

ECOLOGIA E FISIOLOGIA DAS RELAÇÕES HÍDRICAS EM OVOS DO
PERCEVEJO *ONCOPELTUS FASCIATUS* (HEMIPTERA: LYGAEIDAE)

MARIANA MENDONÇA DE ANDRADE BERSOT

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

ECOLOGIA E FISIOLOGIA DAS RELAÇÕES HÍDRICAS EM OVOS
DO PERCEVEJO *ONCOPELTUS FASCIATUS* (HEMIPTERA:
LYGAEIDAE)

MARIANA MENDONÇA DE ANDRADE BERSOT

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ecologia e Recursos
Naturais como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ecologia
e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Lazzaro Rezende

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora

B53 Bersot, Mariana Mendonça de Andrade.
5

Ecologia e fisiologia das relações hídricas em ovos do percevejo *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera : Lygaeidae) / Mariana Mendonça de Andrade Bersot. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2024.

53 f.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2024.
Orientador: Gustavo Lazzaro Rezende.

1. Ecologia . 2. Higropreferência . 3. *Oncopeltus fasciatus*. 4. Umidade Relativa.
5. ovos. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD -
577

ECOLOGIA E FISIOLOGIA DAS RELAÇÕES HÍDRICAS EM OVOS DO PERCEVEJO *ONCOPELTUS FASCIATUS* (HEMIPTERA: LYGAEIDAE)

MARIANA MENDONÇA DE ANDRADE BERSOT

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em: 01/09/2022

Comissão examinadora:

Documento assinado digitalmente



ALESSANDRA APARECIDA GUARNERI
Data: 19/04/2024 11:21:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Alessandra Aparecida Guarneri - Fiocruz

Documento assinado digitalmente



CARYNE APARECIDA DE CARVALHO BRAGA
Data: 19/04/2024 11:48:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Caryne Aparecida de Carvalho Braga - UENF

Luana Cristina Farnesi Ferreira - Fiocruz

GUSTAVO|
LAZZARO REZENDE

Digitally signed by GUSTAVO LAZZARO REZENDE
DN: cn=GUSTAVO LAZZARO REZENDE
serialNumber=Y9261998, givenName=GUSTAVO,
c=BR, o=UFSC, ou=UFSCADANOS, o=ACCV
e=REZENDE@UFSC.br
Date: 2024-04-26 14:34:02 -03'00'

Gustavo Lazzaro Rezende - UENF
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Aneilza da S. M. De Andrade por me ensinar tudo sobre amor e paciência. Ao meu pai, Edvaldo de Andrade por me ensinar sobre persistência e a ambos, por estarem sempre comigo. Às minhas irmãs Raquel e Danielle. Ao meu sobrinho, Theo, por toda a magia que trás para minha vida. Agradeço também à minha segunda família, minha sogra Eugênia Márcia, sua mãe Jurandir e minha cunhada Malu, que foram luz no meu caminhar.

Agradeço ao meu melhor amigo e marido Iago Bersot por todo apoio, parceria e companhia nas noites viradas.

À todos acima, uma citação:

“Talvez meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz. Mas acima de tudo, o que mais nos incentiva, que mais nos valoriza – e também nos torna mais conscientes da nossa responsabilidade – é saber que outros creem em nós. E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber dos sacrifícios que eles se impõem por crerem não apenas em nós, mas também no que cremos.” (Albert Einstein)

Agradeço ao meu orientador Gustavo Lazzaro Rezende por todo apoio e disponibilidade ao longo de todo o processo do mestrado.

Agradeço a toda a equipe do laboratório (Larissa, Ulli e Cinthia) e em especial a Josiana G. De Andrade que contribuiu diretamente com esse trabalho.

Agradeço a todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para o sucesso desse trabalho.

Às instituições de apoio financeiro: CAPES e FAPERJ.

