

JULIANA LÍVIA VIEIRA

**CARGA ENDOSSIMBIONTE E PERSONALIDADE DO CARUNCHO DO
MILHO (*Sitophilus zeamais*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

V658c
2017
Vieira, Juliana LÍvia, 1992-
Carga endossimbionte e personalidade do caruncho do
milho (*Sitophilus zeamais*) / Juliana LÍvia Vieira. – Viçosa, MG,
2017.
vi, 31f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Sitophilus. 2. Milho - Doenças e pragas. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de
Pós-graduação em Entomologia. II. Título.


CDD 22 ed. 632.76

JULIANA LÍVIA VIEIRA


**CARGA ENDOSSIMBIONTE E PERSONALIDADE DO CARUNCHO
DO MILHO (*Sitophilus zeamais*)**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Entomologia, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 23 de fevereiro de 2017.


Gislaine Aparecida Carvalho


Terezinha Maria Castro Della Lucia


Raul Narciso Carvalho Guedes
(Orientador)

Aos meus pais e meu irmão,
Pelo amor e apoio incondicionais,
Dedico.

AGRADECIMENTO

A Deus, minha luz, caminho e verdade, que me abençoa com sonhos sempre munidos de determinação e esperança, e que diariamente se faz presente nos gestos mais singelos de amor;

A Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pelo curso de excelência, bem como, pela formação diferenciada;

Ao CNPq pela concessão da bolsa e as demais agências financiadoras, Capes e FAPEMIG, pelo aporte financeiro que viabilizou a execução deste projeto;

Ao querido amigo e orientador, Prof. Dr. Raul Narciso C. Guedes, por estes quase seis anos de trabalho, aprendizado e oportunidades, por acreditar sempre em mim e por me fornecer de inspiração;

Ao laboratório de Ecotoxicologia de Inseticidas e Ecofisiologia de Insetos e ao “Team Raul” por todos os momentos compartilhados e amizade, em especial, a Alice, amiga, conselheira e confidente;

Ao laboratório de Biologia Molecular e Filogeografia e ao laboratório de Infectologia Molecular Animal por todo o suporte, confiança e amizade;

Aos colegas que me auxiliaram mais diretamente na execução deste projeto, com paciência e conhecimento, Dr. Khalid Haddi, Me. Jefferson Marthe e principalmente, Dr. Gislaíne Carvalho, pela coorientação;

Aos amigos da entomologia, em especial a turma 2015 que marcou história no terraço, reis do drama nas horas sofridas de estudo e a maior comissão organizadora de churrasco que você respeita;

Aos queridos amigos de Viçosa, a família que escolhi, em especial a Jeito Carinhoso que se tornou Axé Blond, a Morto Muito Louco e aos maiores companheiros e confidentes dos últimos tempos, Mayara, Marcella e Thiago;

Aos meus familiares pelo apoio e carinho, em destaque ao meu irmão caçula, o melhor amigo que a vida me deu, Juninho;

E principalmente, aos meus pais, Josué e Fátima, exemplos de sabedoria e humildade, amor e altruísmo, por nunca terem cerceado meus sonhos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. JUSTIFICATIVA.....	4
3. OBJETIVOS.....	4
4. HIPÓTESES.....	5
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
5.1. Aquisição dos insetos.....	6
5.2. Bioensaios comportamentais.....	6
5.3. Inativação dos endossimbiontes.....	8
5.4. Fertilidade.....	9
5.5. Quantificação dos endossimbiontes por qPCR.....	9
5.5. Análises estatísticas.....	10
6. RESULTADOS.....	11
6.1. Médias comportamentais e da carga endossimbionte.....	11
6.2. Consistência transgeracional.....	11
6.3. Comportamento multidimensional individual.....	12
6.4. Implicações na fertilidade.....	13
7. DISCUSSÃO.....	13
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
9. ANEXO.....	23

RESUMO

VIEIRA, Juliana Livia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Carga endossimbionte e personalidade do caruncho do milho (*Sitophilus zeamais*)**. Orientador: Raul Narciso Carvalho Guedes.

O conjunto integrado de tendências comportamentais do indivíduo, ou sua personalidade, é potencialmente influenciado por contextos ecológicos como a presença de endossimbiontes. Tal associação e interdependência foram supostamente selecionadas ao acaso por meio de compensações ecológicas com custos e benefícios díspares. Apesar de sua relevância, o tema tem sido negligenciado em espécies de insetos-praga, como o gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). Assim o objetivo deste estudo foi avaliar a personalidade em indivíduos de *S. zeamais* sob diferentes cargas dos endossimbiontes *Sodalis pierantonius* (ou SPE “*Sitophilus Primary Endosymbiont*”) e *Wolbachia*, correlacionando os traços de personalidade do gorgulho com seu desempenho reprodutivo. Para isso, fêmeas individualizadas com idade padronizada foram submetidas a bioensaios comportamentais antes e após a administração oral dos antibióticos ciprofloxacino e tetraciclina (5µl, 25 mg/ml). A progênie de cada fêmea foi obtida e submetida individualmente aos mesmos bioensaios após três dias de emergência. Em seguida foi realizada a extração de DNA de cada indivíduo e posteriormente a carga endossimbionte foi quantificada através de PCR em tempo real (qPCR). Independente do antibiótico utilizado, a personalidade das progenitoras foi mantida após a supressão endossimbionte ($P < 0,001$), no entanto, não foi carregada à próxima geração ($P = 0,41$). Somente a redução da carga do endossimbionte *S. pierantonius* foi herdada pela progênie ($P = 0,02$). Além disso, somente a personalidade contribuiu na determinação da fertilidade ($P < 0,001$).

ABSTRACT

VIEIRA, Juliana Livia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017.
Endosymbiont load and personality in the maize weevil (*Sitophilus zeamais*).
Adviser: Raul Narciso Carvalho Guedes.

The integrated set of behavioral tendencies of the individual, or its personality, is potentially influenced by ecological contexts such as the presence of endosymbionts. Such association and interdependence were likely selected randomly through ecological compensations with disparate costs and benefits. Despite its relevance, the subject has so far been neglected in insect pest species such as the maize weevil *Sitophilus zeamais*. Therefore, the objective of this study was to evaluate the personality in individuals of *S. zeamais* under different loads of the endosymbionts *Sodalis pierantonius* (or SPE “*Sitophilus Primary Endosymbiont*”) and *Wolbachia*, correlating the weevil personality traits with reproductive performance. Thus, individualized females with standardized age were subjected to behavioral bioassays before and after oral administration of the antibiotics ciprofloxacin and tetracycline (5µl, 25 mg/ml). The progeny of each female was obtained and individually subjected to the same bioassays three days after emergence. Finally, DNA was extracted from each individual and the endosymbiont load was quantified using quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Regardless the antibiotic used, the personality of the progenitors was maintained after endosymbiont suppression ($P < 0.001$). However, the personality traits were not carried to the next generation ($P = 0.41$). Only the reduction of the endosymbiont *S. pierantonius* was inherited by the progeny ($P = 0.02$). In addition, just personality contributed to the insect fertility ($P < 0.001$).

1. INTRODUÇÃO

Fenômenos ecológicos e padrões de organização de comunidades podem ser vistos como consequências contíguas de comportamentos e ações individuais (Real, 1994). Comportamentos distintos manifestados pelos indivíduos, em resposta a diferentes contextos ou situações, embasam assim, a importância da definição de personalidade animal.

A personalidade animal é o conjunto de tendências comportamentais apresentadas por componentes de uma população (Uher, 2011). Este conceito é mais comum à psicologia em relação à biologia animal; nesta última área a personalidade é frequentemente tratada como sinonímia de síndrome comportamental (Reále *et al.*, 2007; Uher, 2011). Entretanto, a síndrome comportamental diferencia-se por ser relacionada às consistências ou correlações entre comportamentos funcionalmente distintos ao longo do tempo e/ou de contextos ecológicos (Sih *et al.*, 2004ab e 2012; Sih & Bell, 2008).

As respostas comportamentais como atividade, ousadia/timidez e exploração/evasão são tidas como tipos comportamentais ‘clássicos’ (Reále *et al.*, 2007) que, em conjunto com a história de vida do indivíduo influenciam sua produtividade, incluindo crescimento e reprodução (Biro & Stamps 2008). Assim, o desenvolvimento da personalidade pode ser tomado como resultado de informações genóticas do indivíduo, do ambiente em que reside e da interação existente entre ambos. Neste sentido, a ocorrência de alterações expressivas em sua ontogenia podem comprometer a consistência de determinadas características comportamentais, extrapoladas ou não a níveis de população e comunidade (Eisele & Meyhöfer, 2015; Modlmeier *et al.*, 2015). Por esta razão, o estudo da personalidade em insetos holometábolos suscita questionamentos acerca da manutenção de traços comportamentais ao longo de seu desenvolvimento, demonstrado em populações de *Eriopsis conexa* por Rodrigues *et al.* (2016), bem como, a herdabilidade destes traços às gerações subsequentes.

