido fítico em sua constituição.

Possui compostos pertencentes às seguintes classes químicas: álcool, aldeído, éster, lactona, cetona e terpenóide (BOUÉ, 2003). E, de acordo com dados emitidos pela EMBRAPA,

o cultivar utilizado nesse trabalho (BRS284) apresenta um teor médio de 38,7% em proteínas e 20,4% em óleos.

Lentilha (*Lens culinaris*)

Uma das primeiras leguminosas a ser domesticada. Foi descoberta ao norte da Síria, com provável origem na Região Mediterrânea (HAWTIN *et al.*, 1980; DUKE, 1983). Apresenta grande quantidade de fitoquímicos bioativos, característica que lhe confere tamanha consideração como um bom recurso antioxidante. Alcaloides, glicosídeos, fitoesteróis, terpenoides, compostos fenólicos solúveis e não solúveis, flavonoides, taninas, carotenoides, tocoferóis, ácido fólico e saponinas são alguns exemplos. Sabe-se que também são ricas em proteínas (normalmente quantidades por volta de 20 a 30%), probióticos e minerais (GUPTA *et al.*, 2013; BELAL *et al.*, 2019).

Para a realização dos testes comportamentais com o *Z. subfasciatus* foi utilizado o cultivar BRS Silvina, que tem sua origem na Argentina e foi enviada para cultivo no Brasil.

4.4 Arena experimental

Para a realização dos testes comportamentais de preferência e escolha de hospedeiros foram fabricadas arenas experimentais. O primeiro modelo de arena foi fabricado em vidro (FIGURA 5A). Ele apresenta uma base elevada sobre a qual é colocada uma placa de Petri (diâmetro 15,0 cm), com outras 5 placas de diâmetro menor (6,5 cm) ao seu redor. As placas menores são ligadas a placa central por tubos de vidro de 2 cm de comprimento e 0.7 cm de diâmetro.

As arenas de vidro foram utilizadas durante os testes comportamentais do tipo múltiplos simultâneos. Esses experimentos tiveram duração de 120 minutos, tempo que começava a ser contado assim que os *Z. subfasciatus* eram adicionados à placa de central. A cada experimento quatro placas periféricas eram preenchidas com 10 g de diferentes grãos, sendo a quinta placa mantida vazia (controle). Outros experimentos tinham as placas periféricas preenchidas com diferentes partes de um mesmo grão (polpa, casca e grão inteiro), também mantendo uma placa vazia (controle). Considerando que sempre havia 5 variáveis, a probabilidade de escolha para

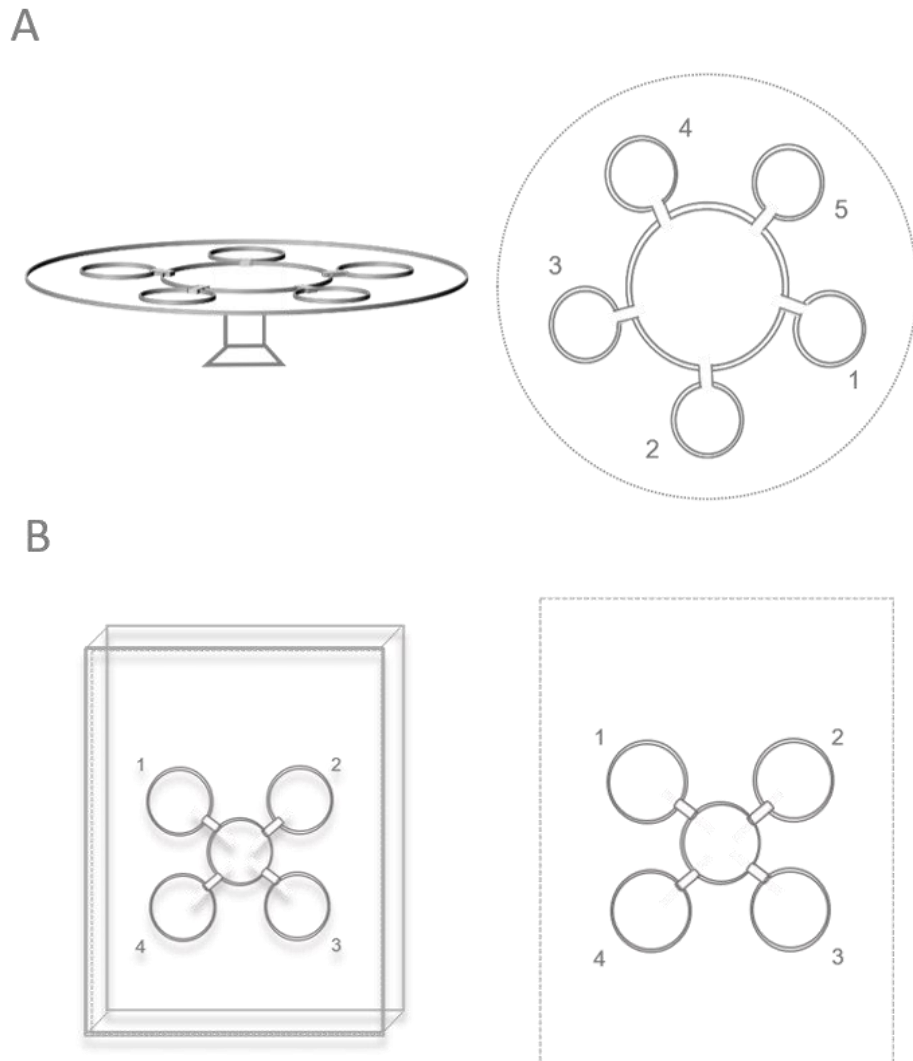
cada variável era de 20%. Foi observada a migração de *Z. subfasciatus* por toda a extensão da arena, bem como foi registrado o tempo que o caruncho levava para definir uma escolha.

O segundo modelo de arena foi construído utilizando material acrílico (FIGURA 5B). Para a confecção deste modelo, foi utilizada uma base retangular em isopor (envolvida por um plástico para evitar desgaste) e cinco placas de Petri de acrílico (OLEN, 60 x 15 mm, esterilizadas com óxido de etileno). Uma placa foi colocada em posição central e as outras quatro placas foram distribuídas ao redor dela. As placas periféricas foram ligadas a placa central por tubos de mangueira plástica transparente e atóxica, com 2 cm de comprimento e 0,4 cm de diâmetro. Esta arena foi utilizada para os testes comportamentais do tipo múltiplos pareados, classicamente denominados “COM chance de escolha” e “SEM chance de escolha”.

Testes com chance de escolha consistiram em confrontar grão A vs grão B, ou grão vs controle. Considerando que sempre havia 2 variáveis, a probabilidade de escolha para cada variável era de 50%. Os testes sem chance de escolha ocorreram com disputa entre placas preenchidas com um mesmo tipo de grão ou com todas as placas vazias (apenas situação controle). A finalidade dos testes sem chance de escolha foi demonstrar que todas as placas periféricas apresentam a mesma probabilidade de escolha, eliminando qualquer interferência que ocorresse por defeitos na estrutura da arena.

Os testes pareados tiveram duração de 120 minutos, tempo que começava a ser contado assim que os *Z. subfasciatus* eram adicionados à placa de central. A cada experimento as placas periféricas eram preenchidas com 9 g de grãos, ou eram mantidas vazias (controle). O número de indivíduos que optou por algum grão foi contabilizado apenas ao final do experimento, e não durante todo o tempo, como ocorria nos testes simultâneos. Os valores de escolha foram registrados para a plotagem dos gráficos e análise dos resultados.

Figura 5 - Ilustração das arenas experimentais.



Fonte: Do autor (2021).

Legenda: (A) Vista lateral e superior da arena de testes múltiplos simultâneos. Um aparato de vidro que contém uma placa de Petri central (15,0 cm de diâmetro) ligada por tubos de vidro (2cm de comprimento X 0.7cm de diâmetro) a outras 5 placas de petri menores (6,5 cm de diâmetro). (B) Vista semi lateral e superior da arena de testes múltiplos pareados. Base em placa retangular de isopor (2cm de espessura) que contém cinco placas de petri (60 x 15 mm). Uma central ligada por tubos de mangueira atóxica (2cm de comprimento X 0.4cm de diâmetro) e outras quatro placas distribuídas ao redor dela. Os diferentes grãos adicionados nessa arena devem ocupar as posições 1;3 ou 2;4, ou seja, organizados de maneira intercalada, exceto quando forem realizadas arenas sem opção de escolha, onde deve-se adicionar o mesmo grão nas quatro posições possíveis.

4.5 Testes de atração/rejeição em arenas

Z. subfasciatus foram colocados em arenas de escolha para testar a hipótese de que compostos emanados pelas sementes seriam os responsáveis pela hierarquia de preferência para oviposição apresentada por fêmeas dessa espécie.

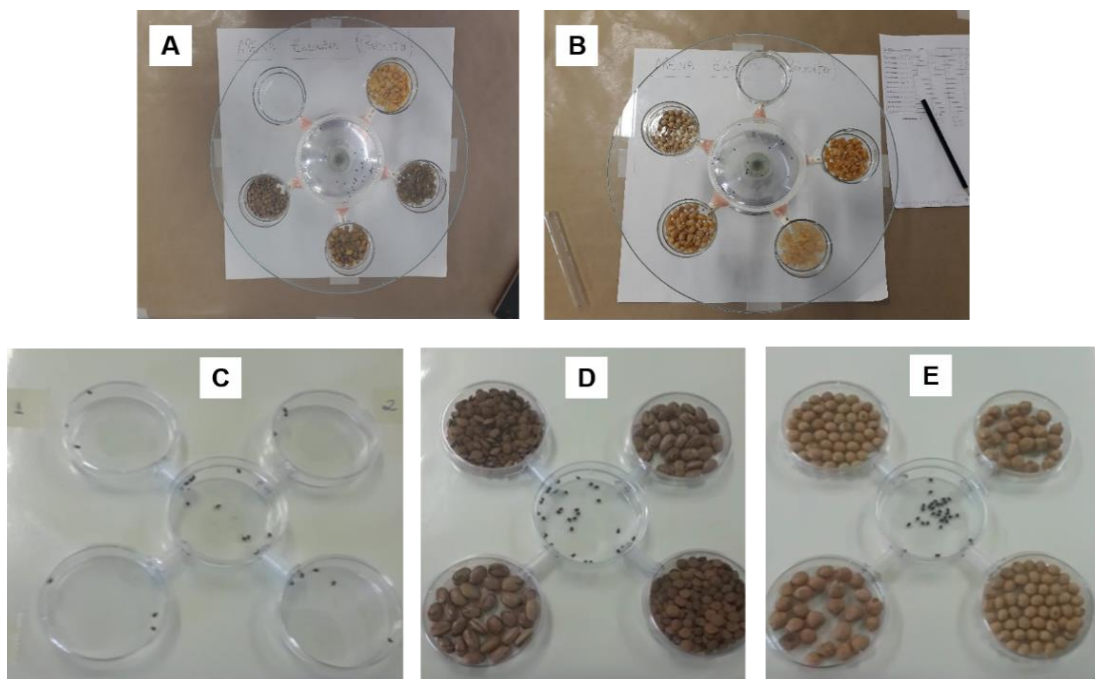
Trinta *Z. subfasciatus* (fêmeas ou machos) de até 24 h de idade foram coletados, de maneira aleatória, mantidos em um tubo de vidro com tampa por cerca de 5 minutos (a fim de acalmá-los), e colocados no centro da arena de testes múltiplos simultâneos (FIGURA 5A). Cada placa na periferia da arena continha 10 gramas em grãos de feijão, soja, lentilha ou grão de bico, mais um compartimento sem grãos (controle) (FIGURAS 6A e 6B). Os carunchos foram observados durante 120 minutos e os seguintes dados experimentais foram registrados: (1) o número de indivíduos que escolheu cada um dos compartimentos, (2) o horário que cada escolha ocorreu, (3) a temperatura ambiente e (4) a umidade relativa do ar. A temperatura e a umidade eram medidas no início de cada experimento, de acordo com os valores publicados no site weather.com para a cidade de Alfenas, Minas Gerais. Os dados registrados referem-se a 10 experimentos independentes.

Considerando que seriam encontradas hierarquias de escolha nestes experimentos, também foram realizados testes que visavam identificar o sítio de origem dos compostos voláteis, casca ou interior das sementes. Para isso, as fêmeas foram colocadas na arena central e tiveram que escolher entre um dos cinco compartimentos: (1) tegumento, (2) endosperma + embrião, (3) grão inteiro, (4) grão inteiro umidificado e (5) ausência de grãos (compartimento controle); (FIGURAS 6A e 6B).

Testes múltiplos simultâneos foram realizados também com machos, sob as mesmas condições. O propósito era determinar o grau de participação dos machos no processo de escolha do hospedeiro.

Embora os carunchos se deparem simultaneamente com diversas fragrâncias em seu habitat natural, foram realizados ensaios adicionais que consistiram na análise dois a dois com chance de escolha (4; 50% - FIGURAS 6D e 6E) ou apenas uma variável para escolha, distribuída nas diferentes regiões da arena (testes sem chance de escolha), ilustrados na figura 6C. A intenção desses ensaios foi de investigar com maiores detalhes a hierarquia de escolha do hospedeiro pelo *Z. subfasciatus*, diminuindo o número de variáveis e favorecendo os resultados estatísticos, com maior precisão.

Figura 6 - Arenas de escolha.



Fonte: Do Autor (2021).

Legenda: Testes de atração por diferentes partes do grão realizados em “arena múltipla simultânea”: (A) Lentilha e (B) soja. Testes de atração realizados em “arenas múltiplas pareadas”: (C) sem chance de escolha – situação controle e (D) com chance de escolha - diferentes grãos, lentilha vs feijão, (E) soja vs grão de bico.

4.6 Determinação da composição de voláteis dos grãos

4.6.1 Ensaios de extração por aeração

Sementes de feijão comum (*P. vulgaris* L., Fabaceae) e de grão-de-bico (*C. arietinum* L., Fabaceae) foram utilizadas para a coleta de voláteis. A escolha é associada ao fato de serem o hospedeiro usual e o hospedeiro não usual menos escolhido, respectivamente. Os cultivares encontram-se descritos no quadro 1.

Através de técnicas de aeração é possível coletar compostos voláteis emitidos pelas amostras em análise, nesse caso, as sementes hospedeiras de *Z. subfasciatus*. Durante o procedimento, os compostos são adsorvidos em polímeros especiais (carvão ativo, Porapak Q e Tenax, por exemplo) e após, são dessorvidos com a utilização de solventes químicos (hexano, diclorometano e éter etílico com alto grau de pureza) (ZARBIM, 2001).

Esses sistemas de aeração normalmente são formados por cubas de vidro que permanecem conectadas a uma entrada adaptada a uma coluna contendo carvão ativo, com a finalidade de filtrar o ar. O fluxo de ar que ali passa é capaz de arrastar os voláteis até a extremidade oposta, onde são adsorvidos no polímero. Após um determinado período de tempo, o fluxo de ar é interrompido e o sistema desconectado. Os polímeros são coletados, passam pelo processo de dessorção e a amostra coletada é armazenada adequadamente, até que seja possível efetuar a identificação dos compostos.

Os voláteis produzidos pelas sementes das plantas hospedeiras do caruncho-do-feijão foram coletados pelo método de aeração em laboratório (25 ± 2 °C, $60 \pm 10\%$ UR, fotoperíodo de 12:12 h L:E e intensidade luminosa de aproximadamente 5000 lux). Amostras de 50 g de grãos de cada uma das espécies de planta foram aeradas individualmente em câmaras cilíndricas de vidro (22 cm de comprimento \times 5 cm de diâmetro interno) durante 18 a 32 h. Foram realizadas quatro repetições para cada espécie, representadas pela coleta de voláteis de grãos de lotes distintos. Ar purificado em carvão ativado foi introduzido na câmara de aeração a 0,5 L/min, saindo pela extremidade através de uma coluna coletora de voláteis de vidro (8,5 cm de comprimento \times 0,5 cm de diâmetro interno) com 30 mg de polímero adsorvente HayeSep® Q 80/100 (Supelco, Bellefonte, PA, EUA). Foram realizadas aerações de câmaras vazias como controle para monitorar possíveis contaminantes presentes no sistema. Os voláteis foram dessorvidos das colunas coletoras utilizando-se duas alíquotas sucessivas de 150 μ L de hexano destilado em frascos de vidro de 2 mL. Foi adicionado 1 μ g de acetato de nonila (padrão interno de quantificação) em todos os extratos para quantificação dos compostos. Os extratos foram armazenados em freezer (-30°C) até o momento das análises das amostras.

4.6.2 Separação e identificação dos voláteis

Os extratos resultantes das aerações foram analisados em um cromatógrafo a gás GC-2010 (Shimadzu Corp., Quioto, Japão) com detector por ionização de chama, equipado com uma coluna capilar Rxi-1MS (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m; RESTEK, Bellefonte, PA, EUA). Foram injetados 2 μ L dos extratos em modo “splitless” a 250 °C, utilizando Hélio como gás de arraste à velocidade linear de 25 cm/s. O forno do GC foi programado com uma temperatura inicial de 40 °C por 5 min, elevando-se a 5 °C/min até 150 °C, na qual permaneceu por 1 min e, então, atingiu 250 °C a 20 °C/min (mantida por 10 min).

A quantificação dos compostos consistiu nas proporções das áreas de pico em relação ao padrão interno. Os compostos presentes nos extratos “controle” foram eliminados das análises.

Para a identificação dos compostos de interesse, foi injetado 1 μL de cada extrato/tratamento seguindo o mesmo método de GC descrito anteriormente em um cromatógrafo a gás GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu Corp., Quioto, Japão), equipado com uma coluna capilar Rtx-1 (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm ; RESTEK, Bellefonte, PA, EUA). Tanto a interface como a fonte de íons foram mantidas a 250 $^{\circ}\text{C}$. As massas foram analisadas no modo por impacto de elétrons a 70 eV, em um intervalo de 35 a 280 m/z. Os compostos foram identificados com base no Índice de retenção de Kovats (KI) e similaridade com a biblioteca NIST 11.

Tanto os ensaios de extração quanto as análises dos compostos voláteis foram realizados no Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos (INCT Semioquímicos na Agricultura) da Universidade Superior de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), em colaboração com o Professor Dr. José Maurício Simões Bento.

4.7 Retirada das antenas do *Z. subfasciatus* seguida por testes comportamentais múltiplos pareados

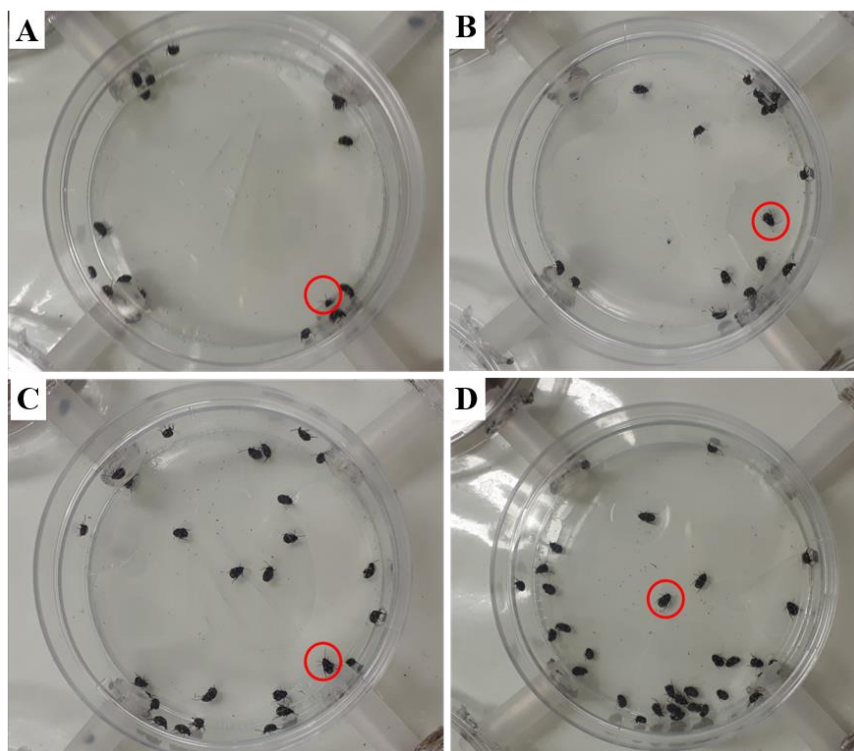
A hipótese do trabalho prediz que a escolha do hospedeiro para oviposição pelos *Z. subfasciatus* é uma consequência da atração por voláteis emanados pelas sementes. Um experimento alternativo para testá-la seria utilizar o clássico ensaio biológico com antenectomia (AMOS, 1967; TROUVELOT, 1877; FERREIRA, 2007; KHADKA, 2012; LOCKEY; WILLIS, 2015;). Assim, foram elaborados experimentos comportamentais, também em arena, que incluíram a retirada de uma das antenas (direita / esquerda) ou de ambas simultaneamente. Para isso, animais recém emergidos ou de até 12 horas foram selecionados, ao acaso, e colocados em número de cinco dentro de um microtubo (650 μL). Após, eles foram levados ao freezer (-20 $^{\circ}\text{C}$) por 3,5 minutos, apenas para anestesiá-los, visto que eles se movimentam muito rápido e isso dificultaria o processo de retirada das antenas. Em seguida, foram colocados sobre uma base de isopor e tiveram as antenas retiradas, com o auxílio de pinça e tesoura para dissecação em Lupa STEMI 305 (30x). Posteriormente, eles foram colocados em placas de Petri,

devidamente identificadas com a condição experimental, e mantidos ali por um período de recuperação, até apresentarem um máximo de 24 h de vida.

Os *Z. subfasciatus* possuem antenas com 11 segmentos. Mediante o método utilizado, era possível retirar 9 segmentos das antenas, tanto em fêmeas quanto em machos. Devido a perdas por conta do processo de anestesia do animal, era necessário separar cerca de 40% acima do número de carunchos necessários para o experimento. Assim, ocorria a separação de 200 carunchos, garantindo que pelo menos 120 estariam em ótimas condições. Afinal, as arenas eram realizadas simultaneamente, ou seja, quatro arenas por vez, sendo: (1) *Z. subfasciatus* controle (com as 2 antenas, embora também tenham passado pelo processo de anestesia), (2) *Z. subfasciatus* sem a antena direita, (3) *Z. subfasciatus* sem a antena esquerda e (4) *Z. subfasciatus* sem ambas as antenas (FIGURAS 7 A, B, C e D, respectivamente). Como o “n” era de 30 carunchos por arena, somavam-se 120 *Z. subfasciatus* necessários por experimento.

Os ensaios nas arenas tinham duração de 120 minutos. As arenas utilizadas eram do tipo múltiplas pareadas, com situação de grão vs controle (sem grãos) ou de grão A vs grão B. Ao fim deste tempo, os insetos eram contados e os resultados anotados em tabelas previamente preparadas no livro ATA.

Figura 7 - Participação das antenas durante o processo de escolha do hospedeiro por *Z. subfasciatus*.



Fonte: Do Autor (2021).

Legenda: *Zabrotes subfasciatus*, na placa central, durante a execução do experimento: (A) controle; (B) sem a antena direita; (C) sem a antena esquerda e (D) sem as duas antenas. Foram utilizados trinta insetos por teste realizado. O tempo de duração de cada experimento foi de 120 minutos, com um n=10 experimentos independentes para cada situação. As quatro situações foram sempre analisadas de forma simultânea nos testes.

4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um microscópio utilizado com a finalidade de produzir imagens de alta resolução da superfície de uma amostra. É útil para analisar a estrutura superficial de determinada amostra, aspectos topográficos (HINKS, 2009), composição e características de materiais, dentre outros (DEDAVID *et al.*, 2007).