Sumário

1	Introdução	8
1.1	Os insetos, sua diversidade e importância	8
1.2	Fatores relacionados às condições hídricas	8
1.3	Terrestrialização dos insetos e suas relações hídricas	9
1.4	O ovo e sua importância ecológica e evolutiva	10
1.5	A espécie <i>Oncopeltus fasciatus</i> e sua ecologia	13
1.6	O ovo de <i>Oncopeltus fasciatus</i>	15
2	Objetivo geral	18
2.1	Objetivos específicos	18
3	Material e Métodos	19
3.1	Manutenção da criação de <i>Oncopeltus fasciatus</i>	19
3.2	Postura de ovos	19
3.3	Captura de imagens digitais da embriogênese completa	20
3.4	Preparação das câmaras de umidade relativa	20
3.4.1	Sistema de U.R. 4,5%	21
3.4.2	Sistema de U.R. 29%	21
3.4.3	Sistema de U.R. 74%	22
3.4.4	Avaliação da viabilidade em relação à manipulação dos ovos com pincel	22
3.4.5	Sistema de U.R. 99%	22

3.4.6 Sistema de U.R. variável.....	22
3.4.7 Sistema de inundação parcial dos ovos.....	22
3.5 Avaliação da perda de peso.....	23
3.6 Viabilidade de ovos.....	23
3.7 Análises estatísticas.....	23
4 Resultados.....	25
4.1 Registro visual da embriogênese.....	25
4.2 Registro visual da eclosão.....	26
4.3 Influência da disponibilidade de água na viabilidade e eclosão dos ovos.....	27
4.4 Avaliação da perda de peso molhado em ovos de <i>O. fasciatus</i> em diferentes U.R.....	32
4.5 Comparação da perda de peso e da taxa respiratória em ovos de <i>Oncopeltus fasciatus</i>	33
4.6 Perspectiva: estudo higropreferência do estágio de vida do ovo.....	34
5 Discussão.....	36
6 Conclusão.....	40
7 Referências Bibliográficas.....	41

Resumo

A vida no planeta se originou na água e a terrestrialização foi um dos grandes eventos que marcaram a evolução dos organismos na terra. Os insetos possuem diversas adaptações para viver nos mais variados habitats, mas alguns fatores ecológicos e climáticos afetam a distribuição e frequência deles, como a disponibilidade de água, essencial para a sobrevivência de qualquer ser vivo terrestre. Assim, é importante a compreensão das respostas dos insetos a alterações na disponibilidade hídrica e a capacidade fisiológica de lidar com esse tipo de estresse. As previsões de alterações climáticas globais com cenários de aumento da temperatura, menor disponibilidade hídrica e secas severas podem afetar diretamente os insetos. No estágio de vida de ovo a perda de água ocorre principalmente em função da respiração e a sua regulação hídrica se dá por intermédio de mecanismos distintos de outros estágios de vida. Esses mecanismos são ditados pela ecologia e fisiologia de cada espécie, como por exemplo o cuidado parental e a melanização da casca do ovo. O percevejo *Oncopeltus fasciatus* possui ampla distribuição geográfica, deposita seus ovos na superfície de plantas e é facilmente mantido em laboratório. A embriogênese dessa espécie já foi descrita, porém não existem dados na literatura sobre as relações hídricas em seus ovos, cujo entendimento é o objetivo desse projeto. Foram realizados acompanhamentos fotográficos dos ovos ao longo da embriogênese e eclosão, em seguida foram analisadas a viabilidade e perda de peso dos ovos em diferentes condições hídricas. A viabilidade foi observada em 4,5; 29; 74 e 99% de Umidade Relativa (U.R.), além de uma condição de U.R. que variou ao longo do dia e uma condição de inundação. A perda de peso foi avaliada nas condições de 4,5, 75 e 99% de U.R.. Ocorre uma substancial sobrevivência dos ovos de *O. fasciatus* em diferentes condições hídricas, apresentando maior viabilidade em 75 e 99% de U.R., em faixas hídricas distintas das existentes para ovos do besouro *Tribolium castaneum* e da mosca *Drosophila melanogaster*. Os ovos de *O. fasciatus* apresentam retração da casca durante o desenvolvimento embrionário. O ovo consegue se desenvolver em amplas faixas de disponibilidade hídrica e perdem peso ao longo da embriogênese, com maior perda ocorrendo em menores U.R.