Além destes traços individuais que variam entre e dentro das populações, bactérias endossimbiontes podem modificar respostas fisiológicas e comportamentais, desencadeando inclusive efeitos na fertilidade (Carvalho *et al.*, 2014b). Essas bactérias intracelulares podem desempenhar não só relações simbióticas facultativas, como também de mútua dependência, ou obrigatórias (Nardon *et al.*, 2002; Chiel *et al.*, 2009). Além disso, são amplamente difundidas entre os artrópodes e estima-se que 70% dos

componentes da classe Insecta, a mais diversa dentre os animais, apresenta algum tipo de bactéria endossimbionte (Kageyama *et al.*, 2010; Saridaki & Bourtzis, 2009). Essa proporção está relacionada ao fato de muitos insetos apresentarem dietas restritivas, como o caso de sugadores de seiva, hematófagos e xilófagos, dependendo assim, de endossimbiontes obrigatórios para o fornecimento de nutrientes essenciais ou na quebra do alimento (Buchner, 1965; Douglas, 1998; Bourtzis & Miller, 2003; Moran, 2007). Além dessas relações obrigatórias, estima-se que a bactéria facultativa *Wolbachia* está presente em cerca de 40% das espécies de insetos, modificando sua reprodução de diversas formas (Wernegreen, 2002; Zug & Hammerstein, 2012).

Neste sentido, a presença de endossimbionte obrigatório e facultativo nas três espécies de carunchos de grãos do gênero *Sitophilus*, e a demonstrada variação nos traços comportamentais individuais no gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, 1855 (Coleoptera: Curculionidae), tornam esta espécie, segundo Carvalho *et al.* (2014b), modelo interessante para o estudo de simbiontes coexistentes e sua possível relevância nas estratégias que visam o controle de pragas (Wicker, 1983; Heddi *et al.*, 1999; Heddi, Charles & Khatchadourian, 2001; Bourtzis, 2008; Saridaki & Bourtzis, 2009ab; Mansour, 1930; Morales *et al.*, 2013).

Nas associações endossimbióticas obrigatórias, as intrincadas filogenias das espécies envolvidas geralmente refletem a transmissão vertical da carga bacteriana, ou seja, de mãe para filho (Toju *et al.*, 2013). A localização do endossimbionte primário (ou obrigatório) *Sodalis pierantonius* (ou SPE “*Sitophilus Primary Endosymbiont*”) não somente em bacteriomas no intestino médio de *S. zeamais*, mas também nos ovários, além de sua transmissão para as gerações futuras através de ovócitos durante a ovogênese (Nardon, 2006), corroboram esta ideia. Assim, a herdabilidade da carga endossimbionte e a coespeciação, foram pressões fundamentais na seleção estocástica do habitat e da dieta restritiva do inseto (Heddi, Charles & Khatchadourian, 2001; Mansour, 1930; Nardon & Grenier, 1988).

A interação gênica entre *S. pierantonius* e seu hospedeiro *S. zeamais*, por meio da transferência de genes, indica que o simbionte está diretamente envolvido no metabolismo deste inseto (Heddi *et al.*, 1991, 1993, 2001, 2005). Sendo o endossimbionte reconhecido pelo fornecimento de aminoácidos fenólicos (Gasnier-Fauchet & Nardon, 1987) e de vitaminas como o ácido pantotênico, riboflavina e biotina (Wicker, 1983). Além disso, *S. pierantonius* incrementa o metabolismo

energético do inseto (Heddi *et al.*, 1993; Carvalho *et al.*, 2014b) e estabelece uma intrincada dependência no suprimento dos aminoácidos tirosina e fenilalanina, precursores na síntese cuticular (Vigneron *et al.*, 2014).

Ao contrário da bactéria *S. pierantonius*, que apresenta uma relação de mutualismo, o endossimbionte secundário (ou facultativo), *Wolbachia*, mantém uma relação de parasitismo com *S. zeamais*. Essa bactéria é conhecida por alterar a reprodução em vários artrópodes via incompatibilidade citoplasmática (Breeuwers & Werrerr, 1990; O'Neill & Karr, 1990), partenogênese (Stouthamer *et al.*, 1993) e feminização de machos (Rigaud *et al.*, 1991).

Em decorrência da manipulação reprodutiva, a principal forma de transmissão da *Wolbachia* é por via materna e vertical (Hurst & Randerson, 2002). Entretanto, incoerências entre as filogenias do hospedeiro e do endossimbionte (Werren *et al.*, 1995), além da localização bacteriana intra e extracelular na hemolinfa (Russell & Moran, 2005; Kageyama *et al.*, 2010; Chiel *et al.*, 2009), sugeriram que a ampla distribuição dessa bactéria em artrópodes seria em decorrência da transmissão horizontal. Carvalho *et al.* (2014a) obtiveram evidências moleculares da transferência de *Wolbachia* entre o caruncho do milho (*S. zeamais*) e o caruncho do arroz (*S. oryzae*), e da transferência horizontal de *Wolbachia* e de *S. pierantonius* entre o caruncho do milho e seu parasitoide *Theocolax elegans* Westwood, 1874 (Hymenoptera: Pteromalidae). Assim, os veículos propostos para a transmissão de *Wolbachia* entre taxons incluem o parasitismo (Vavre *et al.*, 1999; Cordaux *et al.*, 2001), a predação e a interação com competidores associados (Werren, 1997; Werren *et al.*, 2008).

Uma forma de compreender a importância das associações simbióticas é através da supressão ou inativação bacteriana, já que permite a comparação entre insetos com diferentes cargas endossimbiontes. Entretanto, a variação entre os indivíduos dentro de uma população presente no gorgulho do milho (Morales *et al.*, 2013) aumenta a complexidade deste estudo. Desta forma, a respectiva inativação/supressão de *S. pierantonius* e *Wolbachia* via administração dos antibióticos ciprofloxacino e tetraciclina proposta por Carvalho *et al.* (2014b) possibilita o estudo da manutenção transgeracional da personalidade de *S. zeamais* conjuntamente com os impactos das cargas endossimbiontes na sua performance reprodutiva, segundo um modelo hierárquico estruturado.

2. JUSTIFICATIVA

O comportamento característico apresentado pelo indivíduo pode afetar seu potencial reprodutivo (Smith & Blumstein, 2008). Ou seja, indivíduos que apresentem comportamentos com limitada plasticidade, sob determinadas situações, podem ter sua capacidade reprodutiva comprometida (Jandt *et al.*, 2014). Dessa forma, o entendimento dos efeitos decorrentes da inativação/supressão dos endossimbiontes *S. pierantonius* e *Wolbachia* em *S. zeamais* conjuntamente a consistência comportamental apresentada por este hospedeiro é estratégia fundamental na compreensão da atividade endossimbionte a nível de indivíduo.

3. OBJETIVOS

Os endossimbiontes desempenham papel essencial na biologia de muitas espécies de hospedeiros. Assumindo que “nada em biologia faz sentido exceto à luz da evolução” (Dobzhansky, 1973), os diferentes padrões de personalidade e as diferentes cargas endossimbiontes podem ser entendidos como estratégias que foram selecionadas ao acaso por meio de compensações ecológicas com custos e benefícios díspares (Uher, 2011). Assim, os efeitos fenotípicos das cargas endossimbiontes em cada indivíduo devem ser aferidos por comparação entre insetos infectados com a mesma origem genética. Diante disso, os objetivos deste trabalho foram avaliar 1) se a personalidade em fêmeas de *S. zeamais* é detectável após a supressão endossimbionte; 2) como a supressão afeta a personalidade destas fêmeas; 3) se os padrões de personalidade e de carga das fêmeas incidem na progênie; e (4) como a personalidade e a carga simbiote se associam à fertilidade das fêmeas.

4. HIPÓTESES

H₀: A personalidade de *S. zeamais* não é detectável após a supressão endossimbionte.

H₁: A personalidade de *S. zeamais* é detectável após a supressão endossimbionte.

H₀: A supressão endossimbionte não afeta a personalidade de *S. zeamais*.

H₁: A supressão endossimbionte afeta a personalidade de *S. zeamais*.

H₀: Os perfis de personalidade e de carga das fêmeas de *S. zeamais* não incidem na progênie.

H₁: Os perfis de personalidade e de carga das fêmeas de *S. zeamais* incidem na progênie.

H₀: Os perfis de personalidade e de carga das fêmeas de *S. zeamais* não afetam sua fertilidade.

H₁: Os perfis de personalidade e de carga das fêmeas de *S. zeamais* afetam sua fertilidade.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Aquisição dos insetos

A população de *S. zeamais* utilizada no presente trabalho foi originalmente obtida da criação de laboratório da unidade Milho e Sorgo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA; Sete Lagoas, MG). E vem sendo mantida desde o final da década de 1980 em recipientes de vidro (1,5 L), dentro de câmaras climáticas tipo B.O.D., sob condições controladas de temperatura ($27 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa ($70 \pm 10\%$) e fotoperíodo (LD 12:12).

5.2. Bioensaios comportamentais

Individualizadas e devidamente identificadas, fêmeas de *S. zeamais* foram submetidas a seis bioensaios comportamentais antes e depois da supressão endossimbionte, ou seja, com três dias de emergência do grão e após o período de administração dos antibióticos e acasalamento, com cerca de 60 dias. A progênie obtida de cada uma destas fêmeas foi submetida aos mesmos bioensaios em dois períodos: após três e sete dias de emergência do grão. Sendo que foram avaliados de um a quatro indivíduos de progênie por fêmea, devido à alta mortalidade causada pela supressão de carga endossimbionte. Todos os bioensaios foram adaptados de Morales *et al.* (2013).