O princípio de funcionamento deste tipo de microscópio consiste na utilização de um feixe de elétrons capaz de “varrer” a superfície da amostra ponto a ponto. A interação do feixe de elétrons com a amostra gera sinais como elétrons secundários, utilizado neste trabalho, mas também uma série de outros sinais como elétrons retroespalhados, elétrons do tipo Auger. Além disso, a interação elétrons-amostra também gera fótons, como Raios-X e catodoluminescência.

Para a obtenção das imagens por MEV, os *Z. subfasciatus* foram utilizados de forma que mantivessem o corpo inteiro, ou seja, sem a necessidade de cortes para separar estruturas

corporais específicas. Assim, carunchos foram selecionados, aleatoriamente, e anestesiados, em freezer (-20°C) durante cinco minutos. Em seguida, foram imersos em uma solução fixadora de glutaraldeído 3% em tampão fosfato (0,1M), em quantidade até cobrir a amostra, e mantidos nessa solução (a 4°C), por duas horas. Posteriormente, foram mantidos em tampão fosfato (0,1M) *overnight*. No dia seguinte as amostras foram lavadas com a solução de tampão fosfato (0,1M) por três vezes de quinze minutos e submetidos a “pós fixação” em tetróxido de ósmio (2% em tampão fosfato 0,2M) por duas horas, e lavadas com tampão fosfato (0,1M) por duas vezes de quinze minutos. Depois as amostras foram desidratadas em álcool etílico de forma seriada (na capela): 30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%, permanecendo por 10 minutos em cada uma das concentrações de álcool, com exceção da última (100%), foi deixada por três vezes de vinte minutos cada, procedimento realizado em temperatura ambiente.

Seguidamente, as amostras passaram por um processo de extração do líquido, mantendo a estrutura intacta através do fenômeno de ponto crítico (em inglês CPD – Critical Point Dryer) em uma BalTec CPD030. Dióxido de carbono e etanol (100% PA) foram os agentes de troca. Essa etapa durou cerca de duas horas, e foi efetuada de acordo com a programação do aparelho.

Finalmente foram selecionados 10 machos e 10 fêmeas para a montagem dos *stubs* de alumínio com fita colante, de forma que foi possível observar as estruturas alvo. Logo após foram pulverizados com ouro (Hitachi E-1010 / Leica EM SCD050) e levados para análises no MEV (ZEISS EVO50). As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural – LME (UFLA), Lavras, Minas Gerais.

4.9 Análises estatísticas

Testes de escolha

Seleção de hospedeiros – Testes de escolha múltiplos simultâneos e pareados: estes experimentos foram realizados utilizando 30 fêmeas ou 30 machos por teste, em um total de $n=10$ (repetições), ou seja, dez experimentos independentes. As análises foram realizadas com base na média dos resultados. Para determinar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre valores encontrados utilizamos o teste de Kruskal-Wallis, seguido por Dunn ($p < 0,05$).

Seleção de hospedeiros – Testes de escolha múltiplos pareados (Grão vs Grão): experimentos foram realizados utilizando 30 fêmeas ou 30 machos por teste, em um total de $n=10$ (repetições), ou seja, dez experimentos independentes. As análises foram realizadas com base na média dos resultados. Para determinar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre valores encontrados utilizamos o teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

Testes de escolha - investigação de partes dos grãos envolvidas na atração pelo hospedeiro: experimentos foram realizados utilizando 30 fêmeas por teste, em um total de $n=10$ (repetições), ou seja, dez experimentos independentes. As análises foram realizadas com base na média dos resultados. Para determinar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre valores encontrados utilizamos o teste de Kruskal-Wallis, seguido por Dunn ($p < 0,05$).

Testes de timing: para essas análises utilizados dados obtidos nos testes múltiplos simultâneos, ou seja, experimentos foram realizados utilizando 30 fêmeas ou 30 machos por teste, em um total de $n=10$ (repetições), ou seja, dez experimentos independentes. Para determinar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre valores encontrados utilizamos o teste de Kruskal-Wallis, seguido por Dunn ($p < 0,05$).

Testes de escolha - testes comportamentais com retirada das antenas: experimentos foram realizados utilizando 30 fêmeas ou 30 machos por teste, em um total de $n=10$ (repetições), ou seja, dez experimentos independentes. As análises foram realizadas com base na média dos resultados. Para determinar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre valores encontrados utilizamos o teste de Kruskal-Wallis, seguido por Dunn ($p < 0,05$).

Tamanho das antenas de machos e fêmeas (dados obtidos por análises de MEV): antenas de *Z. subfasciatus*, machos e fêmeas, foram retiradas para a realização de análises por Microscopia Eletrônica de Varredura. As medições de tamanho foram realizadas através do programa Image J, e os valores obtidos foram lançados no GraphPad Prism para a plotagem do gráfico. As análises foram realizadas com base na média dos resultados para a antena de 20 diferentes animais ($n=20$, sendo 10 machos e 10 fêmeas). Para determinar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre valores encontrados utilizamos o teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

* As análises estatísticas tiveram a colaboração do Professor Dr. Luiz Alberto Beijo, do Departamento de Estatística da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).

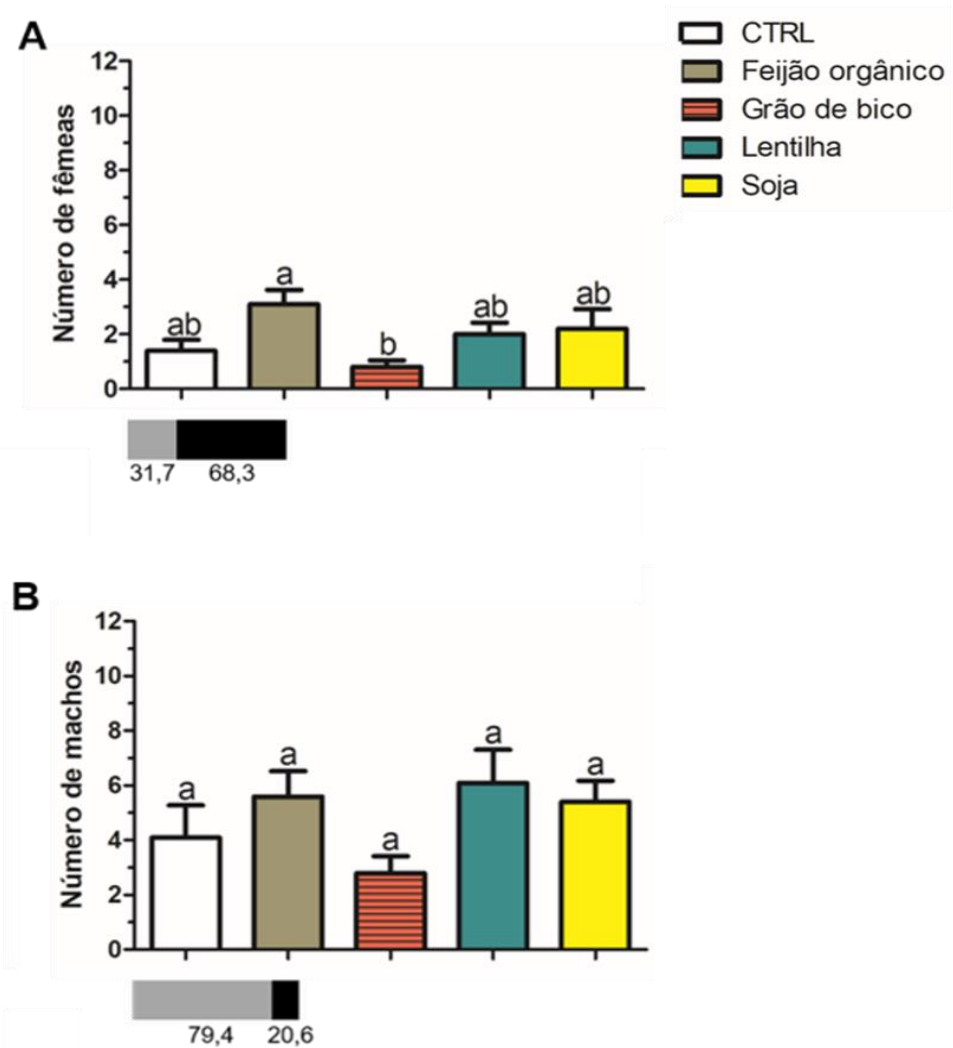
5 RESULTADOS

5.1 Hierarquia de preferência por hospedeiros de *Z. subfasciatus*: testes múltiplos simultâneos

As fêmeas manifestaram maior escolha por grãos de feijão do que por sementes de grão de bico. Não houve diferenças significativas na escolha pelos outros grãos, nem mesmo pelo controle (FIGURA 8A), $p=0,0158$ (*), feijão: $\bar{x} = 3,10/ SD = 1,66$ e grão de bico: $\bar{x} = 0,70/ SD = 0,78$.

Os machos não apresentaram preferência entre os grãos testados. Também não houve diferença de escolha entre os grãos e a situação controle (FIGURA 8B), $p=0,1109$ (ns), lentilha: $\bar{x} = 6,10/ SD = 3,81$; feijão: $\bar{x} = 5,60/ SD = 2,91$; soja: $\bar{x} = 5,40/ SD = 2,45$; controle: $\bar{x} = 4,10/ SD = 3,72$; grão de bico: $\bar{x} = 2,80/ SD = 1,93$.

Os machos parecem migrar de forma aleatória, movimentando-se rapidamente pela arena, desde o início do experimento, diferente das fêmeas. Isso fica claro ao observar as porcentagens de migração (FIGURAS 8A e 8B – barras cinza e preto abaixo dos gráficos) e o *timing* de escolha (FIGURA 9).

Figura 8 - Atividade de escolha do hospedeiro por *Z. subfasciatus*.

Fonte: Do Autor (2021).

Nota: (A) Fêmeas em contato com grãos “in natura”, (B) Machos em contato com grãos “in natura”. Os gráficos mostram apenas a média do número de *Zabrotes subfasciatus* que entrou em contato com cada grão, o restante dos carunchos permaneceu na placa central. Barras horizontais representam a porcentagem de insetos que fizeram alguma escolha (cinza) e a porcentagem de insetos que não fizeram escolha por algum grão, ficando na placa central (preta). Barras verticais representam a média \pm e.p.m. de 10 experimentos independentes. Letras iguais indicam que não há diferença significativa. ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis seguido de Dunn). Maiores detalhes sobre valores estatísticos podem ser encontrados no apêndice – Tabela 1.

5.2 Perfil do *timing* de escolha de hospedeiros por *Z. subfasciatus*

No decorrer das duas horas de observação dos experimentos em arena foram registrados cada um dos momentos em que um *Z. subfasciatus* fez a escolha por algum grão. Esses tempos foram plotados em um gráfico. O intuito era averiguar se a preferência por determinado grão se mantinha constante durante todo o tempo de experimento ou se havia variações na escolha.

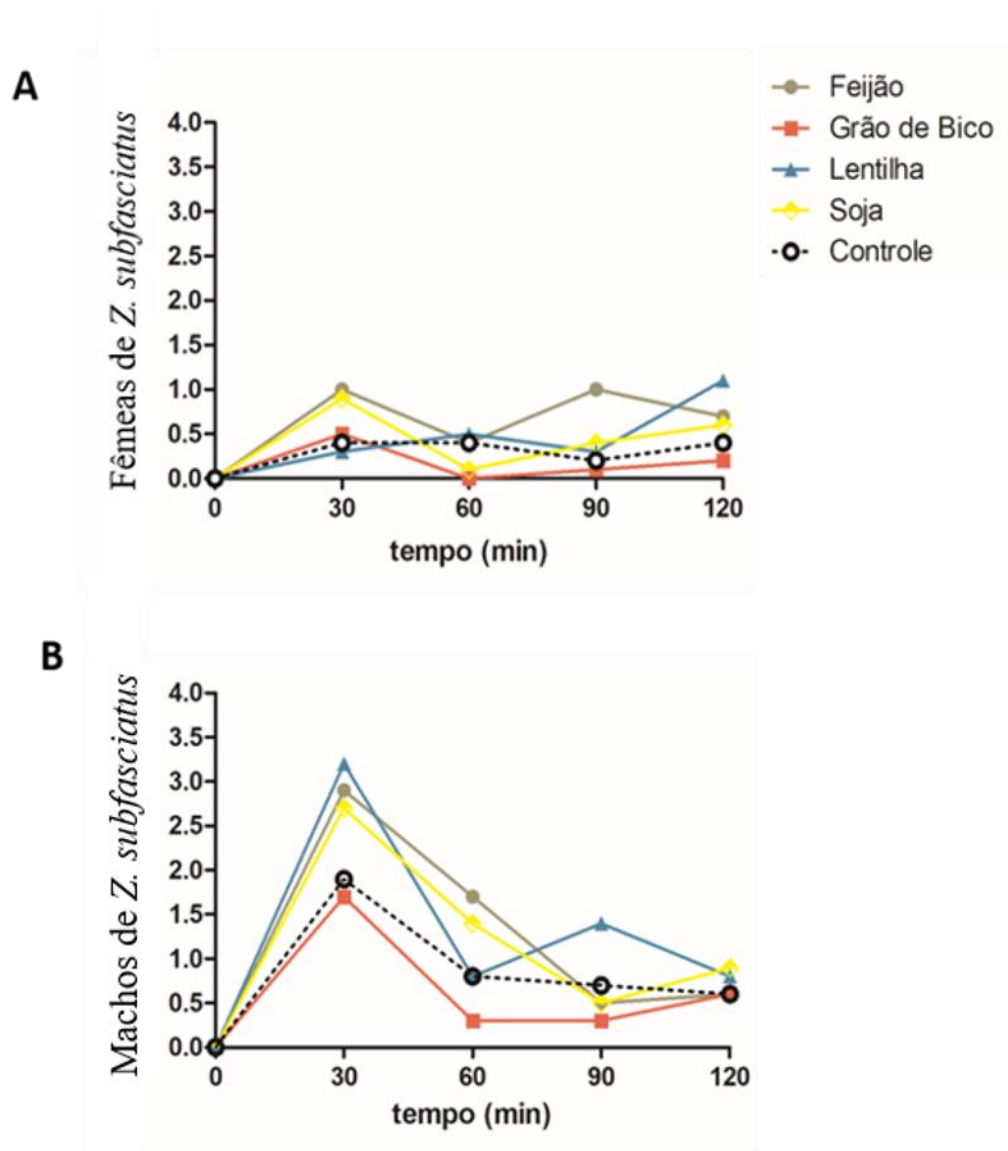
Foi possível comparar os padrões de escolha/tempo entre os grãos selecionados para o experimento. Os dados permitiram também investigar se as sementes escolhidas com maior prontidão pelos carunchos liberam compostos orgânicos com maior grau de volatilidade.

O feijão e a soja apresentam dispersão similar até 30 minutos de experimento. Após, o feijão se destaca como o mais escolhido. Já a lentilha é percebida de maneira mais significativa a partir de 90 minutos, e passa a ser tão escolhida quanto o feijão, por volta de 100 minutos de experimento. O grão de bico manteve níveis mais baixos quando comparado aos outros grãos, apresentando valores menores que o controle (FIGURA 9A).

No gráfico referente ao *timing* dos machos, figura 9B, ocorre um pico de escolhas logo nos primeiros 30 minutos, para todos os grãos, seguido por uma queda. Em seguida, um pico menor de escolhas, em 90 minutos de experimento, apenas para a lentilha. O grão de bico foi novamente menos escolhido do que o controle, e a escolha pelo feijão apresentou um perfil similar ao da soja durante todo o tempo de análise desse teste.

De uma forma geral, os resultados indicam que (1) as fêmeas apresentam preferência por feijão e soja, evitando o grão de bico (2) os machos não apresentam preferências entre grãos, mas também evitam o grão de bico quando existem outras possibilidades de escolha disponíveis.

Figura 9 - Perfil do *timing* de escolha do hospedeiro por fêmeas e machos de *Z. subfasciatus*.



Fonte: Do Autor (2021).

Nota: (A) Fêmeas de *Z. subfasciatus* em contato com grãos “in natura”, (B) Machos de *Zabrotes subfasciatus* em contato com grãos “in natura”. O eixo y representa a média referente ao número de carunchos que fez uma escolha, a cada 30 minutos de experimento. O restante dos animais permaneceu na placa central.

5.3 Hierarquia de preferência por hospedeiros de *Z. subfasciatus*: testes múltiplos pareados

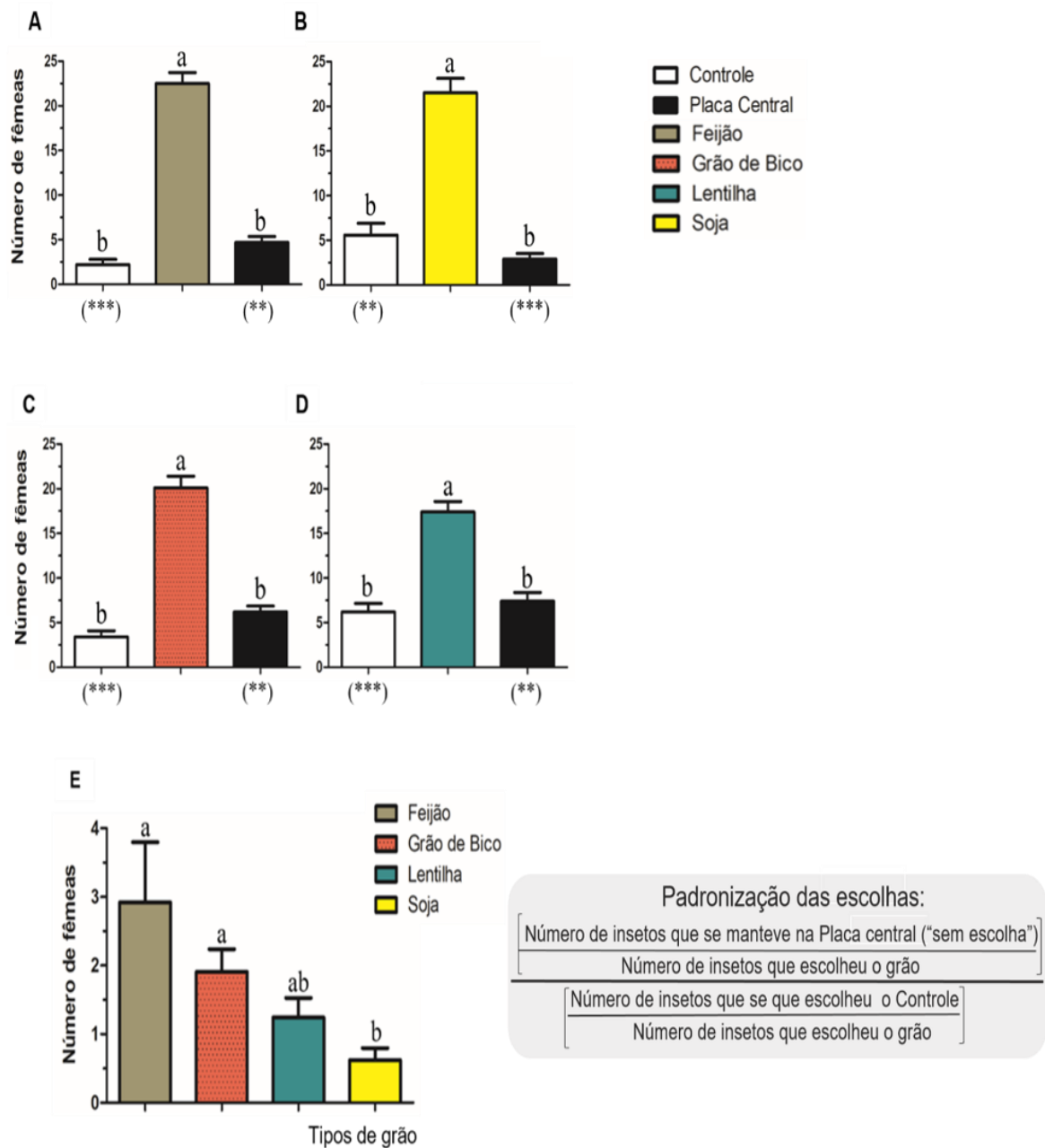
Os ensaios que avaliaram a preferência por determinado grão, em testes múltiplos simultâneos, mostraram resultados interessantes e também pertinentes à hipótese testada, tanto para fêmeas quanto para machos do *Z. subfasciatus*. Entretanto, foi pensado que submeter os carunchos a situações com várias possibilidades simultâneas de escolha poderia confundi-los, ainda que no ambiente natural eles se deparem concomitantemente com diversas fragrâncias ambientais (ou mesmo liberadas por outros insetos). Assim, foram realizados ensaios adicionais em arenas para testes múltiplos pareados (teste de grãos aos pares), como forma de amenizar essa mistura de cheiros.

Nos testes com chance de escolha (grãos *vs* controle), tanto fêmeas quanto machos escolheram significativamente os grãos. Isso ocorreu em todos os tipos de sementes testadas, com $p < 0.0001$ (***) para fêmeas (FIGURAS 10A, 10B, 10C e 10D) e $p = 0,0002$ (***) para machos (FIGURAS 12A e 12B).

A FIGURA 10E representa o panorama geral de escolhas entre os grãos testados. Foi plotada com o objetivo de comparar os resultados isolados de cada grão em meio as situações grãos *vs* controle ($p = 0,0039$). De acordo com esses cálculos o feijão e o grão de bico foram escolhidos em proporções maiores do que a soja, enquanto a lentilha teve escolha similar a de todos os grãos.

Seguidamente, foram realizados testes do tipo grão *vs* grão. Os testes com as fêmeas resultaram na seguinte hierarquia de preferência: feijão = soja > grão de bico > lentilha (FIGURAS 11A – $p > 0,05$ ns / 11B - $p < 0,05^*$ / 11C - $p < 0,05^{**}$ / 11D - $p < 0,05^*$ / 11E - $p < 0,05^{***}$ / 11F - $p < 0,05^{**}$).

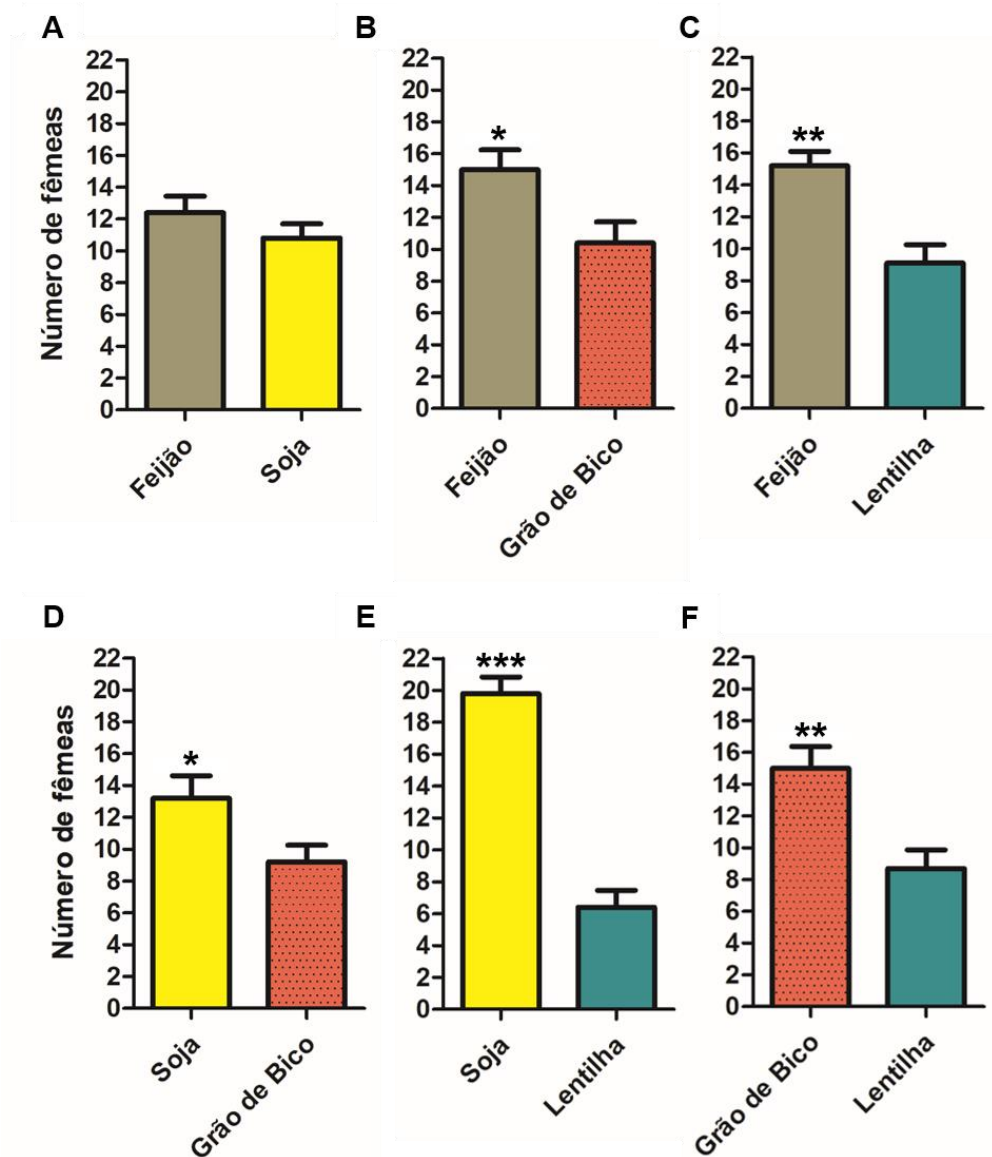
Os testes com machos resultaram em ausência de preferência entre feijão e grão de bico, com $p = 0,1804$ (ns) (FIGURA 12C).