Abstract

Life on the planet originated in water and terrestrialization was one of the great events that marked the evolution of organisms on earth. Insects have several adaptations to live in the most varied habitats, but some ecological and climatic factors affect their distribution and frequency, such as the availability of water, essential for the survival of any terrestrial living being. Thus, it is important to understand the responses of insects to changes in water availability and the physiological capacity to deal with this type of stress. Forecasts of global climate change with scenarios of rising temperatures, lower water availability and severe droughts can directly affect insects. In the egg life stage, water loss occurs mainly as a function of respiration and its water regulation occurs through different mechanisms of other life stages. These mechanisms are dictated by the ecology and physiology of each species, such as parental care and eggshell melanization. The milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* has a wide geographic distribution, lays its eggs on the surface of plants and is easily maintained in the laboratory. The embryogenesis of this species has already been described, but there is no data in the literature on the water relations in its eggs, whose understanding is the objective of this project. Photographic follow-ups of the eggs were carried out during embryogenesis and hatching, then the viability and weight loss in eggs under different water conditions were analyzed. Viability was observed at 4.5; 29; 74 and 99% Relative Humidity (R.H.), plus a R.H. which varied throughout the day and a flood condition. Weight loss was evaluated under conditions of 4.5, 75 and 99%. There is a substantial survival of *O. fasciatus* eggs in different water conditions, with higher viability in 75 and 99% of R.H., in different water ranges. existing for eggs of the beetle *Tribolium castaneum* and the fly *Drosophila melanogaster*. *O. fasciatus* eggs show shell retraction during embryonic development. Eggs are able to develop in wide ranges of water availability and lose weight throughout embryogenesis, with greater loss occurring in lower R.H.

1. Introdução

1.1 Os insetos, sua diversidade e importância

A classe Insecta (Arthropoda: Hexapoda) constitui o grupo animal predominante em número de espécies, correspondendo a cerca de dois terços de todos os animais conhecidos (Zhang, 2011); atualmente, mais de um milhão de espécies de insetos já foram descritas. Alguns dos principais fatores responsáveis pela alta riqueza e abundância do grupo são a presença de uma cutícula impermeável, um sistema nervoso complexo, tamanho corpóreo variando de 0,2 a 35 cm de comprimento, capacidade de vôo e altas taxas reprodutivas (Chapman, 2013). Apesar de algumas espécies possuírem alta taxa de especialização (como alguns polinizadores), o grupo é caracterizado por um grande número de espécies generalistas. É um grupo que possui ampla diversidade fisiológica, ecológica e distribuição geográfica, tendo como principal fator dessa diversidade a alta capacidade de especiação (Grimaldi e Engel, 2005).

Os insetos possuem grande importância ecológica por participarem de serviços ecológicos essenciais atuando em prol de diversas espécies vegetais, sendo os principais agentes polinizadores de mais de 250.000 espécies de plantas e polinizam grande quantidade das espécies cultivadas comercialmente em todo o mundo (Allsopp et al., 2008, Chapman, 2013). Também atuam diretamente na ciclagem de matéria orgânica, se alimentando de detritos vegetais, outros insetos, carcaças de outros animais e servindo de alimento para outras espécies. Alguns insetos são pragas agrícolas, sendo responsáveis pelo comprometimento de aproximadamente um sexto da safra produzida em todo o mundo. Outros atuam como vetores de agentes etiológicos de doenças, bioindicadores de saúde de ecossistemas ou parasitas de outros organismos (Price et al., 2011; Harrison et al., 2012; Chapman, 2013).

1.2 Fatores relacionados às condições hídricas

Muitos fatores ambientais como as condições climáticas atuam como barreiras que limitam a capacidade de sobrevivência de alguns organismos quando estas condições se encontram desfavoráveis para os mesmos. Essas barreiras influenciam a distribuição das espécies, assim como a herdabilidade genética que determinam as barreiras a níveis evolutivos, que pode indicar baixa plasticidade fenotípica (Hoffmann e Blows, 1994).

As características do meio ambiente estão constantemente influenciando o desenvolvimento e a evolução de acordo com a aptidão de cada espécie (Bernays e Minkenberg, 1997). A umidade relativa é um fator limitante para ocorrência das espécies, tanto em condição de excesso quanto de escassez (Price et al. 2011). No contexto das mudanças ambientais globais tem sido muito explorado o aumento da temperatura que acarreta em alterações nos padrões de precipitação e disponibilidade hídrica, menor U.R. e maior perda de água pelo organismo. De acordo com a análise de modelos matemáticos, os extremos de precipitação se intensificam em resposta ao aquecimento do clima (Dore, 2005; O`Gorman, 2015).

A disponibilidade de água é essencial para qualquer organismo sobreviver no ambiente ao qual faz parte, principalmente por ser um fator influenciador direto na riqueza, abundância e padrões de distribuição desses organismos no ambiente (Hadley 1994). Dessa forma é importante o estudo dos impactos das alterações da disponibilidade hídrica e a compreensão das respostas dos insetos e a capacidade fisiológica deles em lidar com essas alterações e estresses.