5.2.1. Caminhamento

O caminhamento de *S. zeamais* foi avaliado por dez minutos utilizando-se como arenas placas de Petri (9 cm de diâmetro) cujo fundo foi recoberto por papel filtro (Whatman nº 1), e as paredes revestidas com Teflon PTFE (DuPont, Wilmington, DE, USA). Cada inseto foi liberado individualmente no centro da arena, teve seu movimento gravado e digitalmente transferido para um computador utilizando um sistema automático de video tracking equipado com uma câmera CCD (ViewPoint Life Sciences, Montreal, Canadá). Os seguintes parâmetros foram avaliados: distância percorrida (cm), velocidade média (cm/s) e tempo de repouso (s).

5.2.2. Voo em queda livre

Nesta avaliação foi utilizada uma caixa quadrada de 44 cm de largura, 44 cm de comprimento e 132 cm de altura, fechada nas laterais com tecido organza. Em sua parte inferior foi traçado um círculo central com nove centímetros de diâmetro e a partir deste, dispostos círculos concêntricos de três centímetros de distância. Na parte superior, ao centro, foi colocado um funil cujo interior estava recoberto por talco. Cada indivíduo de *S. zeamais* foi lançado três vezes no interior desta estrutura, sendo considerada como repetição a média dos lançamentos. A distância relativa entre o centro da estrutura e o local da aterrissagem foi aferida através dos círculos concêntricos equidistantes, ou seja, somando 4,5 cm de raio do primeiro círculo aos 3 cm dos demais.

5.2.3. Endireitamento do corpo

Os insetos foram colocados sobre o dorso no interior de uma arena e o tempo utilizado para retornar a sua posição ventral foi registrado. Este procedimento foi repetido três vezes para cada indivíduo, sendo a média considerada como o tempo de endireitamento do corpo.

5.2.4. Ensaio de tanatose

Utilizando um pincel de cerdas os insetos foram pressionados dorsalmente até que atingiram a posição de tanatose característica, a qual envolve a contração das pernas e subsequente imobilização. O tempo decorrido entre este processo e o retorno do movimento no inseto foi avaliado. Este procedimento foi repetido três vezes para cada indivíduo, sendo a média considerada como o tempo do comportamento de tanatose.

5.2.5. Interação Conspecífica e Heterospecífica

O comportamento de exploração/evasão apresentado pelos indivíduos de *S. zeamais* foi avaliado através de arenas contendo um grão de milho ocupado por um indivíduo da mesma espécie ou de outra espécie (*Rhyzopertha dominica* Fabricius, 1792 (Coleoptera: Bostrichidae)). As arenas foram confeccionadas em placas de Petri de nove centímetros de diâmetro e dois centímetros de altura, com fundo recoberto por

papel milimetrado. No centro deste papel foi desenhado um círculo de um centímetro de diâmetro e neste círculo foi colocado o grão de milho ocupado por um adulto de *S. zeamais* para a interação conspecífica ou por um adulto de *R. dominica* para a interação heterospecífica. As paredes internas da placa foram recobertas com teflon visando evitar o escape dos insetos.

Cada ensaio consistiu em posicionar o inseto em um dos extremos da placa e observar o tempo este levava para atingir o grão. O ensaio era finalizado quando o indivíduo avaliado atingia o grão de milho ou quando terminava o tempo máximo de observação, ou seja, 15 minutos. Quando o inseto não se deslocou em direção ao grão foi registrado como um indivíduo sem resposta e quando se deslocou mas não o atingiu o tempo foi igual a 16 minutos, correspondente a um valor maior do que o tempo de observação.

5.3. Inativação dos endossimbiontes

A administração de antibióticos foi adotada como método de supressão de carga endossimbionte. Assim, visando maior eficiência na ingestão, fêmeas adultas foram individualmente submetidas a estresse hídrico via abstenção de alimento e exposição à ambiente com pouca umidade por 48 horas. Passado esse período, foram colocadas individualmente em placas de cultura celular de 12 poços e expostas por 15 minutos a 5 µl de solução com 25 mg/mL de antibiótico (tetraciclina ou ciprofloxacino) diluído em água destilada. Posteriormente foram alimentadas com milho por 24 horas e colocadas em estresse hídrico por mais 24 horas (Guedes *et al.*, 2015) visando a próxima administração de antibiótico. Desta forma, foram administradas cinco doses de antibiótico para cada indivíduo.

A supressão seletiva de tetraciclina sobre *Wolbachia* e de ciprofloxacino sobre *S. pierantonius* (Carvalho *et al.*, 2014b), antibióticos com diferentes modos de ação (Li *et al.*, 2014), foi determinante na escolha dos mesmos. Estes foram obtidos de Genfar (Bogotá, Colômbia) e Bristol-Myers Squibb (São Paulo, SP, Brasil) em suas formulações comerciais disponíveis (Ciprofloxacino 500 mg e Tetrex 500 mg). Além disso, a concentração utilizada em ambos os antibióticos foi obtida de Carvalho *et al.* (2014b), que definiram a curva concentração-resposta a partir da administração de soluções a: 1 mg/mL; 5 mg/mL; 10 mg/mL; 25 mg/mL; 50 mg/mL; 100 mg/mL.

5.4. Fertilidade

O experimento foi conduzido em potes plásticos contendo 50 g de grãos de milho mantidos em sala de criação, com temperatura e umidade controlada ($27 \pm 2^\circ\text{C}$ $70 \pm 5\%$). Após o tratamento com antibiótico, as fêmeas de *S. zeamais* foram mantidas no interior desses potes para acasalamento por 21 dias, segundo metodologia adaptada de Fragoso *et al.* (2005). Sendo que cada fêmea avaliada foi mantida em um pote com seu respectivo macho. A emergência diária e cumulativa da progênie foi avaliada a cada dois dias e foram contabilizadas 16 fêmeas no tratamento com ciprofloxacino e 18 com tetraciclina.

5.5. Quantificação da carga endossimbionte via qPCR

O DNA dos insetos (fêmeas tratadas com antibiótico e sua progênie, bem como fêmeas controle com idade igual a das fêmeas tratadas) foi extraído segundo protocolo modificado de Clark *et al.* (2001), após a realização de todos bioensaios comportamentais. Este material obtido foi usado nas reações de PCR em tempo real (qPCR) para estimar a carga de *Wolbachia* e *S. pierantonius*, tendo como alvo os genes 16S rRNA de ambas as bactérias. Os pares de oligonucleotídeos utilizados foram adquiridos de Carvalho *et al.* (2014b), de acordo com os requisitos para PCR em tempo real (Tabela 1).

As reações de qPCR foram feitas utilizando o aparelho ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems) e seguiram as mesmas condições de amplificação para todos os sistemas: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 45s e anelamento e extensão a 60°C durante 30s. Após 40 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para elaboração da curva de dissociação. As amostras foram aquecidas com incremento de 1°C durante 30s partindo de 60°C até atingir o limite de 94°C . A curva de melting (65°C a 97°C) foi obtida no final de cada reação para checar a especificidade dos produtos de PCR. Os componentes para cada reação foram 1 μL de cDNA, 6,0 μL de 2X SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem) e 200 nM de cada primer do conjunto (Tabela 1).

A curva-padrão foi plotada a partir de oito diluições dos plasmídeos correspondentes a cada gene, sendo que o número de cópias dos genes foi estimado de acordo com a mesma. A quantidade de DNA total (hospedeiro + endossimbiontes) de

cada amostra foi utilizada para normalizar os resultados da quantidade de cópias dos genes 16S rRNA (Le Clec'h *et al.*, 2013). Os resultados foram apresentados em número de cópias por ng de DNA e as amostras foram analisadas em triplicatas biológicas, quantificadas em corridas independentes.

5.6. Análises estatísticas

Os resultados obtidos nos parâmetros comportamentais avaliados e as cargas endossimbiontes foram sujeitos à análise de variância, utilizando-se procedimento GLM do *software* SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA) (SAS Institute, 2009) seguido do teste de Tukey HSD ($P < 0,05$).

A consistência dos ensaios comportamentais nas progenitoras antes e após a supressão endossimbionte e a consistência comportamental entre estas progenitoras e sua respectiva progênie foram testadas através da análise de correlação canônica via procedimento CANCORR (SAS Institute, 2009). Correlações simples entre cada comportamento avaliado também foram conduzidas, bem como a herdabilidade da carga endossimbionte (PROC CORR; SAS Institute, 2009).

Os parâmetros comportamentais que mostraram consistência na análise das progenitoras antes e após a supressão endossimbionte e na análise entre progenitoras e progênie foram submetidos à análise de fator (PROC FACTOR, com rotação ortogonal (Varimax); SAS Institute, 2009).

Ainda tratando-se dos parâmetros comportamentais mais consistentes das fêmeas, estes foram utilizados como variáveis independentes em análise de regressão múltipla para modelar a fertilidade (PROC REG; SAS Institute, 2009). Além disso, a carga das fêmeas foi tomada como variável independente em análise de regressão simples para testar seu efeito na fertilidade destas (PROC REG; SAS Institute, 2009).

6. RESULTADOS

6.1. Médias comportamentais e da carga endossimbionte

A análise de variância das características comportamentais das progenitoras antes e depois da administração dos antibióticos indicou diferenças significativas ($P < 0,05$) nos parâmetros distância percorrida, tempo em repouso e velocidade de caminhada naquelas tratadas com ciprofloxacino, e nos parâmetros tempo em repouso e tempo para desvirar, nas tratadas com tetraciclina (Tabela 2). Quanto às características comportamentais da progênie após três e sete dias da emergência só foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,05$) nos parâmetros tempo em repouso e voo, para ciprofloxacino e tetraciclina, respectivamente (Tabela 2).