Figura 10 - Atividade de escolha do hospedeiro pelo *Z. subfasciatus*: Ordem de concorrência – Fêmeas.

Fonte: Do Autor (2021).

Nota: (A - D) Condição controle vs grão (feijão, grão de bico, lentilha ou soja), por 120 minutos. (E) Representação geral do perfil de escolha entre os diferentes tipos de grãos – gráfico plotado com base nos valores encontrados para a escolha referente a cada tipo de semente de forma a padronizar os resultados para possibilitar a comparação. Os gráficos mostram a média do número de *Zabrotes subfasciatus* que entrou em contato com cada grão, o restante dos carunchos permaneceu na placa central. Barras representam a média \pm e.p.m. de 10 experimentos independentes. Letras iguais indicam que não há diferença significativa. ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis seguido de Dunn – comparação entre todos os pares). Maiores detalhes sobre valores estatísticos podem ser encontrados no apêndice – Tabela 2.

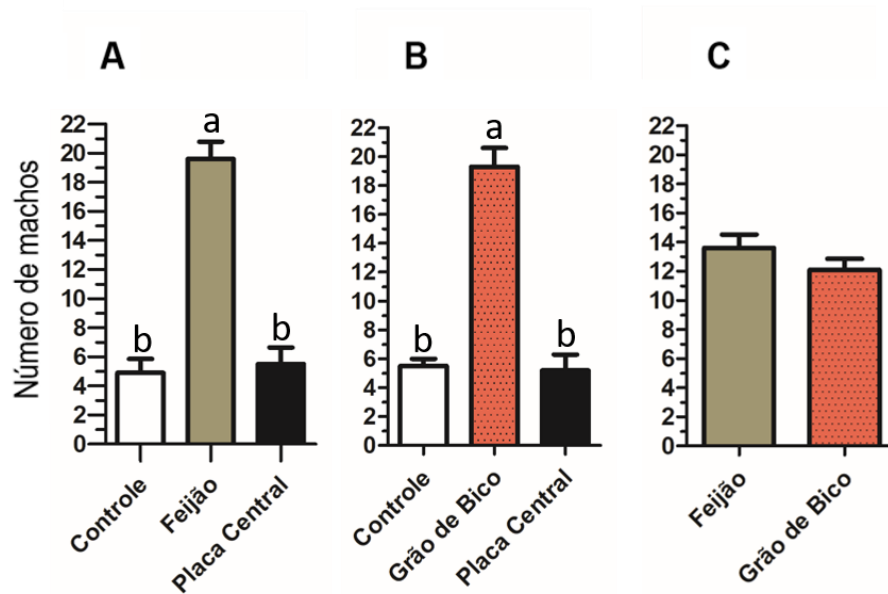
Figura 11 - Atividade de escolha do hospedeiro pelo *Z. subfasciatus*: Ordem de concorrência – Fêmeas.



Fonte: Do Autor (2021).

Nota: (A) Feijão vs Soja, (B) Feijão vs Grão de bico, (C) Feijão vs Lentilha, (D) Soja vs Grão de bico, (E) Soja vs Lentilha e (F) Grão de bico vs Lentilha. A contagem dos *Z. subfasciatus* foi realizada apenas ao final do experimento. Os gráficos mostram a média do número de *Zabrotes subfasciatus* que entrou em contato com cada grão, o restante dos carunchos permaneceu na placa central. Barras representam a média \pm e.p.m. de 10 experimentos independentes. $p < 0.05$, cálculos realizados através de teste de Mann-Whitney (comparação par a par). Maiores detalhes sobre valores estatísticos podem ser encontrados no apêndice – Tabela 2.

Figura 12 - Escolha do hospedeiro por machos de *Z. subfasciatus*.



Fonte: Do Autor (2021).

Nota: (A) Machos inseridos em arena com chance de escolha entre o grupo controle e sementes de feijão, (B) Machos inseridos em arena com chance de escolha entre o grupo controle e sementes de grão de bico e (C) machos inseridos em arena com chance de escolha entre grãos (Feijão vs Grão de bico). Os gráficos mostram apenas a média do número de *Zabrotes subfasciatus* que entrou em contato com cada grão, o restante dos carunchos permaneceu na placa central. Barras representam a média \pm e.p.m. de 10 experimentos independentes. Letras iguais indicam que não há diferença significativa. ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis seguido de Dunn – comparação entre todos os pares) para os gráficos A e B. $p < 0.05$ quando comparado com o grupo controle, teste de Mann-Whitney (comparação par a par) para o gráfico C. Maiores detalhes sobre o teste estatístico podem ser encontrados no Tabela 3.

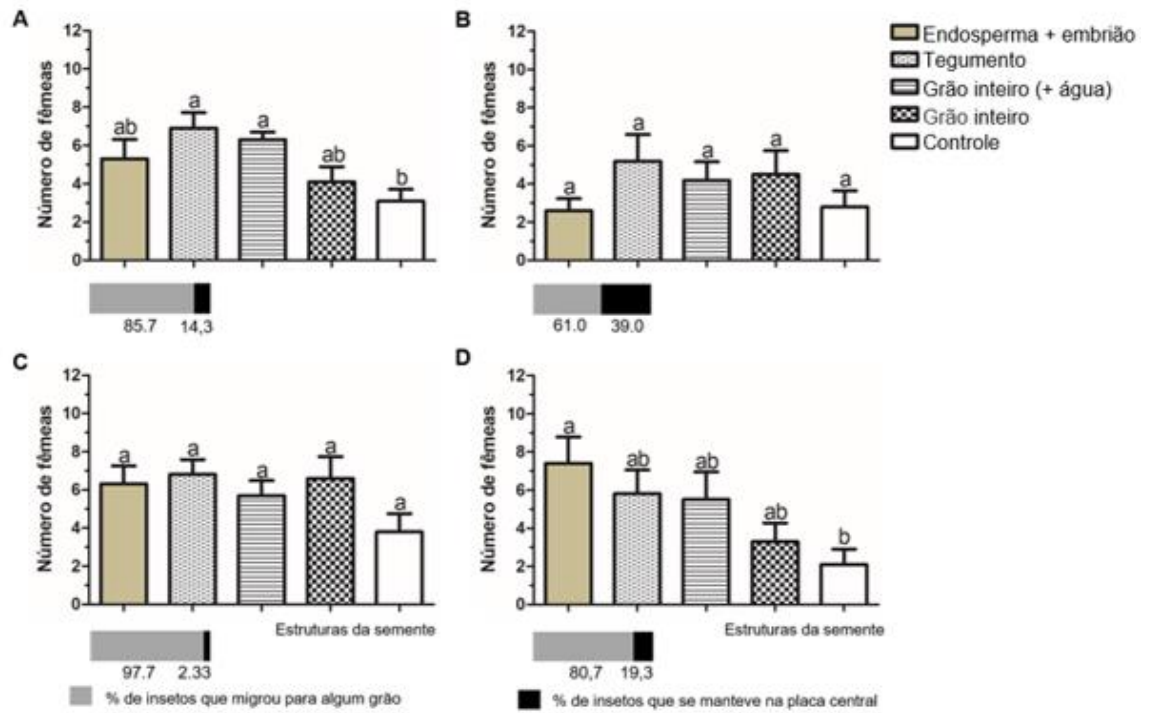
5.4 Hierarquia de preferência por partes das sementes hospedeiras de *Z. subfasciatus*

Após realizar testes em arena, confirmando que ocorre uma preferência pelo feijão como hospedeiro, foi necessário determinar se existe uma região do grão que apresenta maior potencial para atrair os carunchos. O propósito era investigar diferentes regiões da semente objetivando encontrar o local responsável pela produção ou liberação dos compostos envolvidos. Para cada ensaio realizado foram selecionadas 30 fêmeas de *Z. subfasciatus*. Elas foram inseridas em uma arena de testes múltiplos simultâneos e testadas quanto a preferência por diferentes partes da semente (sementes de feijão, grão de bico, lentilha e soja). A figura 13A mostra o resultado dos testes com feijão. É possível observar diferença estatística apenas para tegumento e grão inteiro quando comparados a situação controle, $p=0,0071(**)$.

Para o grão de bico (FIGURA 13B) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grãos, nem quando os mesmos foram comparados ao controle, com $p=0,4421$ (ns). Em testes com a lentilha também não houve diferenças estatísticas, $p=0,1751$ (ns) (FIGURA 13C). Testes com a soja (FIGURA 13D) denotam diferença estatística apenas entre a polpa e o controle e $p= 0,0313$ (*).

Adicionalmente, podemos observar que a maior parte dos carunchos optou para alguma escolha, em todos os grãos testados. A única exceção foi o grão de bico, que teve uma alta taxa de insetos preferindo continuar na placa central, ou seja, sem fazer qualquer escolha.

Figura 13 - Análise da atratividade por diferentes partes do grão.



Fonte: Do Autor (2021).

Nota: (A) Feijão, (B) Grão de bico, (C) Lentilha e (D) Soja. Os gráficos mostram apenas a média do número de *Zabrotes subfasciatus* que entrou em contato com cada grão (ou partes específicas dos grãos), o restante dos carunchos permaneceu na placa central. Durante este tempo, a interação entre as fêmeas e os grãos foi observada e registrada. Barras verticais representam a média \pm e.p.m. de 10 experimentos independentes. Letras iguais indicam que não há diferença significativa. ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis seguido de Dunn). Maiores detalhes sobre valores estatísticos podem ser encontrados no apêndice – Tabela 4.

5.5 Perfil do *timing* de escolha por partes de sementes hospedeiras de *Z. subfasciatus*

No decorrer dos 120 minutos de experimento, testando as partes específicas dos grãos em arenas múltiplas simultâneas, foram também registrados cada um dos momentos em que um *Z. subfasciatus* escolhia um dos grãos. Esses tempos foram plotados e possibilitaram averiguar se a preferência por determinado grão apresentava diferenças entre as partes que o compõem: tegumento e endosperma + embrião, ou se os insetos parecem preferir o grão inteiro, estando o grão umidificado ou in natura (FIGURA 14).

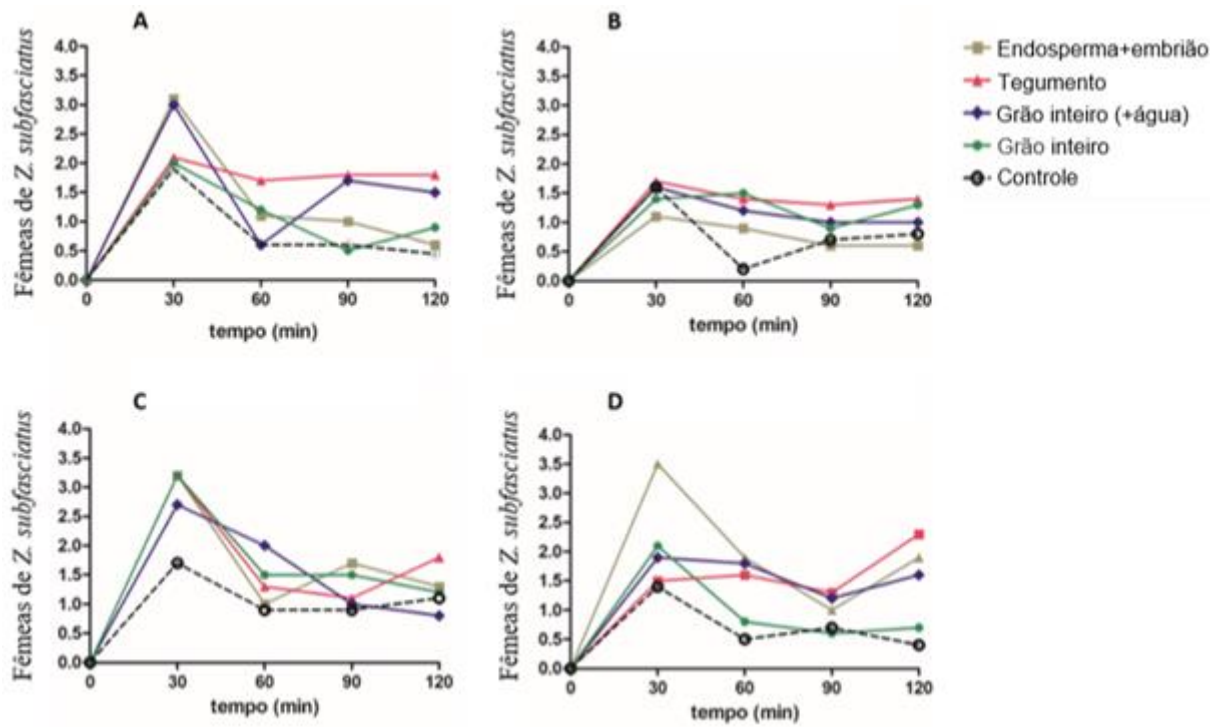
No caso do feijão, endosperma + embrião e grão inteiro úmidificado se destacam logo nos primeiros 30 minutos de experimento. A partir de 60 minutos, o maior destaque é para a casca, juntamente com o grão inteiro. Grão inteiro in natura e controle foram as variáveis mais evitadas (FIGURA 14A).

O perfil de escolha associado às diferentes partes da semente de grão de bico mostra claramente que não ocorre preferência entre as partes do grão, e que o controle foi a variável mais evitada (FIGURA 14B).

No caso da lentilha ocorre um pico de escolhas nos primeiros trinta minutos de experimento, com o controle sendo a única variável que se encontra em baixa nesse período. Não ocorrem diferenças consistentes entre as variáveis da semente que foram testadas (FIGURA 14C).

Nos testes realizados com a soja, a escolha pelo endosperma + embrião se destaca nos primeiros 60 minutos de experimento, mas ao final dos 120 minutos as diferenças já não são tão discrepantes. O controle e o grão inteiro in natura foram as variáveis mais evitadas (FIGURA 14D).

Figura 14 - Perfil do *timing* de escolha apresentado pelas fêmeas de *Z. subfasciatus* quanto à atração por partes específicas do hospedeiro.



Fonte: Do Autor (2021).

Nota: (A) Feijão, (B) Grão de bico, (C) Lentilha e (D) soja. No decorrer do experimento (120 minutos), foram registrados os momentos exatos em que cada *Zabrotes subfasciatus* entrou em contato com o grão ou com parte específica do grão. O eixo y representa a média do número de fêmeas que entrou em contato com a semente a cada 30 minutos de experimento. Os gráficos fazem referência apenas à média do número de insetos que entrou em contato com cada grão, o restante dos carunchos permaneceu na placa central.

5.6 Compostos voláteis presentes em sementes hospedeiras

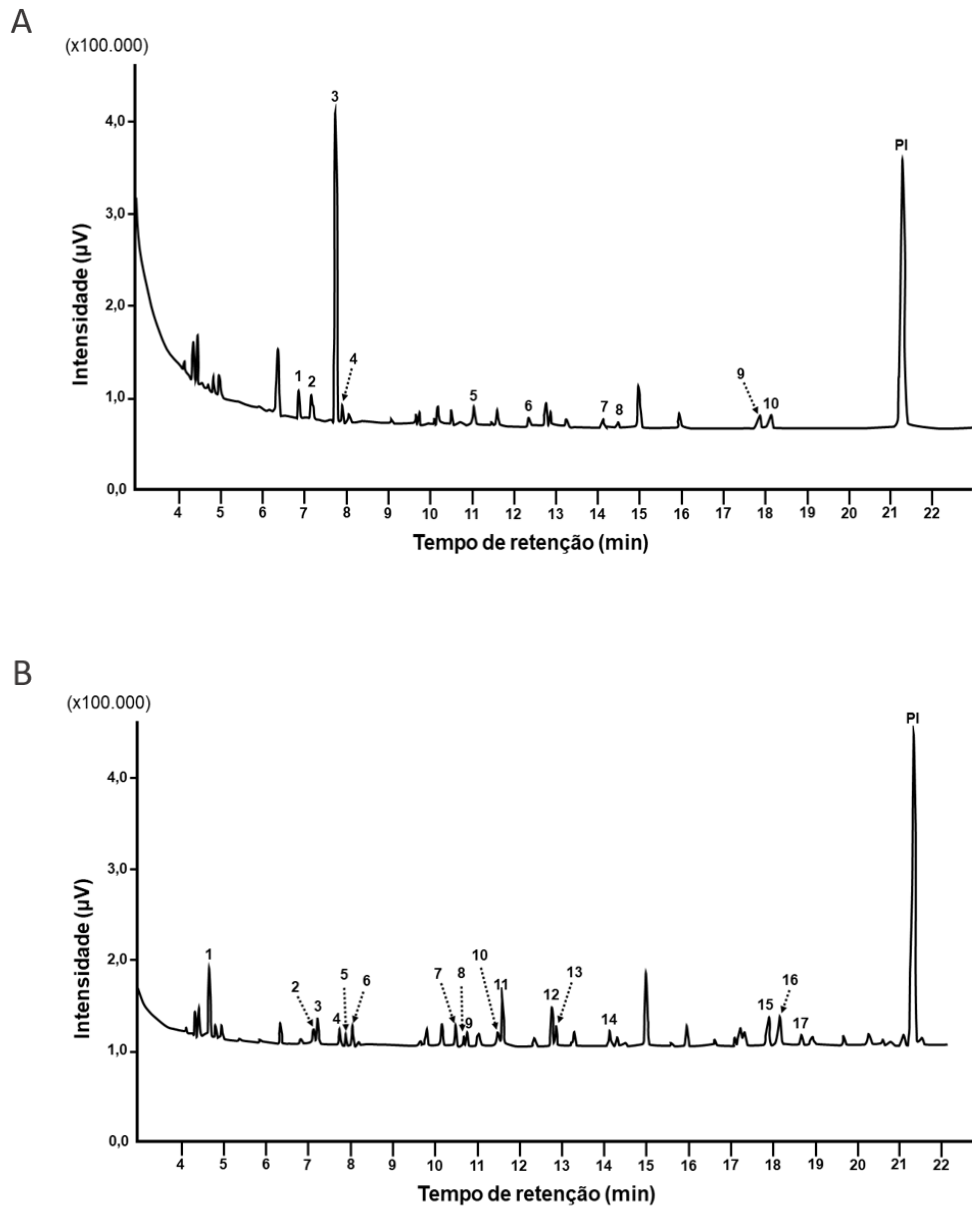
Sabendo que os *Z. subfasciatus* apresentam preferência por determinados hospedeiros, e considerando que os dados obtidos indicam o envolvimento da liberação de voláteis nessa atração, foi decidido que seria importante determinar o perfil de voláteis das sementes.

Compostos voláteis foram obtidos através de aerações em sementes de feijão e de grão de bico. Por razões de logística não foi possível obter informações sobre as outras sementes. As sementes passaram por processos de análise através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Essas análises permitiram obter o perfil de voláteis das sementes encontradas nos extremos da hierarquia de preferência para oviposição (FIGURA 15). A partir das análises foi possível identificar 10 compostos nas sementes de feijão e 17 compostos nas sementes de grão de bico. O destaque foi dado ao estireno, composto encontrado em maior concentração nas sementes de feijão comum.

Todos os compostos encontrados no feijão foram também encontrados nas sementes de grão de bico, embora em quantidades distintas. São eles: Etilbenzeno, 1,3-Dimetilbenzeno, Etenilbenzeno (Estireno), 1,2-Dimetilbenzeno, 1-Metilpentil hidroperóxido, 1-Ciclobutiletanol, 2-Etil-1-hexano, D-limoneno, Benzenoetamina e Decanal. Já as sete substâncias encontradas apenas no grão de bico foram: Hexanal, 1-Hexanol, 3-Metil-1-octeno, 2-Pentilfurano, Octanal, 1-Octanol e Dodecano.

As tabelas nos quadros 2 e 3 mostram os valores referentes ao Índice de Kovats e a porcentagem de similaridade com a biblioteca NIST11 para cada um dos compostos encontrados nas sementes estudadas.

Figura 15 - Cromatogramas das amostras de feijão (A) e grão de bico (B).



Fonte: Do autor (2021).

Legenda: **(A) Feijão.** (1) Etilbenzeno; (2) 1,3-Dimetilbenzeno; (3) Etenilbenzeno (estireno); (4) 1,2-Dimetilbenzeno; (5) 1-metilpentil hidroperóxido; (6) 1-Ciclobutiletanol; (7) 2-Etil-1-hexanol; (8) D-Limoneno; (9) Benzenoetamina; (10) Decanal; (PI) Acetato de nonila. **(B) Grão de bico.** (1) Hexanal; (2) Etilbenzeno; (3) 1,3-Dimetilbenzeno; (4) 1-hexanol; (5) Etenilbenzeno (estireno); (6) 1,2-Dimetilbenzeno; (7) 1-Metilpentil hidroperóxido; (8) 1-Ciclobutiletanol; (9) 3-Metil-1-octeno; (10) 2-Pentilfurano; (11) Octanal; (12) 2-Etil-1-hexanol; (13) D-limoneno; (14) 1-Octanol; (15) Benzenoetamina; (16) Decanal; (17) Dodecano; (PI) Acetato de nonila. Dados representam a média \pm e.p.m. de 4 experimentos independentes. Tabelas com valores de referência podem ser encontradas no apêndice - QUADROS 2 e 3, respectivamente.

Quadro 2 - Compostos voláteis produzidos por sementes de feijão-comum, *Phaseolus vulgaris*.

Número do composto ¹	Composto	IK ² na coluna Rtx-1	Similaridade Espectral com a biblioteca NIST11 (%)
1	Etilbenzeno	815	97
2	1,3-Dimetilbenzeno	830	96
3	Etenilbenzeno (=estireno)	861	97
4	1,2-Dimetilbenzeno	869	94
5	1-Metilpentil hidróxiperóxido	954	90
6	1-Ciclobutilhetanol	961	84
7	2-Etil-1-hexanol	1019	90
8	D-Limoneno	1022	81
9	Benzenoetamina	1159	79
10	Decanal	1170	95

Fonte: Do Autor.

Nota: ¹ Número do pico do composto no cromatograma. ² Índice de retenção de Kovats.

Quadro 3 - Compostos voláteis produzidos por sementes de grão de bico, *Cicer arietinum*.