1.3 Terrestrialização dos insetos e suas relações hídricas

A vida no planeta se originou na água, onde surgiram os primeiros organismos multicelulares e o processo de terrestrialização foi um dos grandes eventos que marcaram a evolução dos organismos na terra (Oparin et al., 1957). Estima-se que os primeiros organismos que conquistaram o ambiente terrestre foram as plantas e miríapodes no final do período Cambriano (510 à 490 MYA) seguido dos insetos e aracnídeos no início do período Ordoviciano (480 à 470 MYA). Nesse processo os organismos precisaram lidar com fatores ecológicos diferentes do ambiente aquático, como menor disponibilidade de água no ambiente (Rota-Stabelli et al., 2013). Como detalhado acima, a Classe insecta é o grupo de animais que obtiveram maior sucesso evolutivo no ambiente terrestre (Grimaldi e Engel, 2005; Brusca et al., 2018) e esse processo resultou em uma grande diversidade de espécies. Cerca de 90% dos insetos possuem todo o ciclo de vida no ambiente terrestre, enquanto que 10% (aproximadamente 100.000 espécies) possuem parte ou todo o ciclo de vida no ambiente límnetico ou de água salgada (Chapman, 2013; Selden, 2016), indicando um retorno ao ambiente aquático.

A água é uma substância essencial para a vida, atuando como um elemento chave na evolução e funcionamento dos ambientes terrestres. A água também é

determinante para o sucesso dos organismos na terra, principalmente por ser um solvente para diversas reações bioquímicas e atuar na regulação homeostática dos seres vivos (Edney, 1977; Hadley, 1994).

Os insetos de vida terrestre precisam lidar com o baixo suprimento de água no ambiente em relação aos insetos aquáticos, sendo esta uma condição que favorece a dessecação (Hadley, 1994). O percentual de composição de água do corpo varia entre 40 e 90% do peso total do inseto e essa variação ocorre em relação a populações, espécies, indivíduos e até mesmo nos diferentes estágios do desenvolvimento (Chown e Nicolson, 2004).

Nos estágios pós-embriónarios dos insetos a perda de água pode ocorrer através da respiração, transpiração pela superfície do corpo e excreção. Dependendo da espécie as seguintes proteções fisiológicas contra a perda excessiva de água podem ocorrer: um exoesqueleto eficiente com camadas hidrofóbicas, espiráculos respiratórios, eficiente sistema excretor, a ingestão de água via oral e migração para locais que possuem condições favoráveis, mais úmidas (Hadley, 1994; Price et al., 2011; Chapman, 2013). Destaca-se as camadas cuticulares do exoesqueleto que desempenham grande papel nas relações hídricas em insetos, e de acordo com a espécie nota-se diferenças na composição e permeabilidade dessas camadas, que aumentam ou diminuem a capacidade de retenção de água pelo organismo (Hadley et al. 1986; Lockey, 1988).

1.4 O ovo e sua importância ecológica e evolutiva

O estágio de vida do ovo possui grande importância evolutiva no processo de terrestrialização dos insetos, pois as adaptações iniciais que possibilitaram a vida fora da água tiveram também que ocorrer, necessariamente, nessa etapa; e isso possibilitou a expansão do número de espécies e colonização de diversos nichos (Zeh et al., 1989). Sabe-se que de maneira geral o estágio de ovo possui diferentes estratégias para lidar com variações de temperatura e umidade relativa em relação aos estágios pós-embriónarios, posto que o ovo é imóvel e está dependente das variações ambientais (Hinton, 1981). A casca do ovo é a estrutura de transição entre o ambiente externo e o embrião, que confere proteção contra predadores e microorganismos patogênicos e também em relação a variações ambientais de temperatura, insolação e estresses hídricos de dessecação ou inundaçāo (Zeh et al., 1989; Rezende et al., 2016).

O ovo pode ser considerado o estágio de vida inicial pois é nele que o novo indivíduo irá se formar, através da embriogênese. Todos os ovos de inseto, assim que são postos, contém todos os nutrientes para suportar a embriogênese e em alguns casos também suportam os primeiros ínstars, após o organismo sair do ovo (Resh e Cardé, 2009). Também possuem importância médica pois se algum agente patogênico (como um vírus de alta letalidade para os humanos, por exemplo) for transmitido verticalmente (isto é, da fêmea para o ovo), isso significa um grande risco para outros organismos devido à alta reprodutibilidade da maioria dos insetos (Beament, 1989).