A carga endossimbionte das progenitoras diferiu significativamente ($P < 0,05$) da carga dos insetos controle para ambos os antibióticos (Tabela 3). Entretanto a análise de variância não indicou diferença significativa entre a carga da progênie e do controle (Tabela 3). Apesar disto, foi observada a diminuição na esclerotização e no escurecimento da progênie de fêmeas tratadas com ciprofloxacino (Figura 1), indicando supressão do endossimbionte *S. pierantonius* (Vigneron *et al.*, 2014).

6.2. Consistência transgeracional

A correlação geral (i.e., correlação canônica) entre os parâmetros comportamentais das progenitoras antes e após a administração de ambos os antibióticos foi significativa (Wilks' lambda = 0,0004, $F = 2,36$, $df_{num/den} = 64/52,63$, $P < 0,001$), sendo que o primeiro e o segundo pares canônicos gerados explicaram 96% e 94% da variância total, respectivamente (Tabela 4). As características que apresentaram maior contribuição na composição dos eixos canônicos, segundo os valores de correlação e coeficiente, foram voo, tanatose, desvirar e interação conspecífica e heterospecífica (Tabela 4). Correlações simples entre as progenitoras antes e após a administração de ambos os antibióticos mostraram-se significativas para os comportamentos de tempo em repouso ($r = 0,40$, $P = 0,021$), voo ($r = 0,49$, $P = 0,004$), tanatose ($r = 0,62$, $P < 0,001$) e desvirar ($r = 0,64$, $P < 0,001$).

Os comportamentos que apresentaram maior contribuição na composição dos eixos canônicos na análise das progenitoras foram selecionados e utilizados na

correlação canônica dessas fêmeas com sua respectiva progênie. Neste caso, não houve correlação significativa entre os grupos selecionados (Wilks' lambda = 0,4985, $F = 1,05$, $df_{\text{num/den}} = 25/127,81$, $P = 0,41$) (Tabela 5).

Quanto à consistência endossimbionte, as cargas de todas as progenitoras, ou seja, cada uma tratada com o antibiótico ciprofloxacino ou tetraciclina foram correlacionadas com as de suas respectivas progênies. Para a bactéria *S. pierantonius* houve correlação significativa ($r = 0,28$, $P = 0,02$), enquanto que para a bactéria *Wolbachia* não houve ($r = 0,082$, $P = 0,50$).

6.3. Comportamento multidimensional individual

Na análise de fator dos comportamentos das progenitoras antes e após a supressão endossimbionte, a medida de adequabilidade do modelo não ultrapassou o limite desejado de 0,50 (Kaiser msa = 0,40). Além disso, os dois primeiros fatores gerados explicaram 66% e 39% da variância total observada (Tabela 6). As características comportamentais que explicam a maior parte da divergência entre as progenitoras foram tanatose e interação conspecífica no 1º fator e voo e desvirar no 2º fator.

Já em relação aos comportamentos da progênie, o modelo mais adequado foi o que comparou as progenitoras antes do tratamento com os antibióticos com a prole após três dias de emergência. Mas ainda assim, a adequabilidade do modelo não ultrapassou o limite de 0,50, onde o Kaiser msa foi igual a 0,49 (Tabela 6). Os dois primeiros fatores gerados explicaram 60% e 33% da variância total observada. E as características comportamentais que explicam a maior parte da divergência na progênie foram voo, desvirar e tanatose no 1º fator, interação conspecífica e heterospecífica no 2º fator (Tabela 6).

Ambas as análises de fator permitiram a confecção de diagramas de ordenação. Estes diagramas representam a diversidade das características comportamentais individuais por meio da distribuição espacial (Figura 2). A comparação destes diagramas possibilitou visualizar maior divergência comportamental nas progenitoras comparativamente à progênie (Figura 2). Além disso, o tratamento com os antibióticos canalizou as respostas comportamentais em detrimento ao controle (Figura 2).

6.4. Implicações na fertilidade

Os parâmetros comportamentais mais consistentes das fêmeas na correlação canônica foram utilizados como variáveis independentes na análise de regressão múltipla para modelar a fertilidade. O melhor modelo obtido nesta análise foi o que evidenciou interação conspécífica e heterospécífica como variáveis independentes ($R^2 = 0,58$, $F = 9,70$, $P < 0,001$) (Figura 3).

A carga endossimbionte das progenitoras como variável independente não apresentou relação significativa com a fertilidade para as bactérias *S. pierantonius* ($R^2 = 0,004$, $F = 0,13$, $P = 0,72$) e *Wolbachia* ($R^2 = 0,049$, $F = 1,65$, $P = 0,21$).

7. DISCUSSÃO

As definições de personalidade, síndrome comportamental e traços comportamentais são dependentes da obtenção de respostas consistentes ao longo do tempo (Jandt *et al.*, 2014). Entretanto, para caracterizar esses parâmetros é necessário que haja variação entre os tipos comportamentais médios. Em *S. zeamais* a variação dos indivíduos influencia mais na constituição de sua personalidade, em detrimento da variação entre populações (Morales *et al.*, 2013). Assim, indivíduos dessa espécie de mesma origem populacional, com diferentes cargas endossimbiontes, antes e após o tratamento com os antibióticos ciprofloxacino e tetraciclina, foram utilizados na definição dos tipos comportamentais médios, da consistência geracional e transgeracional destes tipos, na variabilidade comportamental sob os diferentes contextos e nas implicações sobre a fertilidade.

A comparação fornecida pela análise de variância indicou alteração nos traços comportamentais das progenitoras após o tratamento com os antibióticos em menos da metade dos parâmetros estudados. Talvez isto tenha ocorrido em detrimento da plasticidade de respostas para alguns comportamentos (Sih *et al.*, 2004ab), ou porque os antibióticos não desencadearam efeito direto nos mesmos. Além disso, a análise de variância não indicou diferenças significativas nas cargas das bactérias entre a progênie e o controle, mesmo diante da supressão nas fêmeas parentais, indicando recolonização dos insetos por seus simbiontes na geração seguinte. Contudo, em ambas as análises supracitadas não houve como padronizar a quantidade absoluta de antibiótico ingerido por inseto e a supressão decorrente.

No caso da progênie, a análise de variância só indicou variação comportamental para dois parâmetros entre os grupos etários avaliados. Apesar destes grupos não diferirem em tratamento, respostas contrastantes poderiam ser observadas, já que entre o sexto e o sétimo dias da emergência, há o início da redução natural da carga de *S. pierantonius*. Este processo é ligado ao fim da esclerotização, que ocorre por meio da digestão e reciclagem endossimbionte, reduzindo os custos da relação para o hospedeiro (Vigneron *et al.*, 2014). A diminuição evidente na esclerotização e escurecimento dos insetos tratados com ciprofloxacino indicaram que houve supressão da carga de *S. pierantonius*.

Apesar da análise de variância ter apontado diferença significativa para menos da metade dos parâmetros estudados, a correlação canônica indicou persistência de padrões comportamentais nas progenitoras após o tratamento. Assim, a personalidade (ou consistência comportamental) em *S. zeamais* foi detectável mesmo após a supressão endossimbionte, independentemente de qual antibiótico foi administrado. Em decorrência desta persistência, avaliou-se a consistência transgeracional para os comportamentos que mais contribuíram na construção da personalidade, ou seja, voo, tanatose, desvirar, interação conspecífica e heterospecífica. Entretanto não houve correlação significativa, indicando que os traços comportamentais não foram passados a geração seguinte. De modo geral, a consistência transgeracional da personalidade em invertebrados não é bem elucidada (van Oers & Sinn, 2011). O que se têm são poucos relatos como a herdabilidade da característica agressividade nas espécies de aranhas *Anelosimus studiosus* e *Larinioides sclopetarius* (Pruitt & Riechert, 2009b; Kralj-Fiser & Schneider, 2012) e timidez/ousadia no pulgão da ervilha, *Acyrtosiphon pisum* (Schuett *et al.*, 2011).

A partir dos comportamentos que mais caracterizaram personalidade foi possível traçar diagramas de ordenação, representando a diversidade de respostas a nível de indivíduo. Nestes diagramas observou-se maior divergência comportamental nas progenitoras em relação a sua progênie. Este resultado pode se dever ao efeito do estresse decorrente da administração dos antibióticos. Além disso, o tratamento com os antibióticos canalizou as respostas comportamentais mostrando menor variabilidade de respostas comportamentais do que insetos sem exposição aos antibióticos. Esta tendência também persistiu na progênie e é provável resultado do estresse imposto pelo tratamento antibiótico.