Número do composto ¹	Composto	IK ² na coluna Rtx-1	Similaridade Espectral com a biblioteca NIST11 (%)
1	Hexanal	780	93
2	Etilbenzeno	815	76
3	1,3-Dimetilbenzeno	830	78
4	1-Hexanol	841	91
5	Etenilbenzeno (=estireno)	861	84
6	1,2-Dimetilbenzeno	869	74
7	1-Metilpentil hidróxiperóxido	954	90
8	1-Ciclobutilhetanol	961	79
9	3-Metil-1-octeno	964	86
10	2-Pentilfurano	983	87
11	Octanal	986	96
12	2-Etil-1-hexanol	1019	93
13	D-Limoneno	1022	87
14	1-Octanol	1061	90
15	Benzenoetamina	1159	79
16	Decanal	1170	93
17	Dodecano	1187	87

Fonte: Do Autor.

Nota: ¹ Número do pico do composto no cromatograma. ² Índice de retenção de Kovats.

5.7 Análise da importância das antenas do *Z. subfasciatus* no processo de busca e reconhecimento do hospedeiro: comparação de resposta à escolha do grão por machos e fêmeas.

Com o intuito de investigar a participação das antenas dos *Z. subfasciatus* durante o processo de procura e reconhecimento do hospedeiro, os caruchos tiveram suas antenas retiradas (antennectomia) e foram colocados em arenas comportamentais. Os testes foram do tipo com chance de escolha em arenas múltiplas pareadas (4; 50%). Nessas arenas os animais tinham duas opções de escolha, bem como foram testados em duas situações: “Feijão vs Controle” (FIGURAS 16A, 16B, 16C e 16D = fêmeas e 16I, 16J, 16K e 16L = machos) e “Feijão vs Grão de bico” (FIGURAS 16E, 16F, 16G, e 16H = fêmeas e 16M, 16N, 16O e 16P = machos).

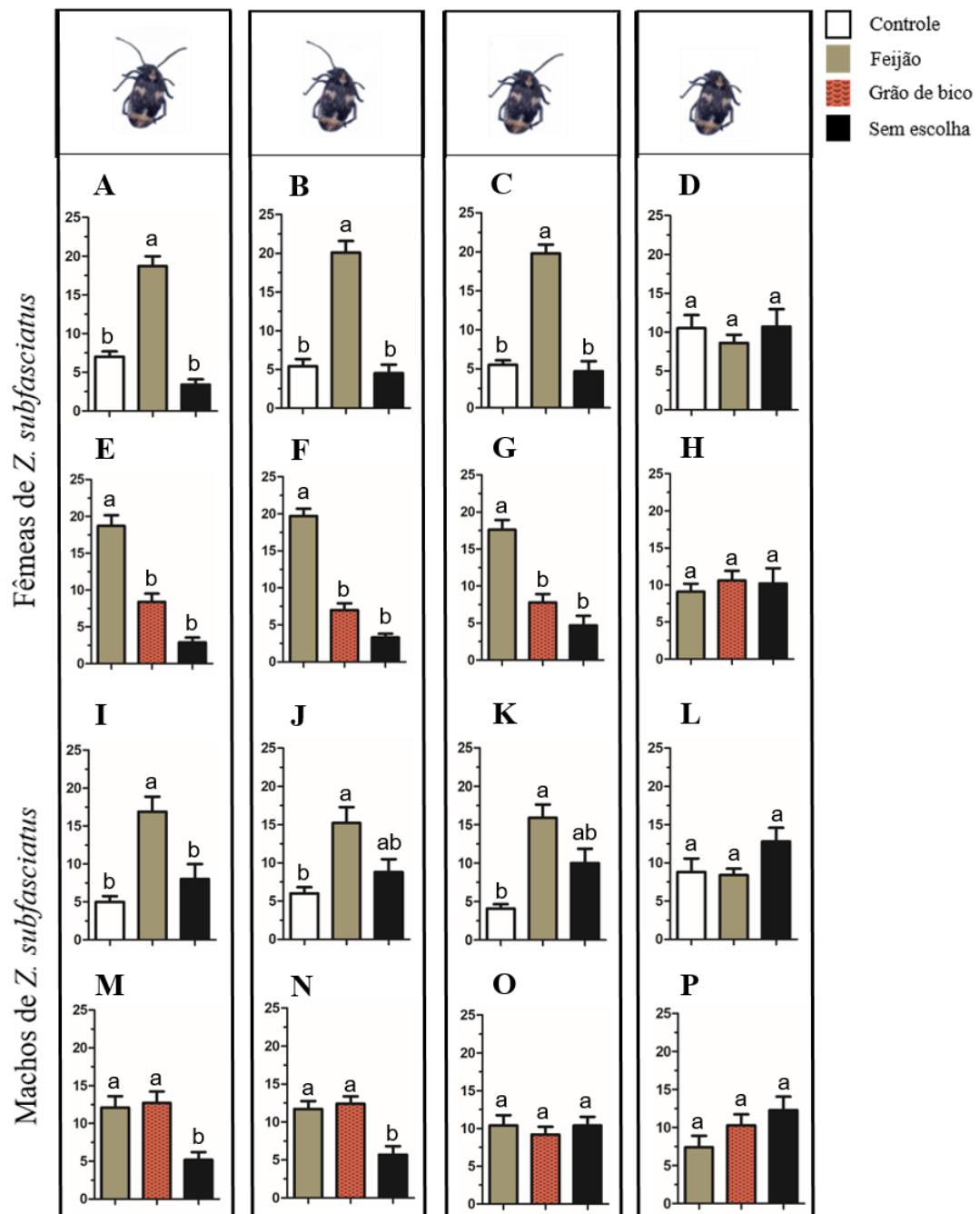
A importância das antenas no processo em questão foi testada de quatro diferentes maneiras: insetos com as duas antenas (situação controle) (FIGURAS 16A, 16E, 16I e 16M), sem a antena direita (FIGURAS 16B, 16F, 16J e 16N), sem a antena esquerda (FIGURAS 16C, 16G, 16K e 16O) e sem as duas antenas (FIGURAS 16D, 16H, 16L e 16P).

Em situações controle vs grão, tanto fêmeas quanto machos apresentam preferência por locais onde podem encontrar os grãos, mas isso ocorre apenas quando possuem as duas antenas ou pelo menos uma delas (direita ou esquerda) (FIGURAS 16A, 16B e 16C = fêmeas e 16I, 16J e 16K = machos). Na ausência das duas antenas eles parecem perder essa habilidade (FIGURAS 16D = fêmeas e 16L = machos).

Já em situação de escolha entre grãos, sendo o feijão e o grão de bico, as fêmeas que possuem as duas antenas, ou pelo menos uma delas, continuam optando pelo feijão (FIGURAS 16E, 16F e 16G), enquanto os machos não apresentam escolha entre os diferentes grãos (FIGURAS 16M, 16N e 16O). Já na ausência das duas antenas é nítido que as fêmeas deixam de exibir uma preferência entre as sementes (FIGURA 16H).

Em machos existe a possibilidade de ocorrência de lateralidade funcional, considerando que demonstram maior sensibilidade aos grãos na presença da antena esquerda do que quando possuem apenas a antena direita (FIGURAS 16N e 16O, respectivamente).

Figura 16 - Análise do envolvimento das antenas no processo de reconhecimento e escolha do hospedeiro.



Fonte: Do Autor (2021).

Nota: (A e E) fêmeas com as duas antenas – grupo controle, (B e F) fêmeas sem a antena direita, (C e G) fêmeas sem a antena esquerda, (D e H) fêmeas sem as duas antenas, (I e M) machos com as duas antenas – grupo controle, (J e N) machos sem a antena direita, (K e O) machos sem a antena esquerda e (L e P) machos com as duas antenas; (A-D / I-L) controle vs feijão e (E-H / M-P) controle vs grão de bico. Placa Central representa o número de *Zabrotes subfasciatus* que não fez escolha. Barras representam a média \pm e.p.m. de 10 experimentos independentes. Diferentes letras indicam diferença estatística em análises feitas por teste de Mann-Whitney (comparação par a par). Os valores de -p para cada dupla podem ser encontrados no apêndice – Tabelas 8 e 9.

5.8 Morfologia externa de antenas de *Z. subfasciatus*

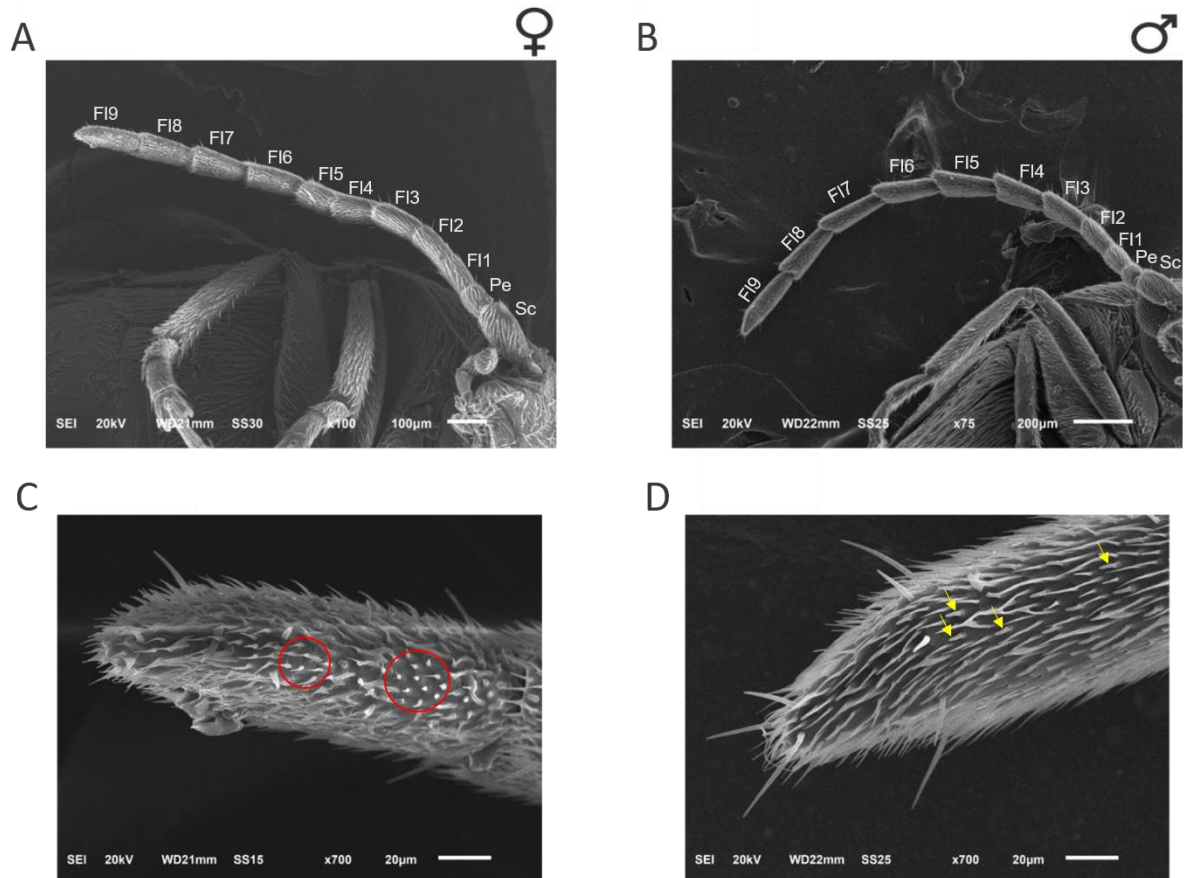
Considerando que este trabalho visa um maior entendimento da fisiologia do *Z. subfasciatus* no processo de reconhecimento e escolha do seu hospedeiro, foram realizadas análises por microscopia eletrônica de varredura do corpo do animal. O objetivo era aprofundar o conhecimento acerca das antenas dos *Z. subfasciatus*.

Nas figuras 17 A e 17 B é possível observar antenas do tipo serreadas e constituídas por 11 segmentos, que apresentam diversas sensilas em toda a sua extensão, tanto em machos quanto em fêmeas.

As antenas das fêmeas são amplamente preenchidas com sensilas basicônicas (FIGURA 17 C), enquanto em machos, as sensilas tricóideas são mais numerosas (FIGURA 17 D).

A partir da figura 18 pode-se afirmar que as antenas de machos de *Z. subfasciatus* são significativamente maiores do que as antenas de fêmeas da espécie.

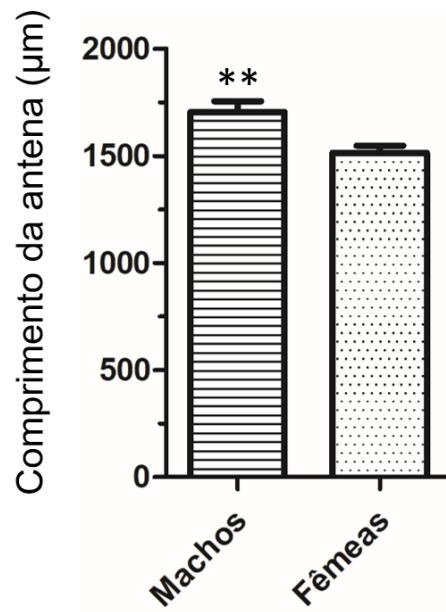
Figura 17. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das antenas de fêmeas e machos do *Z. subfasciatus*.



Fonte: Do Autor (2021).

Nota: Morfologia da antena de *Zabrotes subfasciatus*. Sc: escapo, Pe: pedicelo e Fl: flagelômero. (A e C) antena da fêmea; (B e D) antena do macho. (C) Os círculos vermelhos apontam para sensílas basicônicas; e (D) setas amarelas apontam para sensílas tricóideas. Barras de escala: (A) 100 μm, (B) 200 μm, (C) 20 μm e (D) 20 μm. Imagens obtidas com o microscópio ZEISS EVO50.

Figura 18 - Dimorfismo sexual associado ao comprimento das antenas do *Z. subfasciatus*.



Fonte: Do Autor (2021).

Nota: Comparação entre medidas das antenas de fêmeas e machos de *Zabrotes subfasciatus*. Imagens observadas no ZEISS EVO50 e analisadas através do Image J. O gráfico mostra apenas a média dos valores encontrados para o comprimento das antenas de *Z. subfasciatus*. Barras representam a média \pm e.p.m. de 10 antenas de animais diferentes. ** indicam diferença significativa. Teste de Mann-Whitney, com $p=0,0052$.

6 DISCUSSÃO

6.1 As fêmeas do *Z. subfasciatus* (não os machos) usam o cheiro das sementes para escolher o hospedeiro

A escolha do hospedeiro determina o alimento que a larva utilizará para o seu crescimento e desenvolvimento. A mobilidade da larva é comumente restrita, portanto, é essencial que a fêmea escolha a planta hospedeira mais adequada para colocar seus ovos (AWMACK; LEATHER, 2002; SCHEIRS *et al.*, 2003; REES, 2004). Rees (2004) afirma que as espécies de bruchíneos são específicas na escolha do hospedeiro que atacam. Em contrapartida, Ajayi (2015) indica que certos insetos podem manter hospedeiros alternativos dentro do grupo das leguminosas, como é o caso do *C. maculatus*. De forma geral, muitos trabalhos mostram que essa escolha pode ocorrer com base em uma pré-adaptação a determinadas substâncias durante o desenvolvimento evolutivo da espécie ou a um contato prévio com as substâncias de interesse (DETHIER, 1941; JERMY, 1976, 1984; FEENY, 1995; GOINGUENE; STÄDLER, 2005).

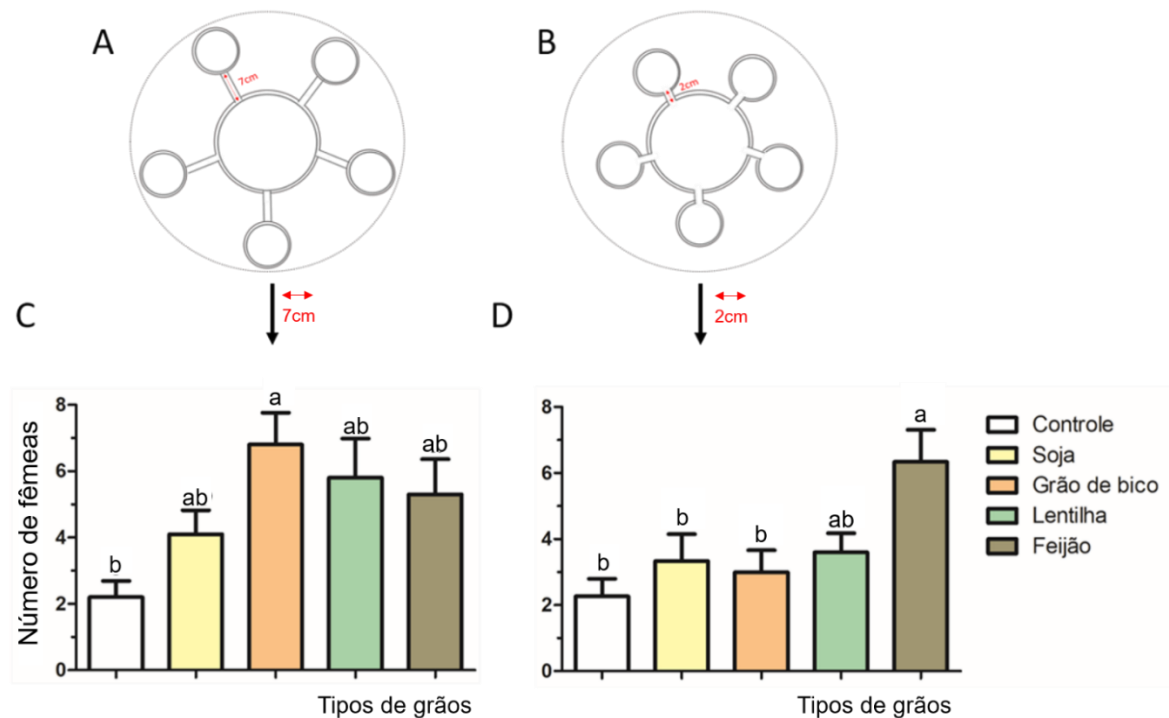
Nesse trabalho, inicialmente, foram realizados testes em arenas de escolha (múltiplos simultâneos) para investigar se os *Z. subfasciatus* exibem preferência por alguma das leguminosas mais escolhidas pelos bruquíneos. Nos testes havia 5 opções de escolha: controle (sem grãos), feijão, grão de bico, lentilha e soja. As fêmeas mostraram preferência pelo feijão com relação ao grão de bico ($p=0,0158$). Os machos não apresentaram preferência entre as sementes testadas, nem mesmo as diferenciaram da situação controle ($p=0,1109$).

Para diminuir o número de variáveis testadas simultaneamente e assim obter dados que possam revelar a existência de uma eventual hierarquia de escolha, foram realizados experimentos adicionais. Os ensaios foram realizados de maneira mais específica, ou seja, 2 a 2, em testes do tipo múltiplos pareados. Esta estratégia permitiu diminuir os ruídos das 5 variáveis simultâneas na arena. A situação controle foi a menos escolhida em confrontos do tipo controle *vs* grão. Sendo assim, é possível afirmar que os insetos conseguem perceber onde encontrar as sementes. Já em confrontos do tipo grão *vs* grão, as fêmeas do *Z. subfasciatus* tiveram o feijão e a soja como os grãos preferidos para a função de hospedeiro, e as escolhas resultaram na seguinte hierarquia de preferência: feijão = soja > grão de bico > lentilha (FIGURAS 11A – $p>0.05$ ns; 11B - $p<0.05^*$; 11C - $p<0.05^{**}$; 11D - $p<0.05^*$; 11E - $p<0.05^{***}$

e 11F - $p < 0.05^{**}$). Essa hierarquia encontrada se assemelha aos resultados obtidos por Teixeira e Zucoloto (2008), em testes de preferência para oviposição, a qual apresentou: feijão > soja > lentilha \geq grão de bico (TEIXEIRA; ZUCOLOTO, 2008). Tratando-se dos machos da espécie, a ausência de preferência de escolha entre os grãos testados se mantém: feijão = grão de bico, com $p = 0.1804$ (ns) (FIGURA 12C). Infelizmente, no momento ainda não é possível garantir a ausência de preferência também para a lentilha e a soja, já que os testes com machos foram realizados apenas entre o hospedeiro usual e o grão mais evitado, visando confrontar os extremos.

Experimentos, realizados em arenas para testes múltiplos simultâneos (SOUZA *et al.*, comunicação pessoal), reforçam a ideia de que existe alguma substância volátil sendo liberada pelo hospedeiro e percebida pelo inseto como algo atraente. Nesses experimentos foi demonstrado que a escolha entre os grãos se torna mais específica ao diminuir o comprimento dos tubos de ligação entre as placas (FIGURA 19). Quanto maior é a distância até o grão, maior é a dificuldade do animal em perceber e diferenciar odores liberados pelas sementes. Assim, fica claro que a escolha do hospedeiro deve ocorrer com base em compostos voláteis atrativos para o inseto.

Figura 19 - Testes comportamentais em arenas com tubos de ligação de diferentes tamanhos.



Fonte: Do Autor (2021).

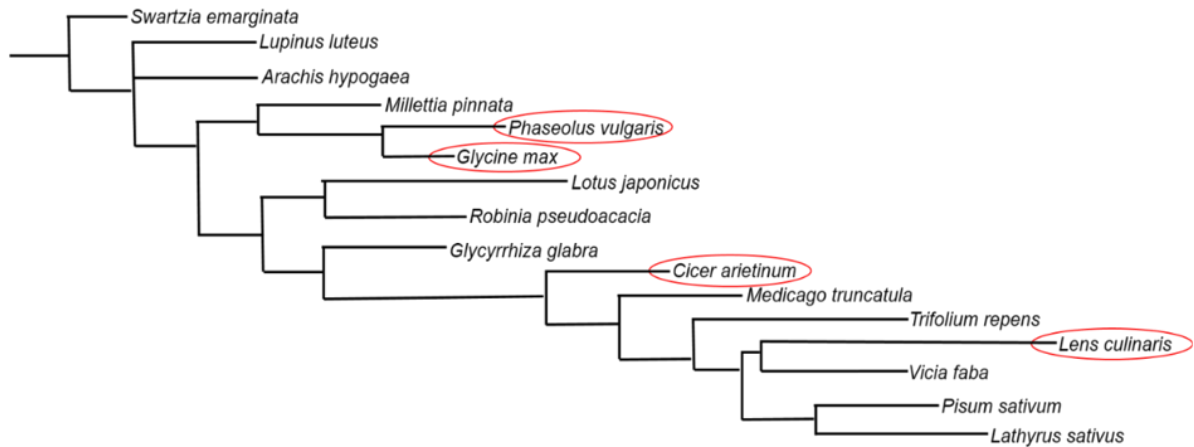
Nota: Esquema representativo da arena de escolha com tubos de conexão (A) medindo 7cm e arena de escolha com tubos de conexão (B) medindo 2cm. (C) Gráfico resultante do teste de escolha de grãos por fêmeas de *Zabrotes subfasciatus* em arenas com tubos de 7cm e (D) gráfico resultante do teste de escolha de grãos por fêmeas de *Z. subfasciatus* em arenas com tubos de 2cm. Os gráficos representam a média do número de fêmeas que fez escolha por determinado grão. Para os experimentos em tubos de 7cm foram realizados 10 experimentos independentes e para os experimentos em tubos de 2cm foram realizados 15 experimentos independentes, dados utilizados para a plotagem dos gráficos em questão. Diferenças foram consideradas para $p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis, seguido por Dunns. Dados adaptados de resultados obtidos por D. SOUZA, V. (IFSULDEMINAS - 2017). Maiores detalhes estatísticos no apêndice – Tabela 7.