Os ovos de insetos possuem grande importância ecológica. Por serem ricos em nutrientes servem como fonte de alimento para muitos organismos, além de serem hospedeiros de parasitas e parasitóides. Algumas espécies podem suspender temporariamente o desenvolvimento embrionário em resposta a condições ambientais adversas, sendo essa suspensão facultativa (quiescência) ou obrigatória (diapausa) (Hinton, 1981; Resh e Cardé, 2009).

Insetos adultos protegem os ovos de diversas formas como: cuidado parental (de forma mais ou menos ativa, dependendo da espécie), buscando ovipositor locais que podem possuir menos estresses bióticos e abióticos, exalando químicos ou toxinas como forma de repelir predadores para evitar possíveis ataques aos ovos e escurecimento facultativo dos ovos (possivelmente para proteger contra predadores ou raios ultravioleta do Sol) (Resh e Cardé, 2009; Abram et al., 2015). Outros mecanismos de proteção contra predadores é através da coloração do ovo, através de estratégias como: mimetismo, camuflagem, coloração disruptiva, cípsis e aposematismo (Hinton, 1981; Guerra- Grenier, 2019). Ovos de espécies que não possuem cuidado parental ou investimentos parentais como os descritos acima, tornam-se mais expostos a variação de temperatura e umidade relativa do ambiente e/ou estresses bióticos.

Todos os ovos de insetos postos fora da água estão sujeitos a desidratação e a principal forma de perderem água é através da respiração, pois pelos mesmos caminhos em que o oxigênio entra e o gás carbônico sai, há perda de água. Portanto, as diferentes camadas da casca possibilitam a realização das trocas gasosas enquanto minimizam a perda de água. Já os ovos que são postos na água ou em ambiente muito úmido também possuem a capacidade de absorver água através da casca (Hadley, 1994). Independente do local onde o ovo é posto, várias

espécies possuem estruturas ou passam por processos que são capazes de conferir resistência à dessecação (Hadley, 1994; Chapman, 2013). Algumas dessas formas de evitar a perda de água, dependendo da espécie são: secreção, por parte da mãe, de um fluido que envolve os ovos, oviposição agrupada dos ovos, processo de melanização da casca do ovo, a existência de um ou dois tecidos extra embrionários e também a secreção, durante a embriogênese de uma matriz extracelular chamada cutícula serosa (Hinton, 1981; Zeh et al., 1989; Gordon e Headrick, 2001; Jacobs et al., 2013; Wong et al., 2013; Rezende et al., 2016; Farnesi et al., 2017; Vargas et al., 2020).

De acordo com estudos realizados pelo grupo do professor Gustavo Rezende, dentro do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos, LQFPP, UENF e por outros grupos, a formação da cutícula serosa diminui a perda de água do ovo, nos insetos que a possuem (Rezende et al. 2016). Isso ocorre no besouro *Tribolium castaneum* em que é possível remover a presença da cutícula serosa através de silenciamento gênico: ovos selvagens sobrevivem em baixa umidade relativa, enquanto ovos sem a cutícula serosa são inviáveis nessa condição (Jacobs et al., 2013). Em paralelo, foi observado que ovos selvagens de *T. castaneum* são naturalmente resistentes contra a perda de água: tanto os ovos que se desenvolvem em umidade relativa "normal" e baixa (73 e 14% UR, respectivamente) perdem água ao longo da embriogênese, com maior taxa de desidratação no ambiente mais seco (Figura 1). Apesar disso, a viabilidade dos ovos em ambas as condições é alta, de aproximadamente 80% (Santos e Rezende, dados não publicados).