Embora a correlação canônica tenha indicado que os traços comportamentais não foram passados a geração seguinte, a consistência obtida nas progenitoras mesmo após a administração dos antibióticos suscita questionamentos acerca de suas implicações na fertilidade destas. Isso porque a personalidade é associada a *trade-offs* na história de vida (Tremmel & Müller, 2012), que implicam em tendências contrastantes de crescimento/desenvolvimento e reprodução. Assim, a modelagem a partir dos comportamentos que mais contribuíram para personalidade destacou os parâmetros interação conespecífica e heterospecífica como determinantes na saída reprodutiva. Onde se observou que quanto maior o tempo para interagir com conspecífico e menor o tempo para interagir com heterospecífico, maior a fertilidade da fêmea (i.e., mais progênie produzida). Ou seja, a característica de explorar/evitar dado ambiente configura-se como fator associado à capacidade reprodutiva de indivíduos desta espécie. O maior tempo para interação conspecífica, por exemplo, pode servir como indicador da avaliação de parceiros, pois a espécie mostra seleção sexual (Cordeiro *et al.*, 2017; Guedes *et al.*, 2017). Em contraste, a rápida interação heterospecífica é indicativa da capacidade competitiva desta espécie, que exhibe benefícios diretos advindos de competição larval e canibalismo (Guedes *et al.*, 2010; Bolívar, 2016).

Quanto à consistência transgeracional da carga endossimbionte, houve correlação somente para a bactéria *S. pierantonius*. Carvalho *et al.* (2014b) demonstraram a redução significativa das cargas de *S. pierantonius* e *Wolbachia*, em duas gerações provenientes de fêmeas tratadas com os antibióticos ciprofloxacino e tetraciclina respectivamente, comprovando a eficiência da supressão ao longo de gerações. Além disso, as associações endossimbióticas obrigatórias refletem uma intrincada transmissão vertical da carga bacteriana (Toju *et al.*, 2013), como no caso de *S. pierantonius* e o caruncho do milho. A ausência de correlação transgeracional para a carga de *Wolbachia* pode ser associada ao fato de que, apesar de ter a transmissão vertical como principal forma de propagação (Hurst & Randerson, 2002), esta bactéria é um endossimbionte facultativo e pode ser encontrada intra e extracelular, permitindo assim a sua propagação horizontal (Heddi *et al.*, 1999; Russell & Moran, 2005; Chiel *et al.*, 2009; Kageyama *et al.*, 2010). O fato deste simbiote mostrar associação facultativa com o caruncho do milho também indica uma menor eficiência de transmissão que associações simbióticas obrigatórias, como a de *S. pierantonius* e o caruncho do milho (Carvalho *et al.*, 2014 ab).

Além das implicações comportamentais, também foram investigadas as implicações das cargas endossimbiontes na fertilidade. Para ambas as bactérias não houve contribuição significativa na capacidade reprodutiva. A inativação completa de *S. pierantonius* e *Wolbachia* através do tratamento térmico provoca a infertilidade em *S. zeamais* (Carvalho *et al.*, 2014b), entretanto, a supressão parcial obtida neste trabalho não foi suficiente para correlacionar carga de ambas as bactérias à fertilidade.

De modo geral, o estudo do comportamento a nível de indivíduo em *S. zeamais* é mais realístico (Morales *et al.*, 2013). Além disso, tipos comportamentais específicos podem estar associados ao desempenho reprodutivo do organismo (Smith & Blumstein, 2008). No caso do caruncho do milho, mesmo com a supressão simbiote, a personalidade dos indivíduos foi mantida mostrando-se consistente mediante esta intervenção. Esta consistência não foi passada à progênie, indicando baixa eficiência na seleção de características comportamentais, mesmo que benéficas a essa espécie em dado ambiente. Os perfis de carga simbiote também foram comprometidos transgeracionalmente, particularmente para *Wolbachia*, até por estabelecer relação facultativa. A carga endossimbionte, contudo mostrou associação mais fraca que personalidade na fertilidade das fêmeas de caruncho. Assim a personalidade desses insetos não deve ser negligenciada em face da sua associação com fertilidade e suas interações com endossimbiontes na espécie.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIRO, P. A. & STAMPS, J. A. Are animal personality traits linked to life-history productivity? **Trends in Ecology and Evolution**, v.23, p.361-368, 2008.
- BOLIVAR-SILVA, D. A. **Canibalismo e Desempenho Reprodutivo dos Carunchos *Sitophilus zeamais* e *Sitophilus oryzae***. Tese MS, Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 25 p., 2016.
- BOURTZIS, K. *Wolbachia*-based technologies for insect pest population control. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.627, p.104–118, 2008.
- BOURTZIS, K. & MILLER, T. A. **Insect Symbiosis**. Boca Raton: CRC prees, 2003.
- BREEUWERS, J. A. J. & WERREN, J. H. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. **Nature** (London), v.346, p. 558–560, 1990.
- BUCHNER, P. Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. **Interscience**, 1965.
- CARVALHO, G.A.; CORRÊA, A.S.; OLIVEIRA, L.O.; GUEDES, R.N.C. Evidence of horizontal transmission of primary and secondary endosymbionts between maize and rice weevils (*Sitophilus zeamais* and *Sitophilus oryzae*) and the parasitoid *Theocolax elegans*. **Journal of Stored Products Research**, v.59, p.61–65, 2014a.
- CARVALHO, G.A.; VIEIRA, J.L.; HARO, M.M.; CORRÊA, A.S.; RIBON, A.O.B.; *et al.* Pleiotropic impact of endosymbiont load and co-occurrence in the maize weevil *Sitophilus zeamais*. **PLoS ONE**, v.9(10), e111396, 2014b.
- CHIEL, E.; ZCHORI-FEIN, E.; INBAR, M.; GOTTLIEB, Y.; ADACHI-HAGIMORI, T.; *et al.* Almost there: Transmission routes of bacterial symbionts between trophic levels. **PLoS ONE**, v.4(3), e4767, 2009.
- CLARK T.L.; MEINKE L.J.; FOSTER J.E. Molecular phylogeny of *Diabrotica* beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) inferred from analysis of combined mitochondrial and nuclear DNA sequences. **Insect Molecular Biology**, v.10, p. 303-314, 2001.
- CORDAUX, R., MICHEL-SALZAT, A., BOUCHON, D. *Wolbachia* infection in crustaceans: Novel hosts and potential routes for horizontal transmission. **Journal of Evolutionary Biology**, v.14, p. 237-243, 2001.
- CORDEIRO, E. M. G.; CORRÊA, A. S.; ROSI-DENADAI, C. A.; TOMÉ, H. V. V.; GUEDES, R.N.C. Insecticide resistance and size assortative mating in females of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). **Pest Management Science**. [no prelo]
- DALL, S. R. X.; HOUSTON, A. I.; MCNAMARA, J.M. The behavioural ecology of personality: consistent individual differences from an adaptive perspective. **Ecology Letters**, v.7, p.734–739, 2004.
- DINGEMANSE, N. J.; BOTH, C.; DRENT, P. J.; TINBERGEN, J. M. Fitness consequences of avian personalities in a fluctuating environment. **Proceedings of the**

Royal Society, v.271, p.847–852, 2004.

DOBZHANSKY, T. Nothing in biology makes sense except in the light of evolution. **The American Biology Teacher**, v.35, p.125–129, 1973.

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

EISELE, I.; MEYHÖFER, R. Adding “personality” to biocontrol: characterization and suitability of microsatellites for sibship reconstruction in the aphid parasitoid *Diaeretiella rapae*. **BioControl**, v.60, p.189-197, 2015.

FRAGOSO, D.B.; GUEDES, R.N.C.; PETERNELLI, L.A. Developmental rates and population growth of insecticide-resistant and susceptible populations of *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, v.41, p. 271-281, 1995.

GASNIER-FAUCHET F.; NARDON P. Comparison of sarcosine and methionine sulfoxide levels in symbiotic larvae of two sibling species, *Sitophilus oryzae* L. and *S. zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.17, p.17–20, 1987.

GUEDES, N.M.P.; BRAGA, L.S.; ROSI-DENADAI, C.A.; GUEDES, R.N.C. Desiccation resistance and water balance in populations of the maize weevil *Sitophilus zeamais*. **Journal of Stored Products Research**, 2014.

GUEDES, N. M. P.; GUEDES, R. N. C.; CAMPBELL, J. F.; THRONE, J. E. Contest behaviour of maize weevil larvae when competing within seeds. **Animal Behaviour**, v.79, p. 281-289, 2010.

GUEDES, N. M. P.; GUEDES, R. N. C.; CAMPBELL, J. F.; THRONE, J. E. Mating behavior and reproductive output in insecticide-resistant and –susceptible strains of the maize weevil (*Sitophilus zeamais*). **Annals of Applied Biology**, 2017. [no prelo]

HEDDI, A.; CHARLES, H. & KATCHADOURIAN, C. Intracellular bacterial symbiosis in the genus *Sitophilus*: the ‘biological individual’ concept revisited. Mini-review. **Research in Microbiology**, v.152, p.431–437, 2001.

HEDDI A.; GRENIER A.M.; KATCHADOURIAN C.; CHARLES H. & NARDON C. Four intracellular genomes direct weevil biology: Nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and *Wolbachia*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, p.6814–6819, 1999.

HEDDI A.; LEFEBVRE F. & NARDON P. The influence of symbiosis on the respiratory control ratio (RCR) and the ADP/O ratio in the adult weevil *Sitophilus oryzae* (Coleoptera, Curculionidae). **Endocytobiosis and Cell Research**, v.8, p.61–73, 1991.

HEDDI A.; LEFEBVRE F. & NARDON P. Effect of endocytobiotic bacteria on mitochondrial enzymatic activities in the weevil *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.23, p.403–411, 1993.
HEDDI A.; VALLIER A.; ANSELME C.; XIN H.; RAHBE Y. & WÄCKERS F.