A substância liberada pela semente com atividade de atração seria de maior interesse para funções exercidas pelas fêmeas como, por exemplo, o processo de oviposição (GOINGUENÉ; STÄDLER, 2006; YADAV; BORGES, 2017). Tal suspeita está de acordo com pesquisas desenvolvidas por Groot e seu grupo, em 1999, onde eles descrevem as antenas de fêmeas de *Lygocoris pabulinus* (Hemiptera) como órgãos mais sensíveis a voláteis de plantas, enquanto retratam as antenas de machos como órgãos com estruturas relativamente mais sensíveis a ésteres produzidos por alguns insetos. Embora isso possa variar entre diferentes espécies, o relato viabiliza a hipótese de que os compostos voláteis liberados pelos grãos são fundamentais para a escolha do hospedeiro e oviposição em fêmeas de *Z. subfasciatus* e a princípio indiferente para os machos.

De maneira interessante, foi possível associar as escolhas com o processo de dispersão do volátil através da arena. Os registros referentes ao momento que cada inseto fez uma escolha resultaram em gráficos de tempo vs número de escolhas. A duração do experimento foi dividida em 4 tempos específicos: 30, 60, 90 e 120 minutos (FIGURAS 9A, 9B, 9C e 9D). As fêmeas apresentaram 2 picos de escolha para o feijão, um em 30 minutos e outro em 60 minutos. Isso indica que a dispersão das substâncias presentes no feijão pode estar ocorrendo de maneira constante durante todo o experimento. Também houve um aumento progressivo na escolha pela lentilha a partir de 90 minutos, um indício de que substâncias presentes na lentilha são percebidas tardiamente, ou seja, apresentam dispersão mais lenta. No caso dos machos, as escolhas foram similares para todos os grãos e mais numerosas até a metade do experimento (60 minutos). Em 90 minutos, ocorreu um pequeno pico de escolha para a lentilha (FIGURAS 9A e 9B). O perfil apresentado pelos machos é característico de migração aleatória, com um pico de escolha para todas as variáveis logo nos primeiros 30 minutos de experimento. As fêmeas apresentam migração mais uniforme durante todo o teste.

Ao investigar a posição filogenética dos hospedeiros, pode-se perceber que *P. vulgaris* (feijão) e *G. max* (soja) são evolutivamente próximas. Classificadas como espécies irmãs (ou grupo irmão), pois pertencem a um grupo monofilético descendente de um ancestral comum exclusivo. Além disso, essas espécies encontram-se evolutivamente mais próximas da *C. arietinum* (grão de bico) do que da *L. culinaris* (lentilha) (FIGURA 20).

Figura 20 - Classificação filogenética dentro da família Leguminosae/subfamília Faboideae.



Fonte: LPWG. Phylogeny and classification of the Leguminosae. TAXON 66 (1). February 2017: 44-77, adaptada. Nota: Os círculos em vermelho apontam as espécies de leguminosa utilizadas como hospedeiras em experimentos realizados com o *Zabrotes subfasciatus* neste trabalho.

Aqui é importante considerar que as plantas de espécies com maior grau de parentesco têm uma composição química ao menos similar, permitindo eventos de coevolução inseto-planta (EHRlich; RAVEN, 1964; CORNELL; HAWKINS, 2003; KERGOAT *et al.*, 2005; FUTUYMA; AGRAWAL, 2009). A posição filogenética das espécies hospedeiras analisadas sugere a seguinte relação “hierárquica” dos hospedeiros de *Z. subfasciatus*: feijão = soja > grão de bico > lentilha. Esta “hierarquia” filogenética (proximidade evolutiva) resulta em uma sequência comparável à hierarquia de escolha encontrada nas arenas experimentais: feijão = soja > grão de bico > lentilha (FIGURA 11).

Em conjunto, estes resultados de análise comportamental apoiam a hipótese de que compostos voláteis emanados pelas sementes são os determinantes na escolha do hospedeiro por fêmeas de *Z. subfasciatus*.

6.2 Voláteis potencialmente envolvidos na escolha de hospedeiros por fêmeas de *Z. subfasciatus*

Após concluir que compostos emanados pelas sementes são os determinantes durante a escolha de hospedeiros pelas fêmeas, foi necessário identificar os voláteis que poderiam estar

envolvidos no processo. A presença desses compostos foi analisada em duas das sementes utilizadas durante o desenvolvimento desse trabalho: feijão e grão de bico (hospedeiro usual e hospedeiro não usual menos preferido pelo *Z. subfasciatus*, respectivamente) (TEIXEIRA *et al.*, 2008). Os resultados mostram que todas as substâncias encontradas nas sementes de feijão são também encontradas nas sementes de grão de bico, porém em diferentes quantidades. Já o grão de bico apresentou 7 substâncias que não são encontradas no feijão: hexanal, 1-hexanol, 3-metil-1-octeno, 2-pentilfurano, octanal, 1-octanol e dodecano (FIGURA 15).

O volátil presente em maiores quantidades no grão de feijão foi o etenilbenzeno, ou estireno (nome vulgar). O estireno é um produto químico conhecido principalmente pela ampla utilização na fabricação de plásticos, fibras de vidro, resinas, borracha sintética, agente aromatizante na indústria alimentícia para doces e sorvetes, e na fabricação de poliestireno, presente em embalagens de alimentos. Apesar de frequentemente ser considerado um composto contaminante dos grãos, o estireno foi caracterizado por Maarse (1992) como um constituinte natural de alimentos e bebidas. Em consonância, trabalhos publicados indicam que a formação de estireno pode ocorrer naturalmente durante o armazenamento de grãos (WASOWICZ; KANINSKI, 1988; WILKINS; SCHOLL, 1989), na fermentação de uvas, através da ação de bactérias em queijos, pela transformação de alguns precursores da molécula, ou mesmo durante a degradação de substâncias semelhantes a ele e que ocorrem naturalmente no ambiente.

Sob o mesmo ponto de vista, Steele *et al* (1994) pesquisaram a possibilidade da presença natural de estireno em alguns alimentos e encontraram que 8 dos 12 alimentos selecionados por eles continham a substância. Considerando que os autores garantem ter tomado todos os cuidados necessários para que tais alimentos não tivessem qualquer contato com fontes externas da substância, a possibilidade de contaminação devido a embalagens utilizadas foi descartada. Neste estudo, a canela, por exemplo, foi um dos alimentos que apresentou altos índices do composto. Os autores relacionaram esse resultado com o aldeído cinâmico presente no condimento, que é responsável pelo sabor e apresenta estrutura muito similar à do estireno.

Oomah e Liang (2007) realizaram análises em diferentes cultivares de feijão e também tiveram o estireno como o composto mais abundante. Apesar dos valores variarem bastante entre os cultivares não foi encontrada qualquer fonte de contaminação, indicando que a substância deve ter ocorrência natural em grãos de feijão. A confirmação ocorreu através da análise de amostras de feijão orgânico, as quais também resultaram em quantidades significativas do composto. Ademais, o estireno já foi encontrado anteriormente em produtos alimentares sem contaminação aparente (TNO, 1992).

Gouinguéné e Städler (2006) também analisaram grãos de feijão, e o fizeram por meio de experimentos com *Delia platura*. Eles encontraram alguns compostos voláteis aparentemente associados ao processo de escolha do local para oviposição. O estireno estava presente e foi um dos compostos assimilados pela mosca. Apesar de não ser associado à atração para oviposição, existe a possibilidade de que o estireno seja um dos compostos de interesse para a escolha do hospedeiro.

Outro composto encontrado nos grãos analisados foi o etilbenzeno. Este composto é descrito como um precursor do estireno e, portanto, pode ser que o estireno tenha sido produzido a partir dele. Se assim for, tal composto deve ser importante para processos metabólicos das plantas, e conseqüentemente formar o estireno como resultado de suas reações. Porém, isso é apenas uma suposição e serão necessárias análises mais aprofundadas antes de afirmações concretas. Ainda, etilbenzeno já foi encontrado em análises de sementes de *Pisum sativum* e de *Cytisus scoparius*, com suas concentrações relacionadas à idade da semente, embora haja indicações de que a presença da substância pode ser oriunda de contaminação, devido a impossibilidade de comprovar a hipótese da ocorrência natural no grão (COLVILLE *et al.*, 2012).

Mesmo que aparentemente estranha, a presença de compostos benzênicos em plantas já foi sugerida desde os trabalhos pioneiros de Derthier (1954). Entre os compostos químicos das plantas considerados mais relevantes para os insetos parecem estar as quinonas, os glicosídeos (incluindo substâncias cianogênicas e saponinas), flavonóides, alcalóides e óleos essenciais. Estes dois últimos grupos de compostos contribuem com a maioria dos odores e sabores das plantas. Os óleos essenciais incluem derivados do benzeno, compostos de cadeia linear e terpenos. Ainda, a disponibilização desses contribuintes pelas plantas varia com a hora do dia, as estações, o estágio de crescimento da planta, o tecido, as condições climáticas e as condições do solo (DERTHIER, 1954; EHRLICH; RAVEN, 1964)

O hexanal foi encontrado presente apenas nas sementes de grão de bico, embora seja um composto comumente encontrado em sementes de feijão e de soja (DEL ROSARIO *et al.*, 1984). Octanona e octanol também foram encontrados apenas em amostras de grão de bico. São descritos na literatura como odores de fungos. Podem ser produzidos por microrganismos que se relacionam com a semente, ou por fungos presentes em ambiente próximo da semente (GOUINGUENÉ, 2006). Assim, deve-se considerar a presença desses compostos em grãos armazenados bem como a possibilidade de afastarem carunchos, considerando que o grão de bico foi a semente mais evitada.

Embora seja interessante a ideia de estudar cada um dos compostos encontrados e desvendar as possíveis funções que eles realizariam nos grãos, faz-se também necessário descobrir as combinações e concentrações de interesse para o inseto. Compostos vegetais formados por diferentes constituintes desencadeiam diferentes respostas nos besouros (BRUCE, *et al.*, 2005; ZHANG, *et al.*, 1999). Na maioria das vezes eles são atraídos por uma mistura de compostos e a interação entre as substâncias da mistura ocasiona atração de forma mais intensa que cada composto individualmente (KESSLER; BALDWIN, 2001; HAMMACK, 2001; SIDERHURST; JANG, 2010; MCCOMIC *et al.*, 2012; BECK *et al.*, 2012; BRUCE; PICKETT, 2011). Além disso, concentrações ideais são de extrema importância, visto que valores muito altos ou muito baixos de uma substância atrativa podem causar efeito contrário, repelindo o inseto (D'ALESSANDRO *et al.*, 2009; BALHORN *et al.*, 2013).

Durante a busca pelo hospedeiro, o inseto demonstra maior interesse na mistura de compostos apresentada pelo seu “hospedeiro alvo” do que na própria estrutura química de cada uma das substâncias que o compõem. Estudos comportamentais realizados em olfatômetro com *Aphis fabae* demonstraram que odores isolados provocam resposta repelente nos insetos enquanto misturas de compostos provocam resposta atraente (WEBSTER *et al.*, 2010). A quantidade de cada composto presente nessa mistura também faz toda a diferença. Qualquer mudança nessas proporções pode alterar a preferência de escolha. Cha *et al.* (2011) demonstraram que a atração de fêmeas da traça da uva (*Paralobesia viteana*) pelo seu hospedeiro diminuía quando algum dos compostos voláteis sintéticos utilizados tinha sua concentração duplicada em meio a testes comportamentais realizados com o inseto, mesmo com a concentração das outras substâncias sendo mantida constante.

Em contrapartida, alguns compostos são conhecidos pela atratividade apresentada quando detectados de forma isolada. É o caso, por exemplo, do dipropildissulfeto - capaz de atrair moscas para a cebola, do isotiocianato - descrito como atraente em crucíferas e do 2-etil-hexanol - encontrado em leguminosas e considerado atraente para *C. maculatus* (DINDONIS; MILLER, 1981; VINCENT; STEWART, 1984; AJAYI, 2015).

É notório, assim, que os insetos respondem de maneiras diferentes quando os compostos se encontram isolados ou em meio a misturas (RIFFELL *et al.*, 2009; WEBSTER *et al.*, 2010). Todavia, essas informações ainda precisam ser investigadas com maiores detalhes, antes de qualquer suposição. Uma alternativa seria a realização de eletroantenografia, o que permitiria analisar a atração do *Z. subfasciatus* por cada um dos compostos de forma isolada e também a pelas misturas criadas. Outra alternativa seria a realização de análises comportamentais em arenas de escolha, testando a resposta dos carunchos aos diferentes compostos identificados nas

sementes e, ainda, a diferentes combinações e concentrações desses compostos. Estes últimos já estão sendo realizados em nosso Laboratório.

6.3 Morfologia e identificação de estruturas corporais envolvidas com a recepção de estímulos olfatórios

É extremamente importante que insetos fitófagos reconheçam compostos orgânicos voláteis liberados pela planta hospedeira e consigam encontrá-la. Para isso, eles apresentam um sistema sensorial complexo, com mecano, quimio, termo e higrorreceptores (SHIELDS, 2011). É através desse sistema que eles conseguem processar informações sobre a qualidade da planta, a presença de competidores ou inimigos naturais, e a possibilidade de encontrar parceiros para a reprodução (HERN; DORN, 1999; GINZEL; HANKS, 2005).

O reconhecimento do hospedeiro ideal é dependente de estruturas sensoriais encontradas em diferentes partes do corpo do animal. Normalmente são mais concentradas nas antenas, podendo ser encontradas em menor número nos palpos labiais e maxilares, nos tarsos e no ovipositor (GIANNAKAKIS; FLETCHER, 1985; BRUYNE; BAKER, 2008). Essas estruturas são conhecidas como sensilas. Elas são conectadas a neurônios sensoriais com função de reconhecimento de cheiro, gosto, temperatura, pressão, som, etc. Sua função é definida de acordo com a morfologia apresentada. A maioria dos receptores com função olfatória é encontrado nas antenas. Os palpos, as pernas e o ovipositor geralmente possuem receptores com função gustatória (ZACHARUK, 1985; SHIELDS, 2011).

Neste trabalho, foram realizados testes de comportamento com o intuito de investigar a participação das antenas no processo de busca e reconhecimento do hospedeiro ideal para *Z. subfasciatus*. O procedimento consistiu na retirada de uma ou das duas antenas, com posterior análise do perfil de escolha do hospedeiro. As fêmeas com as duas antenas (controle) ou com apenas uma delas (direita ou esquerda) conseguem distinguir bem entre a presença e a ausência dos grãos, encontrando o hospedeiro. São capazes de distinguir também entre diferentes grãos, mantendo o perfil de preferência pelo feijão. Os resultados foram similares para a retirada de ambas as antenas, indicando que não ocorre lateralização, como demonstrado por Letzkus *et al.* (2006), em estudos com *Apis mellifera*. Entretanto, quando as duas antenas são removidas, elas perdem a habilidade de escolha pelo hospedeiro usual, escolhendo os diferentes grãos em proporções similares (FIGURA 16).

Os machos também foram testados quanto a importância das antenas no processo de escolha. Eles mostraram que possuem a capacidade de percepção para encontrar os grãos na presença das antenas, sejam as duas (controle) ou na presença de apenas uma delas (direita ou esquerda). Surpreendentemente, as respostas em machos indicam uma possibilidade de ocorrência de lateralização, diferente do que ocorre em fêmeas da espécie, visto que em situações de retirada da antena esquerda eles fazem menos escolhas, ou seja, escolhem os grãos em proporções menores do que quando é retirada a antena direita. E, de maneira contrária às fêmeas, eles não exibiram habilidade para distinção ou seleção entre diferentes hospedeiros, tanto na presença das antenas quanto na ausência das mesmas (FIGURA 16). Isso pode significar ausência ou pouca quantidade de estruturas sensitivas associadas ao reconhecimento de hospedeiro ou, mais especificamente, as substâncias liberadas pelo hospedeiro.

De acordo com Groot *et al.* (1999) as antenas são estruturas de grande importância para as fêmeas, no processo de procura e seleção do hospedeiro ideal. Ele descreve que em machos elas podem apresentar outras funções primordiais, como a detecção de feromônios por exemplo. Provavelmente é esse o motivo dos machos de *Z. subfasciatus* não apresentarem preferência entre diferentes grãos, mesmo na presença das antenas. Shields e Hildebrand (2001) descreveram diferenças morfológicas e funcionais em antenas de machos e fêmeas de *Manduca sexta*. As observações dele foram similares às de Groot, porém com ênfase nas sensilas encontradas nas antenas.

Pimbert e Pouzat (1988) realizaram estudos eletroantenográficos em *Z. subfasciatus*. Seus resultados apontam para a influência dos grãos no desenvolvimento reprodutivo das fêmeas da espécie. Eles afirmam que o contato com os grãos é capaz de antecipar a produção de compostos atrativos para os machos. Deduziram que as fêmeas produzem um feromônio sexual quando em contato com a semente, e que apenas os machos respondem à presença dessa substância. Esses dados reforçam a ideia de que as antenas dos machos são mais específicas para o reconhecimento de feromônios do que para a seleção de hospedeiros.

É sabido também que existe uma relação entre os compostos voláteis liberados pelas plantas e a comunicação via feromônios sexuais. Landolt e Phillips (1997) mostraram que na presença desses compostos ocorre uma melhora tanto na produção do hormônio quanto na resposta ao parceiro (isto foi demonstrado também em algumas espécies do gênero *Lepidoptera*, WITZGALL *et al.*, 1991). Yang *et al.* (2004) também mostrou que o efeito do feromônio sexual em machos foi amplamente aumentado quando na presença de voláteis liberados pelas plantas, em estudos com *Cydia pomonella* L. Ele percebeu que ocorre uma amplificação dos sinais desses infoquímicos, permitindo comunicação a longa distância.

A importância do hospedeiro para a atividade de produção e/ou liberação de feromônios encontra-se descrita para diversos insetos especialistas (SHOREY, 1974). E, alguns estudos mostram que armadilhas realizadas com fêmeas não atraem os machos até que o hospedeiro esteja presente e disponível para essas fêmeas (HOLBROOK *et al.*, 1960; RIDDIFORD *et al.*, 1967a, b; SHARMA *et al.*, 1971).

Callosobruchus maculatus, *C. chinensis* e outras pragas de grãos armazenados da família Bruchinae, têm as fêmeas como produtoras do feromônio sexual. (TANAKA *et al.*, 1981; QI; BURK-HOLDER, 1982; BURK-HOLDER, 1985). Já o *A. obtectus* é tido como uma exceção ao grupo, pois os feromônios sexuais são produzidos pelos machos da espécie (HALSTEAD, 1973; HOPE *et al.*, 1967; POUZAT, 1974). Então, existe a possibilidade de que as fêmeas do *Z. subfasciatus* sejam responsáveis pela procura do hospedeiro ideal e que ao encontrá-lo elas atraiam os machos até o local. Essa atração deve envolver um aumento na produção e liberação de feromônios. Assim, os machos tenderiam a apresentar uma maior percepção dos compostos liberados pelas fêmeas do que pelos grãos, e as fêmeas aos compostos liberados pelas sementes. Esse processo de procura e reconhecimento é dependente da percepção associada ao papel das antenas. Elas podem ser funcionalmente diferentes entre machos e fêmeas. Para considerar essa possibilidade é necessário o planejamento e realização de experimentos adicionais. Por exemplo, investigações voltadas para o perfil molecular apresentado por fêmeas e machos da espécie e experimentos comportamentais utilizando arenas com fêmeas e machos simultaneamente, na presença e na ausência de feijão. Embora tais experimentos ainda não tenham sido realizados, foi possível averiguar se existe dimorfismo sexual nas antenas de *Z. subfasciatus* através de análises por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Entretanto, os resultados encontrados serão discutidos mais adiante, juntamente com outros dados obtidos por MEV.

Voláteis de plantas exercem função de indicadores das qualidades apresentadas pela planta, de forma a permitir que as fêmeas os reconheçam e avaliem se aquele seria um bom hospedeiro. Fatores bióticos e abióticos, assim como o sexo e a idade do animal, também podem interferir nas respostas a estímulos olfativos (voláteis do hospedeiro) reconhecidos pelos insetos (CASTROVILLO; CARDÉ, 1979; LINN; ROELOFS, 1992; GADENNE *et al.*, 2016). Frequentemente, fêmeas respondem mais a testes eletroantenográficos com voláteis de plantas do que os machos (PALANISWAMY *et al.*, 1986; PIVNICK *et al.*, 1990). Elas visam colocar o máximo de ovos e garantir a sobrevivência e boas condições para o desenvolvimento da prole. Já os machos respondem melhor a testes que utilizam feromônios sexuais, afinal têm o

acasalamento como principal missão de vida (PIVNICK *et al.*, 1990; REDDY; GUERRERO, 2004; BONDURIANSKY, 2010).

A idade do animal também parece interferir nas respostas ao hospedeiro. Em *Callosobruchus maculatus* e *Manduca sexta*, as respostas comportamentais a odores de plantas hospedeiras dependem da idade do inseto (MECHABER, *et al.*, 2002; ARNOLD *et al.*, 2012). Fêmeas de *Aedes aegypti* mostraram melhores respostas a alterações na concentração de CO₂ quando em idades mais avançadas (GRANT; O'CONNELL, 2007), *Spodoptera littoralis* tem a sensibilidade antenal diminuída com o avanço da idade (MARTEL, *et al.*, 2009), *Anastrepha obliqua* apresentou melhores respostas a voláteis do hospedeiro quando os testes eletroantegráficos foram realizados utilizando adultos mais jovens (REYES, *et al.*, 2017), etc. Por este motivo, em nosso trabalho, foram utilizados carunchos de até 24h de vida em todos os experimentos. Esta idade pode ser contraditória se for considerado que as fêmeas se tornam sexualmente maduras em torno de 72h de vida. Mas deve-se considerar também que elas amadurecem mais rápido se em contato com as sementes do hospedeiro (PIMBERT; PIERRE, 1983).

Em algumas espécies é necessária a participação simultânea das antenas, palpos e do ovipositor durante o processo de seleção do hospedeiro. Em Hymenoptera, é possível encontrar vários exemplos em que o ovipositor é tão importante quanto as antenas. Neste caso, as antenas têm função de localização do hospedeiro e o ovipositor possui quimiossensores com função de perceber estímulos que iniciarão a postura de ovos (VAN LENTEREN, 1972; HAWKE *et al.*, 1973). Pesquisas com *Manduca sexta* provaram que a remoção das antenas pode resultar em comportamento inadequado de oviposição (YAMAMOTO; FRAENKEL, 1960). Já é descrito também que em gorgulhos do feijão, além do estímulo químico associado às vagens e sementes da planta, estímulos táteis parecem ser de extrema importância (SZENTESI, 1976).

Pesquisas com foco em bruquíneos ainda são pouco numerosas, porém sabe-se que *C. chinensis* e *C. maculatus* apresentam 8 tipos diferentes de sensílas em suas antenas, em ambos os sexos. Destas, pelo menos duas tem função olfatória, duas atuam como receptor de hormônio sexual e duas são associadas à quimiorrecepção (FEI HU *et al.*, 2009). Urbanek e seu grupo (2016) indentificaram cinco tipos de sensilas em antenas e palpos de *A. obtectus*. Dois deles foram encontrados apenas em segmentos finais dos palpos maxilares e labiais. Em 2017, Yadav e Borges mostraram a ocorrência de função olfatória associada a percepção de compostos voláteis em ovipositor de *Sycophaga fusca* e de *Apocrypta westwoodi*. Adicionalmente, Hooper *et al.* (1972) constatou a presença de quimiossensores no ovipositor de *Musca autumnalis*, através de análises por MEV.