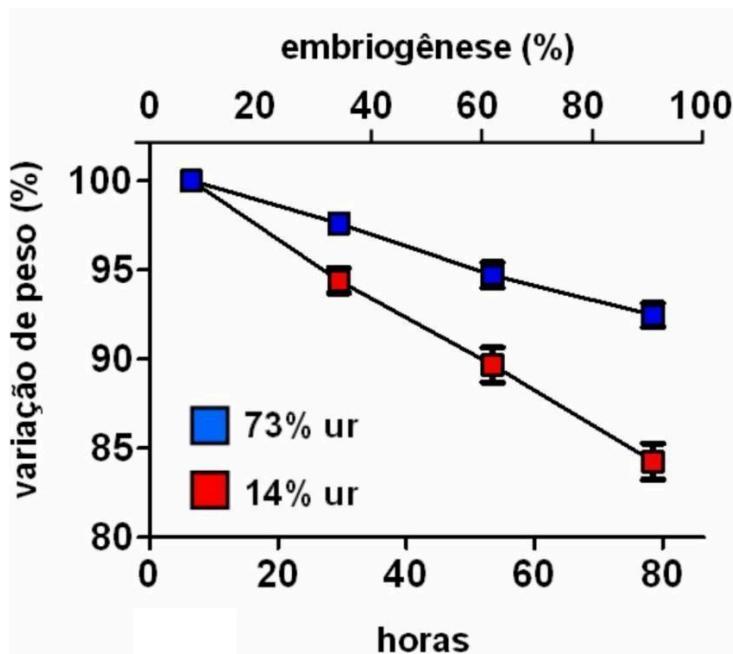


Figura 1: Ovos de *Tribolium castaneum* mantidos em baixa umidade relativa perdem mais água. Grupos de ovos foram pesados ao longo da embriogênese que dura cerca de 86 horas. Todas as pesagens foram realizadas em condição de 73 ou 14% U.R.. Cada ponto é a média \pm erro padrão. 972 ovos foram empregados nessas análises em 5 experimentos independentes (três destes com três réplicas cada, e dois destes com pelo menos uma réplica cada). Dados de Santos e Rezende (não publicados).

1.5 A espécie *Oncopeltus fasciatus* e sua ecologia

A família Lygaeidae pertence à ordem Hemiptera e subordem Heteroptera. É uma das três famílias dessa subordem com maior número de espécies, apresentando mais de 4.000 descritas, sendo encontradas em todos os continentes exceto na Antártica (Sweet, 2000). Insetos da família Lygaeidae possuem grande importância econômica principalmente por serem consideradas pragas agrícolas. A família possui uma característica ecológica marcante: o comportamento de canibalismo de ovos, em que por vezes o número de ovos canibalizados possui a mesma proporção de ovos inférteis e ovos parasitados em uma ninhada, tendo esse comportamento um caráter adaptativo (Ralph, 1976). Essa família apresenta outras características como o aposematismo e mimetismo, e coevolução com endossimbiontes (Burdfield-Steel e Shuker, 2014).

Dentro da família Lygaeidae a espécie *Oncopeltus fasciatus*, também conhecida como “percevejo da serralha” ou em Inglês como *Milkweed bug*, é de fácil manipulação em laboratório, o que resultou em muitos estudos sobre a biologia da espécie, particularmente sobre sua ecologia evolutiva e comportamento sexual (Feir, 1974). Além disso, *O. fasciatus* teve recentemente o seu

genoma sequenciado, possibilitando assim a utilização de ferramentas moleculares como o silenciamento gênico via RNAi para a compreensão dos papéis fisiológicos e ecológicos de genes específicos (Panfilio et al., 2019).

Esse percevejo possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo do sul do Canadá até a América Central, habitando regiões tropicais e temperadas. Apesar do canibalismo descrito, possui aparelho bucal picador-sugador e seu ciclo de vida na natureza está relacionado às sementes das ervas daninhas da família Asclepiadaceae. Algumas espécies dessa família de plantas crescem em baixa densidade como *Asclepias tuberosa*, *Asclepias viridiflora* e *Asclepias lanceolata*, o que dificulta o desenvolvimento de *O. fasciatus* quando associado a essas espécies. A espécie *Asclepias syriaca* é onde o *O. fasciatus* possui maior ocorrência e houve uma adaptação a alimentação, abrigo e oviposição ao habitat dessa espécie.

As sementes de *A. syriaca* ficam localizadas em vagens que possuem 6 a 13 centímetros de comprimento, e o comprimento da planta varia de 90 a 150 centímetros de altura. Essa espécie vegetal pode formar adensamentos com vários indivíduos, locais que o *O. fasciatus* busca devido à maior abundância de alimento (Ralph, 1977). No entanto, o percevejo se adaptou de forma que as ninfas não dependessem exclusivamente da disponibilidade de sementes de *A. syriaca*. Esse comportamento é um indício que a espécie retém adaptabilidade para lidar com diferentes pressões ecológicas (Ralph, 1976; Dingle et al., 1988).

A. syriaca possui em sua composição moléculas chamadas cardenolídeos que são glicosídeos cardiotônicos, substâncias que atuam diretamente sobre o músculo cardíaco, adquirindo caráter tóxico para pássaros e outros organismos. Os insetos que se alimentam dessa planta absorvem essas substâncias que são armazenadas e utilizadas ou direcionadas aos ovos através do armazenamento nos oócitos, como nos percevejos *O. fasciatus* e *Caenocoris nerii*, na borboleta *Danaus plexippus*, entre outros. As substâncias permanecem nos tecidos durante a metamorfose, mantendo a coloração ao longo de todos os estágios de vida (Hinton, 1981; Duffey e Scudder, 1974).