Molecular and cellular profiles of insect bacteriocytes: mutualism and harm at the initial evolutionary step of symbiogenesis. **Cellular Microbiology**, v.7, p.293–305, 2005.

HURST, L.D. & RANDERSON, J.P. Parasitic sex pupeteers. **Scientific American**, v.286, p.42-47, 2002.

ISHIKAWA, H. Insect symbiosis: An introduction. In BOURTZIS K. & MILLER, T. A. (Eds). **Insect Symbiosis**. Boca Raton: CRC press, 2003. p. 1-21.

Inc. SPSS. Sigma Plot 11 User's guide, revised edition. Chicago, IL: SPSS Inc, 2008.

JANDT, J. M.; BENGSTON, S.; PINTER-WOLLMAN, N.; PRUITT, J. N.; RAINE, N. E.; *et al.* Behavioural syndromes and social insects: personality at multiple levels. **Biological Reviews**, v.89, p. 48-67, 2014.

KAGEYAMA, D.; NARITA, S.; IMAMURA, T.; MIYANOSHITA, A. Detection and identification of *Wolbachia* endosymbionts from laboratory stocks of stored-product insect pests and their parasitoids. **Journal of Stored Products Research**, v.46, p.13-19, 2010.

KRALJ-FISER, S. & SCHNEIDER, J. M. Individual behavioural consistency and plasticity in an urban spider. **Animal Behaviour**, v. 84, p.197-204, 2012.

LE CLEC'H W.; CHEVALIER F.D.; GENTY L.; BERTAUX J.; BOUCHON D.; *et al.* Cannibalism and predation as paths for horizontal passage of *Wolbachia* between terrestrial isopods. **PLoS ONE**, v.8, e60232, 2013.

LI, Y. Y.; FLOATE, K. D.; FIELDS, P. G.; PANG, P. B. Review of treatment methods to remove *Wolbachia* bacteria from arthropods. **Symbiosis**, v.62, p.1-15, 2014.

LUTTBEG, B. & SIH, A. Risk, resources and state- dependent adaptive behavioural syndromes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.365, p.3977–3990, 2010.

MANSOUR K. Preliminary studies on the bacterial cell mass (accessory cell-mass) of *Calandra oryzae* (Linn.). **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v.73, suppl.2, p. 465–476, 1930.

MIYATAKE, T.; TABUCHI, K.; SASAKI, K.; OKADA, K.; KATAYAMA, K.; *et al.* Pleiotropic antipredator strategies, fleeing and feigning death, correlated with dopamine levels in *Tribolium castaneum*. **Animal Behaviour**, v.75, p. 113-121, 2008.

MODLMEIER, A.P.; KEISER, C.N.; WRIGHT, C.M.; LICHTENSTEIN, J.L.L.; PRUITT, J.N. Integrating animal personality into insect population and community ecology. **Current Opinion in Insect Science**, v.9, p.1-9, 2015.

MORALES, J.A.; CARDOSO, D.G.; DELLA LUCIA, T.M.C.; & GUEDES, R.N.C. Weevil x Insecticide: Does 'Personality' Matter? **PLoS ONE**, v.8, e67283, 2013.

MORAN, N.A. Symbiosis (A primer). **Current Biology**, v.16, p.R866–R871, 2006.

MORAN, N.A. Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v.104, p. 8627-8633, 2007.

NARDON, P. Ovogenèse et transmission des bactéries symbiotiques chez le charançon *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). [Oogenesis and transmission of symbiotic bacteria in the weevil *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae).] **Annales de la Société Entomologique**, v.42, p.129–164, 2006.

NARDON, P. & GRENIER, A.M. Genetical and biochemical interactions between the host and its endocytobiontes in the weevils *Sitophilus* (Coleoptera: Curculionidae) and other related species. In: S. Scannerini, D. Smith, P. Bonfante-Fasolo and V. Gianinazzi-Pearson, editors. Cell to cell signals in plant, animal and microbial symbiosis. **Springer**, p.255-270, 1988.

NARDON, P.; LEFEVRE, C.; DELOBEL, B.; CHARLES, H.; HEDDI, A. Occurrence of endosymbiosis in Dryophthoridae weevils: Cytological insights into bacterial symbiotic structures. **Symbiosis**, v.33, p.227–24, 2002.

O'NEILL, S. L. & KARR, T. L. Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. **Nature**, v.348, p.778–780, 1990.

PRUITT, J. N. & RIECHERT, S. E. Frequency-dependent success of cheaters during foraging bouts might limit their spread within colonies of a socially polymorphic spider. **Evolution**, v.63, p.2966–2973, 2009a.

PRUITT, J. N. & RIECHERT, S. E. Sex matters: sexually dimorphic fitness consequences of a behavioural syndrome. **Animal Behaviour**, v. 78, p. 175-181, 2009b.

REAL, L.A. How to think about behavior: an introduction. In Behavioral Mechanisms in Evolutionary Ecology. **University of Chicago Press**, p. 460, 1994.

REÁLE, D.; READER, S.M.; SOL, D.; MCDUGALL, P.T.; DINGEMANSE, N.J. Integrating animal temperament with ecology and evolution. **Biological Reviews**, v.82, p.291-318, 2007.

RIGAUD, T.; SOUTY-GROSSET, C.; RAIMOND, R.; MOCQUARD, J. P. & JUCHAULT, P. Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda): recent acquisitions. **Endocytosis and Cell Research**. v.7, p.259–273, 1991.

RODRIGUES, A. S.; BOTINA, L.; NASCIMENTO, C. P.; GONTIJO, L. M.; TORRES, J. B.; *et al.* Ontogenetic behavioral consistency, individual variation and fitness consequences among lady beetles. **Behavioural Processes**, v. 131, p.32-39, 2016.

RUSSELL, J.A. & MORAN, N.A. Horizontal transfer of bacterial symbionts: heritability and fitness effects in a novel aphid host. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.7987-7994, 2005.

SAS Institute. SAS user's guide: statistics, version 8.2. SAS Institute, Cary, NC, 2009.

SARIDAKI, A. & BOURTZIS, K. *Wolbachia*-induced reproductive parasitism and applications. **Entomologia Hellenica**, v.18, p.3-16, 2009a.

- SARIDAKI, A. & BOURTZIS, K. *Wolbachia*: More than just a bug in insect genitals. **Current Opinion in Microbiology**, v.13, p.67–72, 2009b.
- SCHUETT, W.; DALL, S. R. X.; BAEUMER, J.; KLOESENER, M. H.; NAKAGAWA, S. *et al.* Personality variation in a clonal insect: the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. **Developmental Psychobiology**, v.53, p. 631–640, 2011.
- SIH, A. & BELL, A.M. Insights for behavioral ecology from behavioral syndromes. **Advances in the Study of Behavior**, v.38, p.227-279, 2008.
- SIH, A.; BELL, A.M.; JOHNSON, J.C. Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. **Trends in Ecology & Evolution**, v.19, p.372-378, 2004a.
- SIH, A.; BELL, A.M.; JOHNSON, J.C.; ZIEMBA, R.E. Behavioral syndromes: an integrative overview. **The Quarterly Review of Biology**, v.79, p.241-277, 2004b.
- SIH, A.; COTE, J.; EVANS, M.; FOGARTY, S.; PRUITT, J. Ecological implications of behavioural syndromes. **Ecology Letters**, v.15, p.278-289, 2012.
- SMITH, B. R. & BLUMSTEIN, D. T. Fitness consequences of personality: a meta-analysis. **Behavioral Ecology**, v.19, p.448–455, 2008.
- STOUTHAMER, R.; BREEUWER, J. A. J.; LUCK, R. F. & WERREN, J. H. Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. **Nature**, v.361, p.66–68, 1993.
- TOJU, H.; TANABE, A. S.; NOTSU, Y.; SOTA, T.; FUKATSU, T. Diversification of endosymbiosis: replacements, co-speciation and promiscuity of bacteriocyte symbionts in weevils. **International Society for Microbial Ecology**, v.7, p. 1378-1390, 2013.
- TREMMEL, M. & MÜLLER, C. Insect personality depends on environmental conditions. **Behavioral Ecology**, v. 24, p. 386-392, 2012.
- UHER, J. Individual behavioral phenotypes: an integrative meta-theoretical framework. Why “behavioral syndromes” are not analogs of “personality”. **Developmental Psychobiology**, v.53, p. 521–548, 2011.
- VAN OERS, K. & SINN, D. L. Toward a basis for the phenotypic gambit: advances in the evolutionary genetics of animal personality. In: INOUE-MURAYAMA, M.; KAWAMURA, S.; WEISS, A. (Eds.). **From genes to animal behavior**, Tokyo: Springer, 2011. p. 165-183, 2011.
- VAVRE, F.; FLEURY, F.; LEPETIT, D.; FOUILLET, P.; BOULETREAU, M. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. **Molecular Biology Evolution**, v.16, p.1711–1723, 1999.
- VIGNERON, A.; MASSON, F.; VALLIER, A.; BALMAND, S.; REY, M. *et al.* Insects recycle endosymbionts when the benefit is over. **Current Biology**, v.24, p. 2267–2273, 2014.
- WERNEGREEN, J.J. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. **Nature**

reviews **Genetics**, v.3, p. 850-861, 2002.

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

WERREN, J.H.; BALDO, L.; CLARK, M.E. *Wolbachia*: Master manipulators of invertebrate biology. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, p.741–75, 2008.