Estudos com *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae) indicam a existência de dimorfismo sexual na antena, associado à ocorrência de diferentes estruturas sensitivas em machos e fêmeas (SEADA; HAMZA, 2018). Muitas vezes as antenas de machos são mais complexas e isso pode estar relacionado à necessidade de ter mais sensilas para encontrar uma parceira (KIM; LEAL, 2000). Considerando esta informação, em nosso trabalho, foram realizadas análises por MEV, visando entender melhor o mecanismo utilizado pelos *Z. subfasciatus* na procura de um hospedeiro ideal. As análises consistiram na observação de características morfológicas apresentadas pelo caruncho, focando em estruturas normalmente descritas como associadas à procura e reconhecimento do hospedeiro: antenas, palpos, patas e ovipositor. Os resultados mostram diferenças na constituição de sensilas em antenas de machos e fêmeas de *Z. subfasciatus*. As fêmeas apresentam antenas constituídas por sensilas basicônicas. Essas sensilas são generalistas e frequentemente associadas ao reconhecimento de compostos voláteis de plantas. Nos machos, as antenas apresentam mais sensilas do tipo tricoidea, associadas à quimiorrecepção e ao reconhecimento de feromônios (HU *et al.*, 2009). Esses resultados suportam a hipótese de que a recepção de sinais químicos provenientes das sementes acontece nas fêmeas mediante a participação de sensilas específicas localizadas nas antenas dos carunchos.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesse estudo, é possível concluir que: **(1)** os indivíduos de *Z. subfasciatus* são atraídos por substâncias voláteis liberadas pelo hospedeiro, e que a escolha do hospedeiro pode ocorrer com base em substâncias importantes para o processo de oviposição (no caso das fêmeas), visto que para os machos a escolha parece ser aleatória; **(2)** a hierarquia de escolha de sementes é semelhante à hierarquia de escolha de substrato de oviposição, que, por sua vez, reflete a proximidade filogenética das plantas hospedeiras; **(3)** os compostos voláteis não se concentram em partes das sementes, eles estão presentes em toda a semente; **(4)** foram detectados mais compostos voláteis nas sementes de grão de bico do que nas sementes de feijão, sendo o estireno um composto que se destaca em feijão e os compostos hexanal e octanal estando em destaque nas sementes de grão de bico; **(5)** as antenas e o olfato estão envolvidos no processo de seleção do hospedeiro pelas fêmeas, visto que na ausência das antenas ocorre alteração no padrão de escolha do grão; **(6)** fêmeas e machos apresentam dimorfismo sexual quanto ao tamanho de suas antenas e também com relação às estruturas sensitivas que as compõem (sensílas), demonstrando, a princípio, um perfil de reconhecimento de voláteis em fêmeas e de reconhecimento de feromônios em machos, **(7)** os machos parecem apresentar lateralidade funcional nas antenas, o que demonstra a complexidade fisiológica destes órgãos em *Z. subfasciatus*. Experimentos de análise comportamental em arenas de escolha testando a resposta dos carunchos a compostos identificados nas sementes (etenilbenzeno e 2-etil-1-hexano) e, ainda, a diferentes combinações e concentrações destes compostos, se encontram em andamento. Estes experimentos deverão revelar os alcances da participação de compostos identificados nas sementes como inforquímicos envolvidos na seleção de hospedeiros para oviposição e desenvolvimento em *Z. subfasciatus*.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. F. B.; BIAVA, M. (ed.). **Cultivo do feijão da primeira e segunda safras na região sul de Minas Gerais**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. Disponível em: <https://www.embrapa.br/arroz-e-feijao>. Acesso em: 02 set. 2018.
- AJAYI, O. E. *et al.* Semiochemical modulation of host preference of *Callosobruchus maculatus* on legume seeds. **Journal of Stored Products Research**, v. 63, p. 31-37, 2015.
- ALMEIDA, L. M.; MISE, K. M. Diagnosis and key of the main families and species of South American Coleoptera of forensic importance. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 2, p. 227-244, 2009.
- ALTNER, H. *et al.* Poreless sensilla with inflexible sockets. **Cell Tissue and Research**, v. 234, p. 279–307, 1983.
- ALVAREZ, N. *et al.* Ancient and recent evolutionary history of the bruchid beetle, *Acanthocelides obtectus* Say, a cosmopolitan pest of beans. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 1015-1024, 2005.
- ALZOUMA, I.; HUIGNARD, J. Données préliminaires sur la biologie et le comportement de ponte dans la nature de *Bruchidius atrolineatus* (Pic) (Coléoptère - Bruchidae) dans une zone subsaharienne au Niger. **Acta Oecologica**, v. 2, p. 391 - 400, 1981.
- AMOS, T. G. The effect of antennectomy on the humidity reactions of *Carpophilus dimidiatus* and *C. hemipterus* (COLEOPTERA, NITIDULIDAE). **Entomologia Experimentalis et applicata**, v. 10, p. 1-6, 1967.
- ARIMURA, G.; MATSUI, K.; TAKABAYASHI, J. Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. **Plant Cell Physiology**, v. 50, p. 911-923, 2009.
- ARNOLD, S. E. J.; STEVENSON, P. C.; BELMAIN, S. R. Odour-mediated orientation of beetles is influenced by age, sex and morph. **Plos One**, v. 7, n. 11, e49071, 2012.

AUDINO, L. D. *et al.* Identificação dos coleópteros (Insecta-Coleoptera) das regiões de Palmas (município de Bagé) e Santa Barbinha (município de Caçapava do Sul) RS. Bagé: **Embrapa Pecuária Sul**, p. 92, 2007.

AWMACK, C. S.; LEATHER, S. R. Host plant quality and fecundity in herbivore insects. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p. 817-844, 2002.

BALACHOWSKY, A. D. **Traité d'entomologie appliquee a l'agriculture**. Paris: Mason, 1962.

BALLHORN, D. J.; KAUTZ, S.; HEIL, M. Distance and sex determine host plant choice by herbivorous beetles. **Plos One**, v. 8, n. 2, e55602, 2013.

BARROS, H. C.; ZUCOLOTO, F. S. Performance and host preference of *Ascia monuste* (Lepidoptera, Pieridae). **Journal of Insect Physiology**, v. 45, p. 7-14, 1999.

BARROS-DE-SOUZA, S.; TEIXEIRA, I. R. V. Efeitos da competição interespecífica. **Revista de Iniciação Científica Unifeg**, v. 5, p. 163-170, 2005.

BARROSO, M. R. *et al.* Caracterização e avaliação de diferentes espécies de leguminosas grão na Região de Trás-os-Montes. **Mirandela: Direcção Regional de Agricultura e Pescas do Norte. Núcleo de Documentação e Relações Públicas**, p. 67, 2007.

BARRUETO-GONZALEZ, N. B. Biodisponibilidade de minerais das fontes leguminosas. **Revista Simbio-Logias**, v. 1, n. 1, p. 174-183, 2008.

BARTLET, E. *et al.* Functional anatomy of sensory structures on the antennae of *Psylliodes chrysocephala* L. (Coleoptera: Chrysomelidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 10, p. 29-42, 1999.

BECK, J. J.; LIGHT, D. M.; GEE, W. S. Eletroantenographic bioassay as a screening tool for host plant volatiles. **Journal of Visualizes Experiments**, v. 63, p. 3931, 2012.

BELAL, B.; PRAKASH, O. M.; NAND, V. Altitudinal variations in chemical profile and antioxidant activities of lentil (*Lens culinaris Medik.*) genotypes. **The Pharma Innovation Journal**, v. 8, n. 2, p. 657-662, 2019.

BERNAYS, E. A.; GRAHAM, M. On the evolution of host specificity in phytophagous arthropods. **Ecological Society of America**, v. 69, p. 886-892, 1988.

BONDAR, G. Notas biológicas sobre bruquídeos observados no Brasil. **Arquivos do Instituto de Biologia Vegetal**, v. 3, p. 7 – 44, 1936.

BONDURIANSKY, R. The evolution of male mate choice in insects: A synthesis of ideas and evidence. **Biological Reviews**, v. 76, p. 305–339, 2010.

BOUCHARD, P. *et al.* Family-group names in Coleoptera (Insecta). **ZooKeys**, v. 88, p. 1-972, 2011.

BOUÉ, S. M. *et al.* Identification of volatile compounds in soybean at various developmental stages using solid phase microextraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 17, p. 4873-4876, 2003.

BRIANO, J. A.; CORDO, H. A.; DELOACH, C. J. Biology and field observations of *Penthobruchus germaini* (Coleoptera: Bruchinae), a biological control agent for *Parkinsonia aculeate* (Caesalpinaceae). **Biological Control**, v. 24, p. 292-299, 2002.

BROWN, W. L. J.; EISNER, T.; WHITTAKER, R. H. Allomones and Kairomones: transpacific chemical messengers. **Bioscience**, v. 20, p. 21-22, 1970.

BRUCE, T. J.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. Insect host location: A volatile situation. **Trends in Plant Sciences**, v. 10, p. 269-274, 2005.

BRUCE T. J. A.; PICKETT, J. A. Perception of plant volatile blends by herbivorous insects: finding the right mix. **Phytochemistry**, v. 72, p. 1605-1611, 2011.

BRUYNE, M.; BAKER, T. C. Odor detection in insects: volatile codes. **Journal of Chemical Ecology**, v. 34, p. 882-897, 2008.

BURKHOLDER, W. E.; MA, M. Pheromones for monitoring and control of stored-product insects. **Annual Review of Entomology**, v. 30, p. 257-272, 1985.

BURKHOLDER, W.E. Practical use of pheromones and other attractants for stored-product insects. *In*: RIDGEWAY, R. L.; SILVERTEIN, R. M.; INSCOE, M. N. (ed). **Behavior modifying chemicals for insect management, applications of pheromones and other attractants**, Cidade: Estados Unidos. Editora: Marcel Dekker, 1990. p. 497-516.

- CAREY, A. F.; CARLSON, J. R. Insect olfaction from model systems to disease control. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, p. 12987-12995, 2011.
- CARVALHO, R. P. L.; J. C. ROSSETO. Biologia de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann) (Coleoptera Bruchidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 13, n. 1, p. 105-117, 1968.
- CASTROVILLO, P. J.; CARDÉ, R. T. Environmental regulation of female calling and male pheromone responsive periodicities in the codling moth (*Laspeyresia pomonella*). **Journal of Insect Physiology**, v. 25, p. 659–667, 1979.
- CHA D. H. *et al.* Eavesdropping on plant volatiles by a specialist moth: Significance of ratio and concentration. **Plos One**, v. 6, n. 2, p. e17033, 2011.
- CHABOO, C. S. Biology and phylogeny of the Cassidinae Gyllenhal sensu lato (tortoise and leaf-mining beetles) (Coleoptera: Chrysomelidae). **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 305, p. 1-250, 2007.
- CHAPMAN, R. F. **The insects: structure and function**. New York: Cambridge University, 1998.
- CHAPMAN A. D. Number of Living Species in Australia and the World. Report for the **Australian Biological Resources Study**, 2nd. ed., p.14, 2009.
- CORNELL, H. V.; HAWKINS, B. A. Herbivore responses to plant secondary compounds: a test of phytochemical coevolution theory. **The American Naturalist**, v. 161, n. 4, p. 507-22, 2003.
- CORRÊA, C. P. *et al.* Adult feeding and host type modulate the life history traits of the capital breeder *Zabrotes subfasciatus*. **Physiological Entomology**, v. 45 n. 2-3, p. 120-128, 2020.
- CORRÊA, C. P. *et al.* Life history trait response to ambient temperature and food availability variations in the bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. **Physiological Entomology**, online version of record before inclusion in a issue, 2021.
- COSTA, C. Estado de conocimiento de los Coleoptera Neotropicales. **Sociedad Entomológica Aragonesa**, v. 1, p. 326, 2000.

CREDLAND, P. F.; DENDY, J. Intraspecific variation in binomial characters of the Mexican bean weevil, *Zabrotes subfasciatus*. **Entomology Experimentalis et Applicata**, v. 65, p. 39-47, 1992.

CRNJAR, R. *et al.* Morphology and EAG mapping of the antennal olfactory receptors in *Dacus oleae*. **Entomology Experimentalis et Applicata**, v. 51, p. 77-85, 1989.

CRONK, Q.; OJEDA, I.; PENNINGTON, R. T. Legume comparative genomics: Progress in phylogenetics and phylogenomics. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 2, p. 99-103, 2006.

CROWSON, R. A. **The Biology of Coleoptera**. London: Academic Press, 1981. 802 p.

D'ALESSANDRO, M., *et al.* Strong attraction of the parasitoid *Cotesia marginiventris* towards minor volatile compounds of maize. **Journal of Chemical Ecology**, v. 35, p. 999-1008, 2009.

DAVIES, J. C. A note on the occurrence of *Zabrotes subfasciatus* Boh (Coleoptera-Bruchidae) on legumes in Uganda. **East African Agricultural and Forestry Journal**, v. 31, p. 294-299, 1972.

DECHECO, A.; MONCADA, B.; ORTIZ, M. Desarrollo de *Zabrotes subfasciatus* sobre seis variedades de frijol en Lima. **Revista Peruana de Entomología**, v. 29, p. 77-79, 1986.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

DEL ROSARIO, R. *et al.* Comparison of headspace volatiles from winged beans and soybeans. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 32, p. 1011-1015, 1984.

DENDY, J.; CREDLAND P. F. Development, fecundity and egg dispersion of *Zabrotes subfasciatus*. **Entomology Experimentalis et Applicata**, v. 59, p. 9-17, 1991.

DETHIER, V. G. Chemical factors determining the choice of food plants by *Papilio* larvae. **American Naturalist**, v. 75, p. 61-73, 1941.

DETHIER, V. G. Evolution of feeding preferences in phytophagous insects. **Society for Study of Evolution**, v. 8, n. 1, p. 33-54, 1954.

DIAS-PINI, N. S. *et al.* **Seleção hospedeira por insetos fitófagos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2016. 25p.

DICKE, M.; SABELIS, M. Infochemical terminology: should it be based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds. **Oxford Review of Education**, v. 2, p. 131-139, 1988.

DINDONIS, L., MILLER, J. R. Onion fly and little house fly host finding selectively mediated by decomposing onion and microbial volatiles. **Journal of Chemical Ecology**, v. 7, p. 419-426, 1981.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, Rockville, v. 135, n. 4, p. 1893-1902, 2004.

DUDAREVA, N.; *et al.* Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, n. 5, p. 417-440, 2006.

DUKE, J. A. **Handbook of legumes of world economic importance**. 2. ed. Caxias do Sul: Plenum, 1983. 345 p.

EHRlich, P. R.; RAVEN, P. H. Butterflies and Plants: A study in coevolution. **Evolution**, v. 18, n. 4, p. 586-608, 1964.

EVANS, G. **The life of beetles**. George Allen: Unwin, 1975. 105 p.

FABACEAE. **Encyclopedia Britannica**, 2016. Disponível em: <http://www.britannica.com/plant/Fabaceae>. Acesso em: 26 Ago. 2018.

FAO. Statistical databases, 2019. Disponível em: <http://faostat.fao.org>. Acesso em: 02 dez. 2020.

FEDER, J. L. *et al.* Intra- and interspecific competition and host race formation in the apple margoot fly, *Rhagoletis pomonella* (Diptera – Tephritidae). **Oecologia**, v. 101, p. 416-425, 1995.

FEENY, P. Ecological opportunism and chemical constraints on the host associations of swallowtail butterflies. *Swallowtails Butterflies: Their Ecology and Evolutionary Biology* (ed.

By J. M. Scriber, Y. Tsubaki and R. C. Lederhouse). **Scientific Publishers Inc.**, p. 9–15, 1995.

FEI HU, GUO-NA ZHANG, JIN-JUN WANG. Scanning electron microscopy studies of antennal sensilla of bruchid beetles, *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Callosobruchus maculatus* (F.) (COLEOPTERA: BRUCHIDAE). **Micron**, v. 40, p. 320-326, 2009.

FERNANDEZ, P.; HILKER, M. Host plant location by Chrysomelidae. **Basic and Applied Ecology**, v. 8, p. 97-116, 2007.

FERRAZ, F. C.; CARVALHO, A. G. Ocorrência e danos por *Pygiopachymerus lineola* (Chevrolat, 1871) (Coleoptera:Bruchidae) em frutos de *Cassia fistula* no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. **Revista Biotemas**, v. 14, n. 1, p. 137- 140, 2001.

FERREIRA, R. A. *et al.* Do haematophagous bugs assess skin surface temperature to detect blood vessels? **Plos One**, v. 2, n.9, e932, 2007.

FIELD, L. M., PICKETT, J. A.; WADHAMS, L. J. Molecular studies in insect olfaction. **Insect Molecular Biology**. v. 9, p. 545-551, 2000.

FIGUEIRA, L. K.; CARVALHO, A. G. Avaliação de frutos de *Albizia lebbek* e danos causados por *Merobruchus paquetae*. **Revista de Agricultura**, v. 78, n. 1, p. 67-76, 2003.

FOOTTIT, R. G.; ADLER, P. H. **Insect biodiversity: science and society**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2009.

FOSTER, S. P.; HARRIS, M. O. Behavioral manipulation methods for insect pestmanagement. **Annual Review of Entomology**, v. 42, p. 123-146, 1997.

FOX, C. W.; TATAR, M. Oviposition substrate affects adult mortality, independent of reproduction, in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. **Ecological Entomology**, v. 19, p. 108–110, 1994.

FUTUYMA, D. J.; AGRAWAL, A. A. Macroevolution and the biological diversity of plants and herbivores. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of Americ**, v. 27, n. 106(43), p. 18054-18061, 2009.

GABAN, A. C; GUARNIERI, P. Identificação de gargalos na logística agroindustrial: revisão sistemática da literatura. *In: CONGRESSO DA SOBER*, n. 53., 2015, João Pessoa. **Anais [...]** João Pessoa: SOBER, 2015.

GADENNE, C., BARROZO, R. B.; ANTON, S. Plasticity in insect olfaction: To smell or not to smell. **Annual Review of Entomology**, v. 61, p. 317–333, 2016.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S. *et al.* **Manual de entomologia agrícola**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1988. 64 p.

GALLO, D. *et al.* **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 919 p.

GARCIA-CEBRIÁN, F.; ESTESO-MARTINEZ, J.; GIL-PELEGRÍN, E. Influence of cotyledon removal on early seedling growth in *Quercus robur* L. **Annals of Forest Science**, v. 60, p. 69-73, 2003.

GENTRY, A. H. Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental and geographical gradients. **Annals of the Missouri Botanic Garden**, v. 75, p. 1-34, 1988.

GIANNAKAKIS, A.; FLETCHER, B. S. Morphology and distribution of antennal sensilla of *Dacus tryoni* (froggatt) (Diptera, Tephritidae). **Journal of the Australian of Entomological Society**, v. 24, p. 31-35, 1985.

GINZEL, M. D.; HANKS, L. M. Role of host plant volatiles in mate location for three species of longhorned beetles. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, p. 213–217, 2005.

GIRÃO FILHO, J. E. **Antibiose de acessos de feijão-fava infestados com *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) (Coleoptera : Chrysomelidae : Bruchinae) em três gerações**. Teresina: Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Agrárias, 2014.

GOUINGUENÉ, S. P., STÄDLER, E. Oviposition in *Delia platura* (Diptera, Anthomyiidae): The role of volatile and contact cues of bean. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, p. 1399-1413, 2006.

GRABE, V.; SACHSE, S. Fundamental principles of the olfactory code. **BioSystems**, v. 164, p. 94–101, 2018.

GRANT, A. J.; O'CONNELL, R. J. Age-related changes in female mosquito carbon dioxide detection. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, p. 617–623, 2007.

GRIMALDI, D.; ENGEL M. S. **Evolution of the insects**. Cambridge: Cambridge University, 2005.

GROOT, A. T. *et al.* Sex-related perception of insect and plant volatiles in *Lygocoris pabulinus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 10, p. 2357–2371, 1999.

GUPTA, D. S. *et al.* Lentils (*Lens culinaris L.*), a rich source of folates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 7794-7799, 2013.

GUZZO, E. C. *et al.* Adult attractiveness and oviposition preference of *Zabrotes subfasciatus* toward genotypes of common bean *Phaseolus vulgaris*. **Phytoparasitica**, v. 46, p. 645-651, 2018.

HAINES, C. P. **Insects and arachnids of tropical stored products: their biology and identification**. 2^a ed. Natural Resources Institute, 1991. 246 p.

HALLBERG, E.; HANSSON, B. S.; STEINBRECHT, R. A. Morphological characteristics of antennal sensilla in the European cornborer *Ostrinia nubilalis* (Lepdoptera: Pyralidae). **Cell and tissue Research**, v. 26, p. 489-502, 1994.

HALSTEAD, D. G. H. Preliminary biological studies on the pheromone produced by male *Acanthocelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of stored products Research**, v. 9, p. 109-117, 1973.

HAMMACK, L. Single and blended maize volatiles as attractants for diabroticite corn rootworm beetles. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, p. 1373-1390, 2001.

HANSSON, B. S. **Insect olfaction**. Heidelberg: Springer verlag, 1999.

HANSSON, B. S.; STENSMYR, M. C. Evolution of insect olfaction. **Neuro**, v. 72, p. 698-711, 2011.

HANSSON, B. S.; WICHER, D. The detection of odors, tastes and other chemostimuli. *In: Chemical ecology in insects, in Chemosensory Transduction*. ZUFALL, F.; MUNGER, S. D. ed. Cambridge: Academic Press, 2016. p. 29-45.

HAWKE, S.D., FARLEY, R.D.; GREANY, P. D. The fine structure of sense organs in the ovipositor of the parasitic wasp, *Orgilus lepidus* *Muesebeck*. **Cell and tissue Research**, v. 5, n. 1, p. 171-184, 1973.

HAYASHI, A. M.; MALAGUETTA, H.; KAYNA, A. Influência da remoção dos cotilédones no desenvolvimento inicial de plântulas de *Canavalia ensiformis* e *Phaseolus vulgaris* (Leguminosae: Papilionoidae). **Bioikos**, Campinas v. 26, n. 2, p. 63-70, 2012.

HAWTIN, G.C.; SINGH, K. B.; SAXENA, M. C. Some recent developments in the understanding and improvement of *Cicer* and *Lens*. In: SUMMERFIELD, R.J.; BUNTING, A.H. (Eds.). *Advances in legume science*. Kew: **Royal Botanic Gardens**, p. 613-623, 1980.

HERLING, V. R. **Leguminosas forrageiras de clima tropical e temperado**. Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2016.

HERN, A.; DORN, S. Sexual dimorphism in the olfactory orientation of adult *Cydia pomonella* in response to alpha-farnesene. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 92, p. 63-72, 1999.

HILL, D. S. **Pests of stored products and their control**. New York: CRC Press, 1990. 274 p.

HILL, S. R.; HANSSON, B. S.; IGNELL, R. Characterization of antennal trichoid sensilla from female southern house mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. **Chemical Senses** v. 34, p. 231-252, 2009.,

HINKS, J. A. A review of transmission electron microscopes with in situ ion irradiation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research**, v. 267, n. 23/24, p. 3652-3662, 2009.

HOHMANN, C. L.; CARVALHO, S. M. Pragas e seu controle. In: IAPAR. **O feijão no Paraná**. Londrina, 1989. p. 217-246.

HOLBROOK, R. F., BURGESS, E. D., Gipsy moth (*Porthetria díspar*) detection with the natural female sex lure. **Journal of Economic Entomology**, v. 53, n. 5, p. 751-756, 1960.

HOPE, J. A., HORLER, D. F., ROWLANDS, D. G. A possible pheromone of the bruchid *Acanthoscelides obtectus* (Say). **Journal of Stored Product Research**, v. 3, n. 4, p. 387-388, 1967.

HOWE, R. W.; CURRIE, J. E. Some laboratory observations on the rates of development, mortality and oviposition of several species of Bruchidae breeding in stored pulses. **Bulletin of Entomological Research**, v. 55, n. 03, p. 437- 477, 1964.

HOWE, R. W. Insects attacking seeds during storage. In.: KOZLOWSKI, T.T. (ed.) **Seed Biology: Insects, and Seed collection, Storage, Testing, and Certification**. Vol. III. New York and London: Academic Press, 1972. p.247-300.

HU, F.; ZHANG, G. N.; WANG J. J. Scanning electron microscopy studies of antennal sensilla of bruchid beetles, *Callosobruchus chinensis* (L.) and *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Micron.**, v. 40, n. 3, p. 320-6, 2009.