A espécie *O. fasciatus* possui desenvolvimento hemimetábolo, ou seja, assim que a ninfa eclode do ovo já possui características morfológicas que os tornam semelhantes aos adultos (Figura 2). Indivíduos do primeiro ao quinto ínstar encontram maior dificuldade na alimentação devido à parede espessa das

sementes de *A. syriaca*, e apresentam um comportamento gregário como forma de aumentar a eficiência alimentar (Ralph, 1976). As ninfas recém eclodidas e todos os ínstars, até o estágio adulto, possuem a coloração laranja e preto. Juntamente com a coloração, o comportamento de agregação pode estar relacionado à amplificação do alerta de perigo para predadores, simultaneamente tornando mais eficaz a estratégia para aumentar a eficiência alimentar de ninfas. Em condições naturais os ovos são depositados principalmente na superfície de folhas da planta *Asclepias syriaca* em grupos que podem variar de 5 a 50 ovos, possuindo maior eficiência em número de ovos no segundo acasalamento (Martinez et al., 2013).

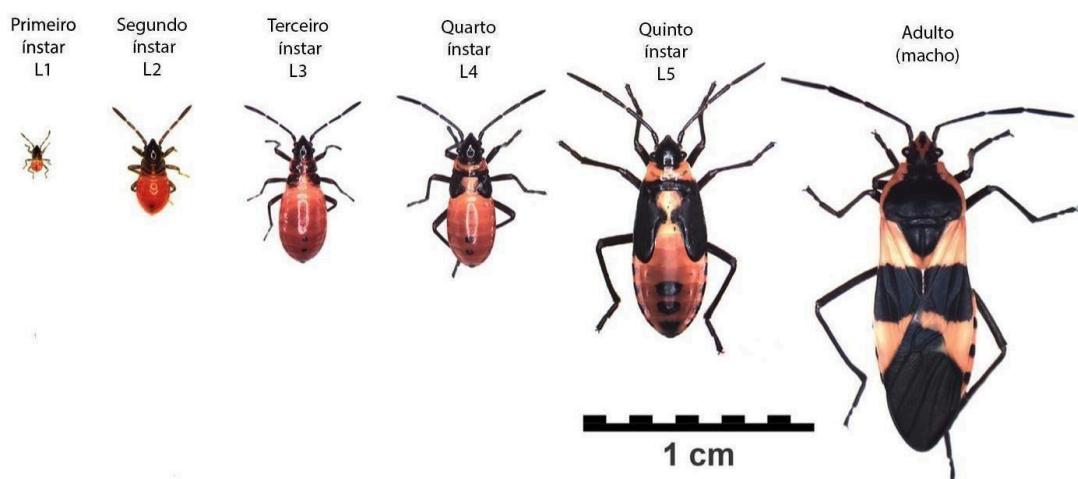


Figura 2: *Oncopeltus fasciatus* em diferentes estágios do ciclo de vida. Adaptado de *Bugs in our backyard*, disponível em: <https://www.bugsinourbackyard.org/wp-content/uploads/2014/12/BIOBKeeping-Milkweed-Bugs.pdf>

A temperatura influencia diretamente no comportamento da espécie. A condição de temperatura ideal é de aproximadamente 27 °C e umidade relativa em torno de 75% (Feir, 1974). Em casos de mudanças de temperatura que fogem da condição ideal, algumas populações com características migratórias podem migrar para regiões com condições mais favoráveis. Já em baixa temperatura os insetos podem se agrregar a fim de manter a temperatura corporal (Sauer e Feir, 1973).

1.6 O ovo de *Oncopeltus fasciatus*

Os ovos de *O. fasciatus* possuem cerca de 1,4 mm de comprimento e 0,6 mm de largura, em laboratório são postos em grupos de 10 a 30 e sem organização aparente. Imediatamente após a postura os ovos apresentam

coloração levemente amarelada e escurece gradativamente, de acordo com o aumento da pigmentação da epiderme, para um tom intenso de laranja avermelhado (Dorn, 1976).

Na extremidade anterior do ovo é onde localiza-se as micrópilas, que são os canais por onde os espermatozoides entram para a fertilização do ovo. Presumivelmente também são estruturas relacionadas com a respiração, visto que a espécie não possui a estrutura especializada para essa função descrita em outros ovos, os aerópilos. A casca do ovo é composta por diversas camadas, sendo a mais externa uma camada de cera (Figura 3).