WERREN, J.H.; ZHANG, W. & GUO, L.R. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*-reproductive parasites of arthropods. **Proceedings of the Royal Society B- Biological Sciences**, v.262, p. 55-63, 1995.

WICKER C. Differential vitamin and choline requirements of symbiotic and aposymbiotic *S. oryzae* (Coleoptera, Curculionidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.76, p.177– 182, 1983.

ZUG, R.; HAMMERSTEIN, P. Still a host of hosts for *Wolbachia*: Analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. **PLoS ONE**, v.7(6), e38544, 2012.

9. ANEXO

TABELA 1. Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de qPCR.

Gene Alvo	Sequencia (5' – 3')	Concentração (μM)	Tamanho (pb)
16Swb	F 5' - CGGGGGAAAAATTTATTGCT - 3' R 5' – TAGGAGTCTGGACCGTATCT - 3'	0,2 μM	145
16Ssp	F 5' - AGACTCTAGCCTGCCAGTTT - 3' R5' - CCGAAGGCACCAAGGCAT - 3'	0,2 μM	198

TABELA 2. Características comportamentais (média ± erro padrão) de fêmeas de *Sitophilus zeamais* antes e depois do tratamento com os antibióticos ciprofloxacino e tetraciclina e de sua respectiva progênie, submetidas à análises (uni-variadas) de variância (ANOVA).

Dimensões da Personalidade	Variáveis Comportamentais	Progenitoras				Progênie			
		Antes	Depois	F _{cal}	P	Após 3 dias	Após 7 dias	F _{cal}	P
Ciprofloxacino									
Atividade	Distância percorrida (cm)	440,79 ± 104,32	196,09 ± 11,11	5,44	0,03	212,09 ± 6,34	230,30 ± 8,67	2,91	0,09
	Tempo em repouso (s)	184,47 ± 19,16	266,79 ± 18,75	9,43	0,01	256,85 ± 11,31	223,88 ± 10,96	4,40	0,04
	Velocidade (cm/s)	0,73 ± 0,18	0,33 ± 0,02	5,44	0,03	0,35 ± 0,01	0,38 ± 0,01	2,91	0,09
	Voo (cm)	8,25 ± 0,81	7,48 ± 0,62	0,64	0,43	7,57 ± 0,42	8,54 ± 0,57	1,88	0,18
	Desvirar (s)	18,25 ± 7,83	81,95 ± 43,98	2,03	0,16	10,11 ± 1,42	30,77 ± 12,78	2,58	0,11
Timidez/Ousadia	Tanatose (s)	29,99 ± 11,69	26,24 ± 5,21	0,09	0,77	24,73 ± 6,42	25,28 ± 4,60	0,01	0,94
Explorar/Evitar	Interação heterospecífica (min)	13,02 ± 1,01	13,76 ± 1,22	0,22	0,64	13,27 ± 1,00	15,30 ± 0,54	3,36	0,07
	Interação conspecífica (min)	11,79 ± 1,39	11,27 ± 1,67	0,06	0,81	11,25 ± 1,05	10,64 ± 1,02	0,17	0,68
Tetraciclina									
Atividade	Distância percorrida (cm)	263,37 ± 18,98	210,86 ± 24,36	2,89	0,10	516,83 ± 100,36	469,93 ± 95,03	0,16	0,74
	Tempo em repouso (s)	208,44 ± 17,16	272,76 ± 25,79	4,31	0,05	195,68 ± 12,93	199,41 ± 12,79	0,04	0,84
	Velocidade (cm/s)	0,45 ± 0,03	0,35 ± 0,04	3,37	0,08	0,86 ± 0,17	0,79 ± 0,16	0,10	0,76
	Voo (cm)	10,50 ± 0,88	8,61 ± 0,57	3,23	0,08	7,75 ± 0,35	9,66 ± 0,65	6,76	0,01
	Desvirar (s)	8,20 ± 1,48	145,62 ± 29,56	21,57	<0,001	15,78 ± 3,07	24,04 ± 4,91	2,06	0,16
Timidez/Ousadia	Tanatose (s)	29,54 ± 17,53	24,46 ± 4,92	0,08	0,78	17,70 ± 6,08	25,31 ± 5,20	0,90	0,35
Explorar/Evitar	Interação heterospecífica (min)	13,88 ± 0,98	13,04 ± 1,27	0,28	0,60	14,58 ± 0,62	14,48 ± 0,60	0,01	0,91
	Interação conspecífica (min)	11,01 ± 1,25	12,16 ± 1,58	0,33	0,57	12,83 ± 0,74	13,09 ± 0,73	0,07	0,80

TABELA 3. Cargas endossimbiontes (média \pm erro padrão) de fêmeas de *Sitophilus zeamais* após o tratamento com os antibióticos ciprofloxacino e tetraciclina, de sua respectiva progênie e de insetos controle com idade padronizada (57 dias para as progenitoras e 11 dias para a progênie), submetidas à análises (uni-variadas) de variância (ANOVA).

Bactérias Endossimbiontes (n° cópias/ngDNA)	Ciprofloxacino				Tetraciclina			
	Controle	Progenitoras	F _{cal}	P	Controle	Progênie	F _{cal}	P
<i>Sodalis pierantonius</i>	45,80 \pm 19,97	1,41 \pm 0,45	9,08	0,01	21,80 \pm 12,89	16,56 \pm 5,56	0,16	0,70
<i>Wolbachia pipientis</i>	198,47 \pm 65,20	38,16 \pm 7,98	10,60	0,01	173,02 \pm 26,70	260,72 \pm 108,31	0,14	0,71
	Controle	Progenitoras	F _{cal}	P	Controle	Progênie	F _{cal}	P
<i>Sodalis pierantonius</i>	45,80 \pm 19,97	8,73 \pm 2,11	6,85	0,02	21,80 \pm 12,89	24,57 \pm 5,09	0,04	0,85
<i>Wolbachia pipientis</i>	198,47 \pm 65,20	11,77 \pm 4,08	16,80	<0,001	173,02 \pm 26,70	349,25 \pm 61,61	1,09	0,30

TABELA 4. Pares canônicos, coeficientes e correlações entre as características comportamentais das fêmeas progenitoras de *Sitophilus zeamais*, antes e depois da administração dos antibióticos ciprofloxacino e tetraciclina. Os números em negrito indicam os principais contribuintes de cada eixo.

Dimensões da Personalidade	Variáveis Comportamentais	Pares Canônicos Significativos			
		1°		2°	
		Coeficiente	Correlação	Coeficiente	Correlação
Antes do antibiótico					
Atividade	Distância percorrida (cm)	-1,00	-0,20	-11,22	-0,25
	Tempo em repouso (s)	0,16	0,23	-0,98	-0,23
	Velocidade (cm/s)	1,08	-0,19	10,25	-0,24
	Voo (cm)	0,36	0,02	0,50	0,67
	Desvirar (s)	0,57	0,47	0,21	-0,10
Timidez/Ousadia	Tanatose (s)	0,50	0,38	0,36	-0,06
Explorar/Evitar	Interação heterospecífica (min)	0,69	0,73	-0,35	-0,21
	Interação conspecífica (min)	0,17	0,08	0,22	0,10
Depois do antibiótico					
Atividade	Distância percorrida (cm)	-132,77	-0,40	13,16	0,27
	Tempo em repouso (s)	-2,17	0,04	-7,45	-0,28
	Velocidade (cm/s)	130,54	-0,39	-20,25	0,27
	Voo (cm)	0,18	0,16	0,62	0,46
	Desvirar (s)	0,78	0,72	0,62	-0,002
Timidez/Ousadia	Tanatose (s)	0,38	0,24	0,47	0,22
Explorar/Evitar	Interação heterospecífica (min)	0,32	0,43	-0,41	-0,50
	Interação conspecífica (min)	0,07	0,58	-0,67	-0,31
Estatística	<i>r</i>	0,96		0,94	
	F _{appr.}	2,36		1,91	
	df _{num/den}	64/52,63		49/50,11	
	<i>P</i>	0,001		0,01	

TABELA 5. Pares canônicos, coeficientes e correlações entre as características comportamentais mais relevantes das fêmeas de *Sitophilus zeamais* e de sua progênie após 3 dias da emergência. Os números em negrito indicam os principais contribuintes de cada eixo.

Dimensões da Personalidade	Variáveis Comportamentais	Pares Canônicos Significativos			
		1°		2°	
		Coeficiente	Correlação	Coeficiente	Correlação
	Progenitoras				
Atividade	Voo (cm)	0,22	0,54	1,35	0,67
	Desvirar (s)	0,21	0,28	0,42	0,28
Timidez/Ousadia	Tanatose (s)	0,78	0,92	-1,05	-0,10
Explorar/Evitar	Interação heterospecífica (min)	0,45	0,13	0,24	-0,18
	Interação conspecífica (min)	-0,25	-0,17	-0,47	0,19
	Progênie				
Atividade	Voo (cm)	-0,33	-0,43	-0,03	0,05
	Desvirar (s)	-0,48	-0,48	1,10	0,30
Timidez/Ousadia	Tanatose (s)	0,17	-0,18	-1,13	-0,47
Explorar/Evitar	Interação heterospecífica (min)	0,30	0,44	0,09	-0,12
	Interação conspecífica (min)	0,65	0,81	0,35	0,42
Estatística	<i>r</i>	0,54		0,41	
	F _{appr.}	1,05		0,80	
	df _{num/den}	25/127,81		16/107,56	
	<i>P</i>	0,41		0,68	

TABELA 6. Principais fatores e cargas das características comportamentais mais relevantes das fêmeas de *Sitophilus zeamais* e de sua respectiva progênie após 3 dias de emergência. Os números em negrito indicam os principais contribuintes de cada fator.