HUIGNARD, J. **Influence de quelques stimulations externes dues i la copulation sur fa fonction reproductrice des femelles chez *Acanthoscelides obtectus* (Say) Coleoptera-Bruchidae**. Tours: Those Doctorat d'Etat, 1973.

HUNT, T. *et al.* A comprehensive phylogeny of beetles reveals the evolutionary origins of a superradiation. **Science**; v. 318, n. 5858, p. 1913-1916, 2007.

INTERNATIONAL CROPS RESEARCH INSTITUTE FOR THE SEMI - ARID TROPICS. **Chickpea**. Patancheru, c2019. Disponível em <http://www.icrisat.org/crop-chickpea.html>. Acesso em: 20 apr. 2019.

IGNACIMUTHU, S.; WÄCKERS, F. L.; DORN, S. The role of chemical cues in host finding and acceptance by *Callosobruchus chinensis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 96, p. 213-219, 2000.

IMENES, S. D. L.; IDE, S. Principais grupos de insetos pragas em plantas de interesse econômico. **Biológica**, São Paulo, v. 64, n.2, p. 235-238, 2002.

ISHIKAWA, S.; HIRAO, T. Electrophysiological studies of taste sensation in the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. Responsiveness of sensilla styloconica on the maxilla. **Bulletin of the Sericultural Experiment Station Japan**, v. 19, p. 297–357, 1963.

JANKIELSON, A. The importance of insects in agricultural Ecosystems. **Advances in Entomology**, v. 6, p. 62-73, 2018.

JANZ, N. Evolutionary ecology of oviposition strategies. *In*: HILKER, M.; MEINERS, T. (Org.). **Chemoecology of insect eggs and egg deposition**. Blackwell, 2002. p. 349-376.

JANZEN, D. H. Seed eaters versus seed size number, toxicity and dispersal. **Evolution**, v. 23, p. 1-27, 1969.

JANZEN, D. H. The ecology and evolutionary biology of seed chemistry as relates to seed predation. **Aspects of Plants and animal Coevolution Academic**, London, p. 163-206, 1978.

JANZEN, D. H. Lectins and Plant-Herbivore Interactions. *In*: LOEWUS F. A.; RYAN C.A. (ed.) **The phytochemistry of cell recognition and cell surface interactions. Recent advances in phytochemistry**. Boston: Springer, 1981.

JERMY, T. Insect host-plant relationship, co-evolution or sequential evolution. **Symposium of Biology Hungary**, v. 16, p. 109–113, 1976.

JERMY, T. Evolution of insect/host plant relationships. **American Naturalist**, v. 124, p. 609–630, 1984.

JOHNSON, C. D. Interactions between bruchid (Coleoptera) feeding guilds and behavioral patterns of fruits of the Leguminosae. **Environmental Entomology**, v. 10, p. 249-253, 1981a.

JOHNSON, C. D. **Seed beetle host specificity and the systematics of the Leguminosae**. *In*: R. M. POLHILL; P. H. RAVEN (ed). *Advances in legume systematics*. Kew: Royal Botanic Gardens, 1981. 1050 p.

JOHNSON C.; KISTLER R. A. Nutritional ecology of bruchid beetles. *In*: F. SLANSKY JR.; J. G. RODRIGUES (Ed). **Nutritional ecology of insects, mites, spiders and related invertebrates**. New York: John Wiley, 1987. p. 259-276.

JOHNSON, C. D. Adaptive radiation of *Acanthoscelides* in seeds: examples of legume-bruchid interactions. C. H. Stirton & J. L. Zarucchi (eds.). *Advances in legume biology*. **Monographs in Systematic Botany**, v. 29, p.747-779, 1989.

JOHNSON, C. D.; B. J. SOUTHGATE; A. DELOBEL. A Revision of the Caryedontini (Coleoptera: Bruchidae: Pachymerinae) of Africa and the Middle East. **Memoirs of the American Entomological Society**, v. 44, p. 1-120, 2003.

JOLIVET, P. Food habits and food selection of Chrysomelidae: Bionomic and evolutionary perspectives, p. 1-24. *In*: JOLIVET, P.; HSIAO, T. H. (ed). **Biology of Chrysomelidae**. Kluwer Academic Publishers, 1988. 615p.

JOLIVET, P. **Insects and plants: parallel evolution and adaptations**. 2 nd. ed. Sandhill: Crane Press, 190p, 1992.

JOURDAN, H. *et al.* Antennal sensilla and sexual dimorphism of the adult ladybird beetle *Semiadalia undecimnotata* SCHN. (Coleoptera: Coccinellidae). **International Journal of insect Morphology and Embryology**, v. 24, p. 307-322, 1995.

KHADKA, K. K. *et al.* Longer antennae for Romeo: Assessing effect of antennae length on courtship and mating success in male crickets, *Acheta domesticus* (ORTOPTERA, GRYLLIDAE). **Journal of Insect Behavior**, v. 25, p. 96-103, 2012.

KAPLAN, L. Archeology and domestication in American Phaseolus beans. **Economic Botany**, v. 19, p. 358-368, 1965.

KEIL, T. A. Functional morphology of insect mechanoreceptors. **Microscope Research and Technique**, v. 39, p. 506-531, 1997.

KELLING, F. J.; BIANCANIELLO, G.; DEN OTTER, C. J. Eletrophysiological characterization of olfactory cell types in the antennae and palps of the housefly. **Journal of insect Physiology**, v. 48, p. 997-1008, 2002.

KERGOAT, G. J. *et al.* Both host-plant phylogeny and chemistry have shaped the African seed-beetle radiation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 35, n. 3, p. 602-11, 2005.

KESSLER, A; BALDWIN, I. T. Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. **Science**, v. 291, n. 5511, p. 2141-2144, 2001.

KIM, J. Y.; LEAL, W. S. Ultrastructure of pheromone detecting sensillum placodeum of the Japanese beetle, *Popillia japonica Newman* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Arthropod Structure & Development**, v. 29, n. 2, p. 121-128, 2000.

KINGSOLVER, J. M. Handbook of the Bruchidae of the United States and Canada (Insecta, Coleoptera). Department of Agriculture: **Technical Bulletin**, v. 1912, p. 324, 2004.

KITCHING, R.L.; DAHLSJO, C. A. L.; EGGLETON, P. Invertebrates and the complexity of tropical ecosystems. **Biotropica**, v. 52, p. 207- 214, 2020.

KLINNER, C. F. *et al.* Functional olfactory sensory neurons housed in olfactory sensilla on the ovipositor of the hawkmoth *Manduca sexta*. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 4, p. 130, 2016.

KNUDSEN, J. T.; GERSHENZON, J. **The chemistry diversity of floral scent**. *In: Biology of Floral Scent*. Flórida: CRC Press, 2006. p. 27–52.

KONSTANTINOV, A. S.; VANDENBERG, N. J. **Handbook of Palearctic Flea Beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticini)**. Utah: American Entomological Institute, 1996. 439p.

LABEYRIE, V. Mise en kvidence d'influences multiples de la plante hate sur la stimulation de la ponte chez *Acanthoscelides obtectus* Say. **Comptes Rendus Biologies**, v. 156, p. 1473-1477, 1962.

LAW, J. H.; REIGNIER, F. E. Pheromones. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 40, p. 533-548, 1971.

LAWRENCE, J. F. Coleoptera. *In: PARKER, SP (ed.). Synopsis and classification of living organisms*. New York: McGraw-Hill, 1982. p. 482-553.

LPWG – The Legume Phylogeny Working Group. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, n.1, p. 44-77, 2017.

LETZKUS, P. *et al.* Lateralization of olfaction in the honeybee *Apis mellifera*. **Current Biology – Cell Press**, v. 16, p. 1471-1476, 2006.

LEWIS, G. P. *et al.* **Legumes of the World**. Burlington: Royal Botanical Gardens, 2005.

LINN, C. E.; ROELOFS, W. L. Role of photoperiod cues in regulating the modulatory action of octopamine on pheromone response thresholds in the cabbage looper moth. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 20, p. 285-302, 1992.

LINZMEIER, A. M.; RIBEIRO-COSTA, C. S.; CARON, E. Comportamento e ciclo de vida de *Sennius bondari* (Pic) (Coleoptera, Chrysomelidae, Bruchinae) em *Senna macranthera*

(Collad.) Irwin & Barn. (Caesalpinaceae). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 2, p. 351-356, 2004.

LOCKEY, J. K.; WILLIS, M. A. One antennae, two antenna, big antennae, small: total antennae length, not bilateral symmetry, predicts odor-tracking performance in the American cockroach *Periplaneta americana*. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, p. 2156-2165, 2015.

LOPES, O. *et al.* Fine structure of antennal sensilla basiconica and their detection of plant volatiles in the eucalyptus woodborer, *Phoracantha semipunctata Fabricius* (Coleoptera: Cerambycidae). **Arthropod Structure and Development**, v. 31, p. 1-13, 2002.

MAARSE, J. "Natural occurrence and routes of formation of styrene in food"; TNO Nutrition and Food Research Institute, **TNO Report**, B 92.084, 1992.

MACIEL, C. D. G.; POLETINE, J. P. Importância econômica e generalidade para o controle da ferrugem asiática na cultura da soja. **Revista Científica Eletrônica Agronomia**, v. 3, junho 2004.

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

MAFRA-NETO, A.; JOLIVET, P. Entomophagy in Chrysomelidae: *Aristobrotica angulicollis* (Erichson) feeding on adult meloids (Coleoptera), p. 171-178. *In*: JOLIVET, P.; COX, M. L.; PETITPIERRE, E. (ed). **Novel aspects of the biology of Chrysomelidae**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1994. 600 p.

MAFRA-NETO, A.; JOLIVET, P. Cannibalism in leaf beetles, p. 195-211. *In*: JOLIVET, P. H. A.; COX, M. L. (eds). **Chrysomelidae Biology: ecological studies**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1996. 465 p.

MANARA, W.; RIBEIRO, N. D. Grão-de-bico. Revisão Bibliográfica. **Ciência Rural**, v. 22, n. 3, 1992.

MALMQVIST, B. *et al.* Black flies in the boreal biome, key organisms in both terrestrial and aquatic environments: a review. **Ecoscience**, v. 11, p. 187-200, 2004.

MARTEL, V. *et al.* Peripheral modulation of olfaction by physiological state in the Egyptian leaf worm *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 55, p. 793–797, 2009.

MARTELETO, P. B.; LOMÔNACO, C.; KERR, W. E. Respostas fisiológicas, morfológicas e comportamentais de *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Bruchidae) associadas ao consumo de diferentes variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris*). **Neotropical Entomology**, v. 38, p. 178-185, 2009.

MCCORMIC, A. C.; UNSICKER, S. B.; GERSHENZON, J. The specificity of herbivore-induced plant volatiles in attracting herbivore enemies. **Trends Plant Science**, v. 17, p. 303-310, 2012.

MECHAUBER, W.L.; CAPALDO, C.T.; HILDEBRAND, J. G. Behavioral responses of adult female tobacco hornworms, *Manduca sexta*, to hostplant volatiles 2 change with age and mating status. **Journal of Insect Science**, v. 2, p. 5, 2002.

MEIK, S. R.; R. DOBIE. The ability of *Zabrotes subfasciatus* to attack cowpeas. **Entomologia Experimentlis et Applicata**, v. 42, p. 151-158, 1986.

MENDES FERREIRA, A. Subsídios para o estudo de uma proga do jegao (*Zabrotes subfasciatus* Boh - Coleoptera Bruchidae) des climas tropicais. **Garcia de Orta**. v. 8, p. 559-581, 1960.

MERIVEE, E. *et al.* Antennal sensilla of the click beetle, *Limonius aeruginosus* (Olivier) (Coleoptera: Elateridae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 27, p. 311-318, 1998.

MERIVEE, E.; RAHI, M.; LUIK, A. Antennal sensilla of the click beetle, *Melanotus villosus* (Geoffroy) (Coleoptera: Elateridae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 28, p. 41-51, 1999.

MERIVEE, E. *et al.* Antennal sensilla of the ground beetle *Bembidion properans* Steph. (Coleoptera: Carabidae). **Micron**, v. 33, p. 429-440, 2002.

MESQUITA, R. M. *et al.* Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): Composição química e digestibilidade proteica. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1114–1121, 2007.

MESSINA, M. J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health Effects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, p. 439S-450S, 1999.

MINNEY, B. H. P. *et al.* Biochemical bases of seed resistance to *Zabrotes subfasciatus* (beanweevil) in *Phaseolus vulgaris* (common bean); a mechanism for arcelin toxicity. **Journal of Insect Physiology**, v. 36, p. 757–767, 1990.

MISSBACH, C. *et al.* Evolution of insect olfactory receptors. **Elife**, v. 3, e02115, 2014.

MOLES, A.T.; WESTOBY, M. What do seedlings die from and what are the implications for evolution of seed size. **Oikos**, v. 106, p. 193–9, 2004.

MULLEN, R. E. **Crop science: principles and practice**. 3. ed. Edina: Burgess Publishing, 1996. 352 p.

NAGNAN-LE MEILLOUR, P. *et al.* Chemosensory proteins from the proboscis of *Mamestra brassicae*. **Chemical Senses**, v. 25, p. 541–553, 2000.

NORDLUND, D. A.; LEWIS, W. J. Terminology of chemical-releasing stimuli in intraspecific interactions. **Journal of Chemical Ecology**. v. 2, p. 211–220, 1976.

NUANZE, S.; FABRES, G.; LABEYRIE, V. Ways of larval competition of *Bruchus affinis* (Coleoptera, Bruchidae) in the seed of *Lathyrus sylvestris* (Leguminosae, Fabaceae). France, **Bulletin of Entomological Research**, v. 97, n. 2, p. 135–144, 1992.

OCHIENG, S. A. *et al.* Functional morphology of antennae chemoreceptors of the parasitoid *Microplitis croceipes*. (Hymenoptera: Braconidae). **Arthropod Structure and Development**, v. 29, p. 231–240, 2000.

OLIVEIRA, O. F.; MORAES, P. L. D. Influência da remoção de cotilédones no desenvolvimento de ramificações nas axilas cotiledonares de plântulas leguminosas. **Acta Botanica Brasilica**, v. 13, n. 3, p. 243–249, 1999.

OOMAH, B. D.; LIANG, L. S. Y.; BALASUBRAMANIAN, P. Volatile compounds of Dry Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Foods Human Nutrition**, v. 62, p. 177–183, 2007.

OSHIMA, K.; HONDA, H.; YAMMMAMOTO. Isolation of oviposition marker from Azuki bean weevil, *Callosobruchus chinensis* L. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 37, p. 2679–2680, 1973.

PALANISWAMY, P. C., GILLOT, C.; SLATER, G. P. Attraction of diamondback moths, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), by volatile compounds of canola, white mustard, and faba bean. **Canadian Entomologist**, v. 118, p. 1279–1285, 1986.

PEREIRA, P. R. V. S.; SALVADORI, J. R. **Identificação dos principais Coleoptera (Insecta) associados a produtos armazenados**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2006. 75 p.

PIMBERT, M. **Etude du comportement de ponte e t de l'activith reproductrice des femelles de *Zabrotes subfasciatus* Boh (Colhoptsre, Burchidae)**. Paris: Diplome d'Etudes Approfondies, 1980.

PIMBERT, M. P.; PIERRE, D. Ecophysiological aspects of bruchid reproduction. I. The influence of pod maturity and seeds of *Phaseolus vulgaris* and the influence of insemination on the reproductive activity of *Zabrotes subfasciatus*. **Ecological Entomology**, v. 8, n. 1, p. 87–94, 1983.

PINHEIRO, P. V.; DE FARIA, J. C. **Fluxo gênico em feijoeiro comum: ocorrência e possíveis conseqüências**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005.

PIVNICK, K. A. *et al.* Attraction of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to volatiles of oriental mustard: The influence of age, sex and prior exposure to mates and host plants. **Environmental Entomology**, v. 19, p. 704–709, 1990.

POUZAT, J. **Rôle des organes sensoriels céphaliques dans l'ovogense et l'émission chez la bruche du haricot, *Acanthoscelides obtectus* Say**. Paris: Colloques Internationaux du Centre National de la Recherche Scientifique, 1970. p. 381-400.

POUZAT, J. Comportement de la Bruche du Haricot femelle, *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae) soumise à différents stimulus olfactifs: male plantehôte. **Comptes Rendus de Academie des Sciences**, v. 278, p. 2173-2176, 1974.

POUZAT, J. The role of sense organs in the relations between bruchids and their host plants. *In*: V. Labeyrie (ed.), **The ecology of bruchids attacking legumes (pulses)**. Hauge: Dr. W. Junk Publishers, 1981. 61–72 p.

PROLLA, I. R. D. **Características físico-químicas de cultivares de feijão e efeitos biológicos da fração fibra solúvel**. Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Santa Maria, 2006. 114p.

RADFORD, I. J.; NICHOLAS, M.; BROWN, J. R. Assessment of the biological control impact of seed predators on the invasive Shrub *Acacia nilotica* (PRICKLY ACACIA) in Australia. **Biological Control**, v. 20, p. 261-268, 2011.

REDDY, G. V.; GUERRERO, A. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. **Trends in Plant Science**, v. 9, p. 253–261, 2004.

REES, D. P. Coleoptera. *In*: **Integrated management of insects in stored products**. SUBRAMANYAM, B.; HAGSTRUN, D. W. (ed). New York: Marcel Dekker, 1996. cap.1, p. 1-11.

REES, D. **Insects of Stored Products**. Collingwood: CIRO Publishing, 2004.

REMMERT, H. **Ecologia**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1982.

REYES, H. *et al.* Physiological state influences the antennal response of *Anastrepha Obliqua* to male and host volatiles. **Physiological Entomology**, v. 42, p. 17–25, 2017.

RICE, M. J. Blowfly ovipositor receptor neuron sensitive to monovalent cation concentration. **Nature**, v. 268, p. 747-749, 1977.

RICE, M. J. Contact chemoreceptors on the ovipositor of the potato moth, *Phthorimaea operculella* (Zell.) (Lepdoptera: Gelechiidae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 11, n. 2, p. 121-128, 1982.

RIDDIFORD, L. M.; WILLIAMS, C. M. Chemical signaling between polyphemus moths and between moths and host plant. **Science**, v. 156, p. 541, 1967b.

RIFFELL, J. A. *et al.* Characterization and coding of behaviourally significant odor mixtures. **Current Biology**, v. 19, p. 335–340, 2009.

RILEY, E. G. *et al.* American beetles: Polyphaga: Scarabaeoidea through Curculionoidea. **CRC Press**, v. 2, p. 617–691, 2002.

RITCEY, G. M.; MCLVER, S. B. External morphology of antennal sensilla of four species of adult flea beetles (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae). **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 19, p. 141-153, 1990.

ROMERO-NAPOLES, J.; AYERS, T. J.; JOHNSON, C. D. Cladistics, bruchids and host plants. Evolutionary interactions in *Amblycerus* (Coleoptera: Bruchidae). **Acta Zoologica Mexicana**, v. 86, p. 1-15, 2002.

ROSSETTO, C.J. Sugestões para armazenamento de grãos no Brasil. **O Agrônomo**, v. 18, p. 38-51, 1966.

RUPESH R. *et al.* Inbreeding in horsenettle (*Solanum carolinense*) alters night-time volatile emissions that guide oviposition by *Manduca sexta* moths. **Royal Society**, v. 280, 2013.

SAID, I. *et al.* Structure and function of the antennal sensilla of the palm weevil *Rhynchophorus palmarum*. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 49, p. 857-872, 2003.

SANTOS, G. P. *et al.* Danos em sementes de *Cassia ferruginea* causados por *Zabrotes interstitialis*, *Pygiopachymerus lineola* (Coleoptera: Bruchidae) e um Lepidoptera (Pyralidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, n. 2, p. 311-316, 1994.

SATO, K.; TOUHARA, K. Insect olfaction: receptors, signal transduction, and behavior. **Results and Problems in Cell Differentiation**, v. 47, p. 121-138, 2009.

SCHEIRS, J.; DE BRUYN, L.; VERHAGEN, R. Host nutritive quality and host plant choice in two grass miners: primary roles for primary compounds. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, p. 1349-1365, 2003.

SCHNEIDER, D. Insect antennae. **Annual Review of Entomology**, v. 9, p. 103-122, 1964.

SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. **Insect-Plant Biology**. Oxford: Oxford University Press, 2005.

SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. **Insect-Plant Biology**. Ed. Oxford: Wageningen University - Laboratory of Entomology, 2007. 421p.

SEADA, M. A. Antennal morphology and sensillum distribution off male cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). **The Journal of Basic and Applied Zoology**, v. 68, p. 10-18, 2015.

SEADA, M. A.; HAMZA, A. M. Differential morphology of the sensory sensilla of antennae, palpi, foretarsi and ovipositor of adult *Tribolium castaneum* (herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Annals of Agricultural Sciences**, v. 63, p. 1-8, 2018.

SHARMA, R. K. *et al.* Seasonal influence and effect of trap location on catches of pink bollworm males in sticky traps baited with hexalure. **Annals of the Entomological Society America**, v. 64, p. 102-105, 1971.

SHELLIE-DESSERT, K. C.; BLISS, F. A. Genetic improvement of food quality factors. *In*: SCHOONHOVEN, A. VAN VOYSEST, O. (ed). **Common beans: research for crop improvement**. Colombia: Ciat (Centro Internacional de Agricultura Tropical), 1991. 649-677 p.

SHIELDS, V. D. C.; HILDEBRAND, J. G. Responses of a population of antennal olfactory receptor cells in the female moth *Manduca sexta* to plant-associated volatile organic compounds. **Journal of Comparative Physiology**, v. 186, p. 1135-1151, 2001.

SHIELDS, V. D. C. Ultrastructure of the uniporous sensilla on the galea of larval *Mamestra configurata* (WALKER) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE). **Journal of Zoology**, v. 72, p. 2016-2031, 2011.

SHOREY, H. H. **Environmental and physiological control of insect sex pheromone behaviour**. Flórida: American Elsevier, 1974. 62-80 p.

SIDERHURST, M. S.; JANG, E. B. Cucumber volatile blend attractive to female melon fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett). **Journal of Chemical Research**, v. 36, p. 699-708, 2010.

SIEMENS, D. H.; JOHNSON, C. D.; WOODMAN, R. L. Determinants of host range in Bruchidae. **Ecology**, v. 72, n. 5, p. 1560-1566, 1991.

SILVA, M. S. **Estudo do comportamento reprodutivo e olfativo de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) e identificação dos constituintes químicos presentes nos extratos de machos e fêmeas dessa espécie**. Maceió: Universidade Federal de Alagoas – Instituto de Química e Biotecnologia, 2005. 93f.

SINGER, M. C. **The definition and measurement of oviposition preference in plant feeding insects and insect-plant interactions**. MILLER, J. R.; MILLER, T. A. (ed.). Nova York: Spring-Verlag, 1986.

SINGH, T., KAUR, I.; SAINI, M. Biology of *Zabrotes subfasciatus* Boh (Bruchidae Coleoptera). **Entomon**, v. 4, p. 201-203, 1979.

SLANSKY, F. JR.; RODRIGUES, J. G. **Nutritional ecology of insects, mites, spiders and related invertebrates**. New York: John Wiley and Sons, 1987. 1016p.

SOARES, M. A. *et al.* Effect of temperature on the development and feeding behavior of *Acanthoscelides obtectus* (Chrysomelidae: Bruchinae) on dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Stored Products Research**, v. 66, p. 1-7, 2014.

SONENSHINE, D. E. Pheromones and other semiochemicals of Acari. **Entomology Review**, v. 30, p. 1-28, 1985.

SOUTHGATE, B. J. **The importance of the Bruchidae at pest of legumes, their distribution and control pest of grain legumes: ecology and control**. London e Nova York: Academic Press, 1978. 219-229 p.

SOUTHGATE, B. J. Biology of the Bruchidae. **Entomology Review**, v. 24, p. 349-473, 1979.

SOUZA, V.; BARCHUK, A.R.; TEIXEIRA. Seleção de diferentes sementes hospedeiras por fêmeas *Zabrotes subfasciatus* (boh.) (coleoptera: chrysomelidae, bruchinae) e danos na germinação e desenvolvimento pós-predação. 10ª Jornada Científica e Tecnológica e 7º Simpósio da Pós-Graduação do IFSULDEMINAS, 2018.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.

SOSULSKI, F. W.; DABROWSKI, K. J. J. Composition of free and hydrolyzable phenolic acids in defatted flours of ten oilseeds. **Journal of Agriculture and Food Chemical**, v. 32, p. 131, 1984.

SPERANDIO, L. A. A.; ZUCOLOTO, F. S. Oviposition behavior of *Zabrotes subfasciatus* females (Coleoptera, Bruchidae) under conditions of host deprivation. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 94, n. 3, p. 315-319, 2004.

STÄDLER, E.; BAUR, R.; DE JONG, R. Sensory basis of hostplant selection: in search of the 'fingerprints' related to oviposition of the cabbage root fly. **Acta Zoologica Academia Scientiarum Hungarica**, v. 48, p. 237-252, 2002.

STEELE, D. H. *et al.* Determination of styrene in selected foods. **Journal of Agriculture and Food Chemical**, v. 42, p. 1661-1665, 1994.

STEINBRECHT, R. A. Chemo-, hygro-, and thermoreceptors. *In*: BEREITER-HAHN, J.; MATOLTSY, A. G.; RICHARDS, K. S. (ed.), **Biology of the integument**. Berlin Heidelberg: Springer, 1984. 523 – 553 p.

STEINBRECHT, R. A. Functional morphology of pheromone-sensitive sensilla. *In*: PRESTWICH, G. D.; BLOMQUIST, G. J. (ed.), **Pheromone biochemistry**. New York: Academic Press, 1987. 353 – 384 p.

STEINBRECHT, R. A. Pore structures in insect olfactory sensilla: A review of data and concepts. **International Journal of Insect Morphology and Embryology**, v. 26, p. 229–245, 1997.

STEINBRECHT, R. A. Bimodal thermo-and hygrosensitive sensilla. **Microscopic Anatomy of Invertebrates**, v. 11, p. 405–422, 1998.

STEINBRECHT, R. A.; GNATZY, W. Pheromone receptors in *Bombyx mori* and *Antheraea pernyi*. **Cell Tissue and Research**, v. 235, p. 25–34, 1984.

STORK, N.E. How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth? **Annual Review of Entomology**, v. 63, p. 31-45, 2018.

SZENTESI, Á. The effect of the amputation of head appendages on the oviposition of the bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* say (COLEOPTERA: BRUCHIDAE). **Symposium of the Society for Developmental Biology**, v. 16, p. 275-281, 1976.

SZENTESI, Á. Resource assessment and clutch size in the bean weevil, *Acanthoscelides obtectus*. **Pest Management Science**, v. 59, p. 431-436, 2003.

TANAKA, Y. *et al.* Copulation release pheromone erectin, from the azuki bean weevil *Callosobruchus chinensis* L., **Pest Management Science**, v.6, p. 75-82, 1981.

TANG, Q. B. *et al.* Central projections of gustatory receptor neurons in the medial and the lateral sensilla styloconica of *Helicoverpa armigera* larvae. **Plos One**, v. 9, e95401, 2014.

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

TEIXEIRA, I. R.V.; BARCHUK, A. R.; ZUCOLOTO, F. S. Host preference of the bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. **Insect Science**, v. 15, p. 335-341, 2008.

TEIXEIRA, I. R.V.; GRIS, C. F. **Genetic diversity of grains, storage pests and their effects on the worldwide bean supply.** *Beans: Nutrition, Consumption and Health* (ed. POPESCU, E.; GOLUBEV, I.). Hauppauge: Nova Science Publishers, 2011.

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

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

TEIXEIRA I. R. V.; BEIJO L. A.; BARCHUK A. R. Behavioral and physiological responses of the bean weevil *Zabrotes subfasciatus* to intraspecific competition. **Journal of Stored Products Research**, v. 69, p. 51-57, 2016.

THOMAZINI, M. J.; GONÇALVES, R. C.; OLIVEIRA, L. C. A comunicação química entre os insetos: obtenção e utilização de feromônios no manejo de pragas. **Embrapa Acre**, v. 17, p. 338-354, 2009.

TNO. Natural occurrence and routes of formation of styrene in foods. Zeist, Netherlands: TNO Report, B92.084, 1992.

TROUVELOT, L. The use of antennae in Insects. **The American Naturalist**, v. 11, n. 4, p. 193-196, 1877.

URBANEK, A.; TUSZCZEK, D.; KAPUSTA, M. Antennal and mouthpart sensilla of *Acanthoscelides obtectus* say (COLEOPTERA: BRUCHIDAE). **Microscope Research and Technique**, v. 79, p. 1230-1235, 2016.

VAN LENTEREN, J. C. Contact – chemoreceptors on the ovipositor of *Pseudeucoila bochei* Weld (Cynipidae). **Netherlands Journal of Zoology**, v. 22, n. 3, p. 347-350, 1972.

VAN LENTEREN, J. C. *et al.* Structure and electrophysiological responses of gustatory organs on the ovipositor of the parasitoid *Leptopilina heterotoma*. **Arthropod Structure and Development**, v. 36, p. 271-276, 2007.

VALENCIA G. *et al.* **Main insect pests of stored beans and their control**. Colômbia: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1986.

VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. M. C. Introdução aos semioquímicos e terminologia. *In*: VILELA, E. F.; DELLA LUCIA, T. (ed.). **Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas**. 2. ed. Ribeirão Preto: Holos, 2001a. 9-12 p.

VINCENT, C.; STEWART, R.K. Effect of allyl isothiocyanate on field behavior of crucifer-feeding flea beetles (Coleoptera: chrysomelidae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 10, p. 33-39, 1984.

WALGENBACH, C. A. *et al.* Laboratory trapping studies with *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 80, p. 763-767, 1987.

WASOWICZ, E.; KANINSKI, E. Volatile components of sound and musty wheat grains. **Institute of Food Technology**, v. 11, p. 161-168, 1988.

WEBSTER, B. *et al.* Volatiles functioning as host cues in a blend become nonhost cues when presented alone to the black bean aphid. **Animal Behaviour** v. 79, p. 451-457, 2010.

WICHER, D. "Olfactory signaling in insects". *In*: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, GLATZ, R. (ed.). Cambridge: Academic Press, 2015. 37-54 p.

WILKINS, C. K.; SCHOLL, S. Volatile metabolites of some barley storage molds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 8, p. 11-17, 1989.

WITZGALL, P. *et al.* Sex pheromones of *Spilonota ocellana* and *Spilonota laricana*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 60, p. 219-223, 1991.

WOOD, J. A., GRUSAK, M. A. Nutritional value of chickpea. *In*: YADAV, S. S.; REDDEN, R. J.; CHEN, W.; SHARMA, B. (ed.), **Chickpea Breeding and Management**. Inglaterra: CABI, v. 97, p. 101-142, 2007.

WOOD S. L. R. *et al.* Distilling the role of ecosystem services in the Sustainable Development Goals. **Ecosystem Services**, v. 29, p. 70-82, 2018.

YADAV, P.; BORGES, R. M. The insect ovipositor as a volatile sensor within a closed microcosm. The Company of Biologists. **Journal of Experimental Biology**, v. 220, p. 1554-1557, 2017.

YAMAMOTO, R. T.; FRAENKEL, G. S. The specificity of the tobacco hornworm, *Protoparce sexta*, to solanaceous plants. *In*: ENGELMANN, F. (1970). **The Physiology of insect reproduction**. Oxford: Pergamon Press, v. 53, p. 503-507, 1960.

YANG, Z. *et al.* Host plant volatiles synergize response to sex pheromone in codling moth, *Cydia pomonella*. **Journal of Chemical Ecology**. v. 30, p. 619-629, 2004.

YOKOYAMA, M. Pragas. *In*: Feijão. Vieira, C.; Paula Júnior T. J.; BORÉM, A. (ed). Viçosa: **Universidade Federal de Viçosa**, v. 12, p. 341-357, 2006.

ZACHARUK, R. Y. Ultrastructure and function of insect chemosensilla. **Annual Review of Entomology**, v. 25, p. 27 – 47, 1980.

ZACHARUK, R. Y. Antennae and sensilla. *In*: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. A. (ed). **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. Inglaterra: Pergamon Press, 1985. 1-69 p.

ZARBIN, P. H. G. Extração, isolamento e identificação de substâncias voláteis de insetos. *In*: VILELA, E. F., DELLA LUCIA, T. M. C. **Feromônios de insetos: biologia química e emprego no manejo de pragas**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 147-150 p.

ZHANG, Q. H.; SCHLYTER, F.; ANDERSON, P. Green leaf volatiles interrupt pheromone response of spruce bark beetle, *Ips typographus*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, p. 2847–2861, 1999.

ZHANG, F. P. *et al.* Multiple functions of volatiles in flowers and leaves of *Elsholtzia rugulosa* (Lamiaceae) from Southwestern China. **Scientific Reports**, v. 6, p. 27616, 2016.

ZHAO, S. H., *et al.* **Food Chemistry** v. 114, p. 869, 2009.

Tabela 1 - Valores estatísticos referentes aos gráficos da FIGURA 8.

ARENAS Múltiplas Simultâneas					
Grãos “in natura” – número de Fêmeas					
p=0.0158 (*) / KWs=12.22					
	Controle	Feijão	Grão de bico	Lentilha	Soja
\bar{x} =	1.400	3.100	0.7000	2.000	2.200
SD=	1.265	1.663	0.7888	1.333	2.251
SEM =	0.4000	0.5260	0.2494	0.4216	0.7118
Grãos “in natura” – número de Machos					
p=0.1109 (ns) / KWs=7.51					
	Controle	Feijão	Grão de bico	Lentilha	Soja
\bar{x} =	4.100	5.600	2.800	6.100	5.400
SD=	3.725	2.914	1.932	3.814	2.459
SEM =	1.178	0.9214	0.6110	1.206	0.777

Fonte: Do autor (2020).

Legenda: Tabela de valores estatísticos referentes aos gráficos da FIGURA 8, com descrição da significância (p), média (\bar{x}), desvio padrão (SD), erro (SEM) e valor estatístico Kruskal-Wallis (KW). Cálculos realizados através do GraphPad Prism 5.0 – Kruskal-Wallis / Dunns – comparação entre todas as colunas (p<0.05).

Tabela 2 - Valores estatísticos referentes aos gráficos da FIGURAS 10 e 11.

ARENAS Múltiplas Pareadas (número de Fêmeas)				
Gráfico	p	\bar{x}	SD	SEM
A (Fig. 10)	< 0.0001 (***) KWs= 22.34	CTRL= 2.200 Fj= 22.50 PC= 4.700	CTRL= 1.932 Fj= 3.894 PC= 2.111	CTRL= 0.6110 Fj= 1.232 PC= 0.6675
B (Fig. 10)	< 0.0001 (***) KWs= 20.31	CTRL= 5.600 Sj= 21.50 PC= 2.900	CTRL= 4.142 Sj= 5.191 PC= 2.025	CTRL= 1.310 Sj= 1.641 PC= 0.6403
C (Fig. 10)	< 0.0001 (***) KWs= 22.90	CTRL= 3.400 GB= 20.10 PC= 6.200	CTRL= 2.171 GB= 4.122 PC= 2.098	CTRL= 0.6864 GB= 1.303 PC= 0.6633
D (Fig. 10)	< 0.0001 (***) KWs= 19.23	CTRL= 6.200 Lt= 17.40 PC= 7.400	CTRL= 3.011 Lt= 3.718 PC= 3.098	CTRL= 0.9522 Lt= 1.176 PC= 0.9798
E (Fig. 10)	0.0039 KWs= 13.36	Fj= 2.921 Sj= 0.6220 GB= 1.910 Lt= 1.246	Fj= 2.631 Sj= 0.5537 GB= 0.9838 Lt= 0.8921	Fj= 0.8769 Sj= 0.1751 GB= 0.3279 Lt= 0.2821
A (Fig. 11)	0.2861 (ns)	Fj= 12.40 Sj= 10.80	Fj= 3.273 Sj= 2.860	Fj= 1.035 Sj= 0.9043
B (Fig. 11)	0.0252 (*)	Fj= 15.00 GB= 10.40	Fj= 3.916 GB= 4.142	Fj= 1.238 GB= 1.310
C (Fig. 11)	0.0024 (**)	Fj= 15.20 Lt= 9.100	Fj= 2.821 Lt= 3.635	Fj= 0.8919 Lt= 1.149
D (Fig. 11)	0.0280 (*)	Sj= 13.20 GB= 9.200	Sj= 4.467 GB= 3.293	Sj= 1.413 GB= 1.041
E (Fig. 11)	0.0002 (***)	Sj= 19.80 Lt= 6.400	Sj= 3.293 Lt= 3.340	Sj= 1.041 Lt= 1.056
F (Fig. 11)	0.0072 (**)	GB= 15.00 Lt= 8.700	GB= 4.295 Lt= 3.653	GB= 1.358 Lt= 1.155

Tabela de valores estatísticos referentes aos gráficos das FIGURAS 10 e 11, com descrição da significância (p), média (\bar{x}), desvio padrão (SD), erro (SEM) e valor estatístico Kruskal-Wallis (KWs). **Fj:** Feijão; **GB:** Grão de bico; **Lt:** Lentilha; **Sj:** Soja, **CTRL:** Controle e **PC:** Placa Central (escolha não realizada). Cálculos realizados através do GraphPad Prism 5.0 – Kruskal-Wallis / Dunns – comparação entre todas as colunas (p<0.05) para os gráficos A-E e Teste t seguido por Mann-Whitney test p<0.05) para os gráficos F-K.

Tabela 3 - Valores estatísticos referentes aos gráficos da FIGURA 12.

ARENAS Múltiplas Pareadas (número de Machos)				
Gráfico	p	\bar{x}	SD	SEM
A	0.0001 (***) KWs=19.16	CTRL= 4.900 Fj= 19.60 PC=5.500	CTRL= 2.998 Fj= 3.748 PC=3.629	CTRL= 0.9481 Fj= 1.185 PC=1.147
B	0.0001 (***) KWs=19.65	CTRL= 5.500 GB= 19.30 PC=5.200	CTRL= 1.581 GB= 4.084 PC=3.425	CTRL= 0.5000 GB= 1.291 PC=1.083
C	0.1804 (ns)	Fj= 13.60 GB= 12.10	Fj= 2.875 GB= 2.378	Fj= 0.9092 GB= 0.7520

Tabela de valores estatísticos referentes aos gráficos da FIGURA 12, com descrição da significância (p), média (\bar{x}), desvio padrão (SD) e erro (SEM). **Fj**: Feijão; **GB**: Grão de bico e **CTRL**: Controle. Cálculos realizados através do GraphPad Prism 5.0 – Column Analyses - Column statistics. Teste t seguido por Mann-Whitney test (p<005).

Tabela 4 - Valores estatísticos referentes aos gráficos da FIGURA 13.

ARENAS “Partes dos Grãos” (número de Fêmeas)					
Feijão					
p=0.0071 (**) / KWs=14.05					
	Polpa	Casca	Grão inteiro úmido	Grão inteiro “in natura”	Controle
\bar{x} =	5,300	6,900	6,300	4,100	3,100
SD=	3,199	2,601	1,252	2,470	1,912
SEM =	1,012	0,822	0,395	0,781	0,604
Grão de Bico					
p=0.4421 (ns) / KWs=3.74					
	Polpa	Casca	Grão inteiro úmido	Grão inteiro “in natura”	Controle
\bar{x} =	2,600	5,200	4,200	4,500	2,800
SD=	2,011	4,417	3,048	3,923	2,658
SEM =	0,636	1,397	0,963	1,241	0,840
Lentilha					
p=0.1751 (ns) / KWs=6.34					
	Polpa	Casca	Grão inteiro úmido	Grão inteiro “in natura”	Controle
\bar{x} =	6,300	6,800	5,700	6,600	3,800
SD=	3,020	2,486	2,497	3,596	3,011
SEM =	0,955	0,7860	0,789	1,137	0,952
Soja					
p=0.0313 (*) / KWs=10.61					
	Polpa	Casca	Grão inteiro úmido	Grão inteiro “in natura”	Controle
\bar{x} =	7,400	5,800	5,500	3,300	2,100
SD=	4,377	3,967	4,601	3,093	2,558
SEM =	1,384	1,254	1,455	0,978	0,809

Tabela de valores estatísticos referentes aos gráficos da FIGURA 13, com descrição da significância (p), média (\bar{x}), desvio padrão (SD), erro (SEM) e valor estatístico Kruskal-Wallis (KW). Cálculos realizados através do GraphPad Prism 5.0 – Kruskal-Wallis / Dunns – comparação entre todas as colunas (P<0.05).

Tabela 5 - Valores estatísticos referentes aos gráficos da FIGURA 16 (Parte 1).

ARENAS - Retirada das Antenas – Controle vs Feijão				
Número de carunchos que fez escolha				
	Valor de p	Controle	Feijão	Placa Central
A	<0.0001 (***) KWs=23.14	\bar{x} = 7.000 SD= 2.211 SEM= 0.6992	\bar{x} = 18.70 SD= 4.029 SEM= 1.274	\bar{x} = 3.400 SD= 2.171 SEM= 0.6864
B	<0.0001 (***) KWs=19.76	\bar{x} = 5.400 SD= 2.951 SEM= 0.9333	\bar{x} = 20.10 SD= 4.654 SEM= 1.472	\bar{x} = 4.500 SD= 3.504 SEM= 1.108
C	<0.0001 (***) KWs=20.08	\bar{x} = 5.500 SD= 1.841 SEM= 0.5821	\bar{x} = 19.80 SD= 3.584 SEM= 1.133	\bar{x} = 4.700 SD= 4.084 SEM= 1.291
D	=0.7283 (ns) KWs=0.6339	\bar{x} = 10.50 SD= 5.359 SEM= 1.695	\bar{x} = 8.600 SD= 3.307 SEM= 1.046	\bar{x} = 10.70 SD= 7.150 SEM= 2.261
I	=0.0011 (**) KWs=13.62	\bar{x} = 5.000 SD= 2.404 SEM= 0.7601	\bar{x} = 16.90 SD= 6.244 SEM= 1.975	\bar{x} = 8.000 SD= 6.236 SEM= 1.972
J	=0.0108 (*) KWs=9.059	\bar{x} = 6.000 SD= 2.582 SEM= 0.8165	\bar{x} = 15.20 SD= 6.579 SEM= 2.081	\bar{x} = 8.800 SD= 5.287 SEM= 1.672
K	=0.0002 (***) KWs=16.84	\bar{x} = 4.100 SD= 1.729 SEM= 0.5467	\bar{x} = 15.90 SD= 5.446 SEM= 1.722	\bar{x} = 10.00 SD= 5.944 SEM= 1.880
L	=0.1680 (ns) KWs=3.567	\bar{x} = 8.800 SD= 5.554 SEM= 1.756	\bar{x} = 8.400 SD= 2.633 SEM= 0.8327	\bar{x} = 12.80 SD= 5.633 SEM= 1.781

Tabela de valores estatísticos referentes aos gráficos da FIGURA 16, com descrição da significância (p), média (\bar{x}), desvio padrão (SD), erro (SEM) e valor estatístico Kruskal-Wallis (KWs). Cálculos realizados através do GraphPad Prism 5.0 – Kruskal-Wallis / Dunns – comparação entre todas as colunas (p<0.05).

Tabela 6 - Valores estatísticos referentes aos gráficos da FIGURA 16 (Parte 2).

ARENAS - Retirada das Antenas – Feijão vs Grão de Bico				
Número de carunchos que fez escolha				
	Valor de p	Feijão	Grão de bico	Placa Central
E	<0.0001 (***) KWs=23.21	\bar{x} = 18.70 SD= 4.523 SEM= 1.430	\bar{x} = 8.400 SD= 3.502 SEM= 1.108	\bar{x} = 2.900 SD= 2.079 SEM= 0.6574
F	<0.0001 (***) KWs=22.79	\bar{x} = 19.70 SD= 3.093 SEM= 0.9781	\bar{x} = 7.000 SD= 2.828 SEM= 0.8944	\bar{x} = 3.300 SD= 1.567 SEM= 0.4955
G	<0.0001 (***) KWs=19.67	\bar{x} = 17.60 SD= 4.169 SEM= 1.318	\bar{x} = 7.800 SD= 3.521 SEM= 1.114	\bar{x} = 4.700 SD= 4.057 SEM= 1.283
H	=0.7667 (ns) KWs=0.5314	\bar{x} = 9.100 SD= 3.348 SEM= 1.059	\bar{x} = 10.60 SD= 4.195 SEM= 1.327	\bar{x} = 10.20 SD= 6.512 SEM= 2.059
M	=0.0015 (**) KWs=13.01	\bar{x} = 12.10 SD= 4.725 SEM= 1.494	\bar{x} = 12.70 SD= 4.832 SEM= 1.528	\bar{x} = 5.200 SD= 3.225 SEM= 1.020
N	=0.0009 (***) KWs=14.02	\bar{x} = 11.70 SD= 3.335 SEM= 1.055	\bar{x} = 12.40 SD= 3.098 SEM= 0.9798	\bar{x} = 5.700 SD= 3.529 SEM= 1.116
O	=0.8374 (ns) KWs=0.3550	\bar{x} = 10.40 SD= 4.274 SEM= 1.352	\bar{x} = 9.200 SD= 3.259 SEM= 1.031	\bar{x} = 10.40 SD= 3.627 SEM= 1.147
P	=0.1045 (ns) KWs=4.517	\bar{x} = 7.400 SD= 4.789 SEM=1.514	\bar{x} = 10.30 SD= 4.547 SEM=1.438	\bar{x} = 12.30 SD= 5.579 SEM= 1.764

Tabela de valores estatísticos referentes aos gráficos da FIGURA 16, com descrição da significância (p), média (\bar{x}), desvio padrão (SD), erro (SEM) e valor estatístico Kruskal-Wallis (KWs). Cálculos realizados através do GraphPad Prism 5.0 – Kruskal-Wallis / Dunns – comparação entre todas as colunas (p<0.05).

Tabela 7 - Valores estatísticos referentes aos gráficos da FIGURA 19.

ARENAS com tubos de ligação medindo 7cm ou de 2cm							
Número de fêmeas que fez escolha							
Gráfico	p	\bar{x}		SD		SEM	
C (7cm)	=0.0123 (*) KWs=12.81	Controle:	2.200	Controle:	1.549	Controle:	0.489
		Soja:	4.100	Soja:	2.283	Soja:	0.721
		Grão de Bico:	6.800	Grão de Bico:	3.048	Grão de Bico:	0.963
		Lentilha:	5.800	Lentilha:	3.736	Lentilha:	1.181
		Feijão:	5.300	Feijão:	3.368	Feijão:	1.065
D (2cm)	=0.0017 (**) KWs=17.35	Controle:	2.267	Controle:	2.052	Controle:	0.529
		Soja:	3.333	Soja:	3.155	Soja:	0.814
		Grão de Bico:	3.000	Grão de Bico:	2.563	Grão de Bico:	0.661
		Lentilha:	3.600	Lentilha:	2.230	Lentilha:	0.575
		Feijão:	6.333	Feijão:	3.773	Feijão:	0.974

Tabela de valores estatísticos referentes aos gráficos da FIGURA 19, com descrição da significância (p), média (\bar{x}), desvio padrão (SD), erro (SEM) e valor estatístico Kruskal-Wallis (KWs). Cálculos realizados através do GraphPad Prism 5.0 – Kruskal-Wallis / Dunns – comparação entre todas as colunas (p<0.05).