Dimensões da Personalidade	Variáveis Comportamentais	Fatores Principais (Girados Ortogonalmente)			
		Progenitoras		Progênie	
		1	2	1	2
Atividade	Voo (cm)	0,19	-0,32	-0,28	-0,10
	Desvirar (s)	0,05	0,35	0,28	-0,02
Timidez/Ousadia	Tanatose (s)	-0,24	0,02	0,29	-0,07
Explorar/Evitar	Interação heterospecífica (min)	-0,01	0,02	0,04	0,27
	Interação conspecífica (min)	0,38	0,05	-0,05	0,35
Autovalor		0,91	0,55	1,16	0,64
Proporção da variância explicada		0,66	0,39	0,60	0,33
Adequação da amostra (Kaiser's msa)		0,40		0,49	

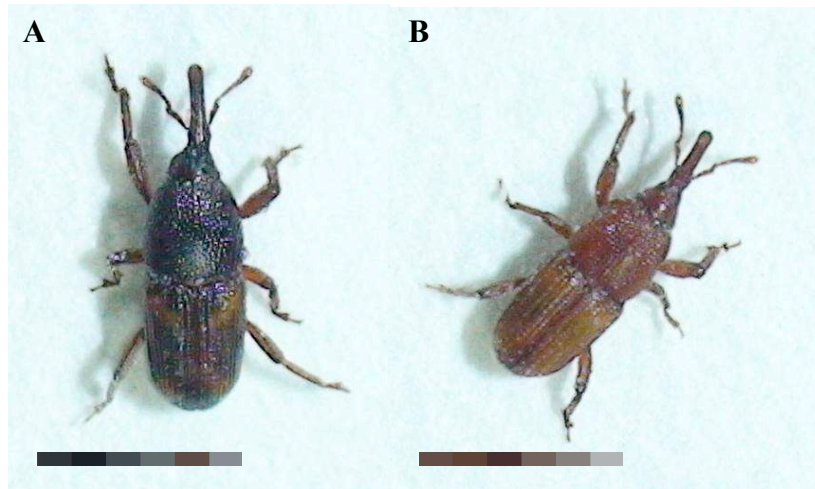


Figura 1. Efeito da supressão do endossimbionte *Sodalis pierantonius* via administração do antibiótico ciprofloxacino (25 mg/mL), na esclerotização e escurecimento de *Sitophilus zeamais*. Em A) inseto proveniente de fêmea controle e em B) inseto proveniente de fêmea tratada com o antibiótico. Ambos os insetos possuíam 11 dias de emergência do grão.

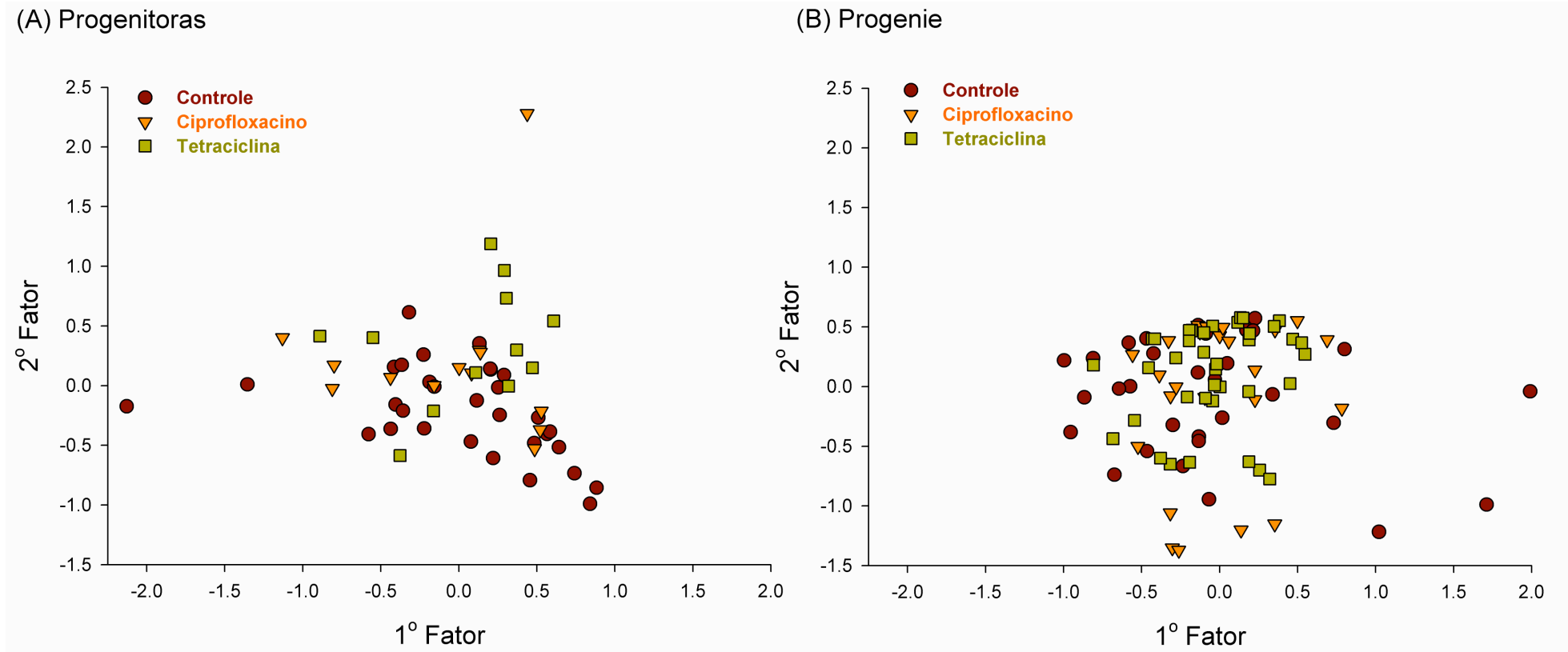


Figura 2. Divergência comportamental entre progenitoras (A) de *Sitophilus zeamais* e sua respectiva progênie (B), sob o tratamento com os antibióticos ciprofloxacino e tetraciclina.

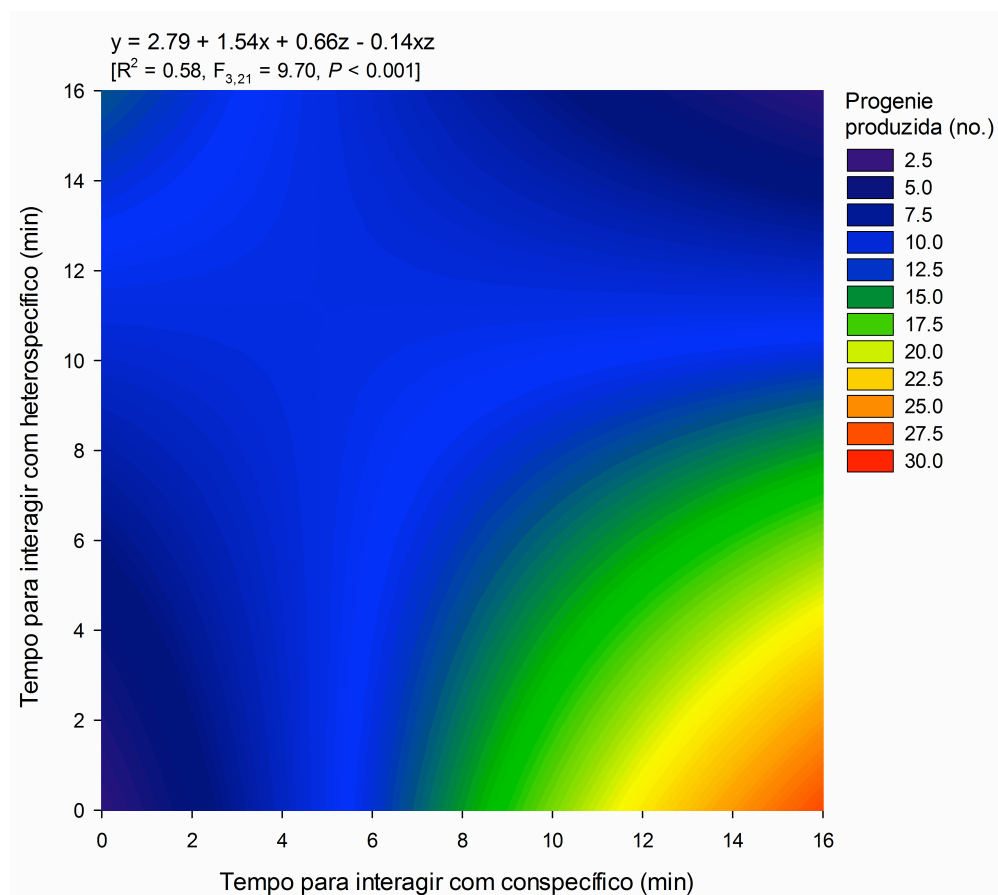


Figura 3. Efeito do tempo para interagir com heteroespecífico (min) e com conspecifico (min) sobre a progênie produzida em fêmeas de *Sitophilus zeamais*.