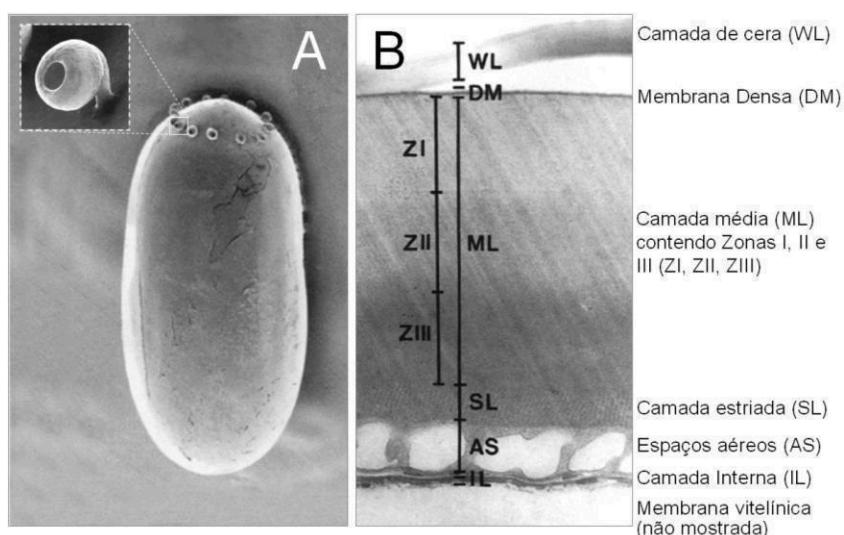


Figura 3: Micrografias eletrônicas do ovo de *Oncopeltus fasciatus*. (A) Microscopia eletrônica de varredura mostrando a superfície do ovo com anel de micrópilas na região anterior. Inseto: micrópila individual. (B) Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando a estrutura da casca, composta de diversas camadas, sendo a mais externa a camada de cera (WL). Não há uma diferenciação clara entre exocórion e endocórion. Adaptado de Dorn, 1976.

A embriogênese total em ovos incubados a 25 °C leva cerca de 165 horas (~ 7 dias) e os diversos estágios embrionários (e.g. formação do blastoderma, diferenciação dos tecidos extra-embryonários, extensão e retração da banda germinal, katatrepsis, blastocinese e fechamento dorsal) já foram descritos previamente (Lin et al., 1954; Dorn, 1976; Panfilio et al., 2006).

Conforme descrito mais acima, existe um entendimento de que o processo de respiração dos ovos dos insetos terrestres acarreta em perda de água durante o desenvolvimento embrionário (Hinton, 1981, Figura 1). Em ovos do *O. fasciatus* o consumo de oxigênio (O₂) é relativamente estável até 30% da embriogênese, quando ocorre um aumento gradual de consumo de O₂ até aproximadamente 70%

do desenvolvimento embrionário, na temperatura de 25 °C (Rutschky e Joseph, 1957; Richards e Suanraksa, 1962). Ainda não é conhecida a ecologia das relações hídricas durante o desenvolvimento embrionário do *O. fasciatus* nem a capacidade fisiológica dos ovos dessa espécie sob estresses de disponibilidade de água.

2. Objetivo geral

Acompanhar e avaliar os processos de embriogênese e eclosão do percevejo *Oncopeltus fasciatus* com ênfase nas relações hídricas.

2.1 Objetivos específicos

- Gerar um registro visual da embriogênese;
- Gerar um registro visual do processo de eclosão;
- Avaliar a viabilidade de ovos de *O. fasciatus* desenvolvidos em diferentes regimes de disponibilidade hídrica;
- Determinar a variação de perda de peso dos ovos, sob diferentes regimes de umidade relativa.

3. Material e Métodos

3.1 Manutenção da criação de *Oncopeltus fasciatus*

Espécimes de *O. fasciatus* são mantidos no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP), Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB), UENF, em potes de plástico grandes (30 x 15 cm) em câmara climatizada da marca EletroLab EL202/5 com fotoperíodo (12h de claro x 12h de escuro) a 27 ± 1

°C, onde apresentam maior taxa de sobrevivência (Feir 1974), e umidade relativa de cerca de 75%. Todos os estágios de vida pós-embriônica (i.e. ninfas dos diferentes estágios e adultos) possuem acesso à água filtrada colocada em frasco Erlenmeyer com um pano de papel toalha dobrado e se alimentam de sementes de girassol sem casca obtidas em comércio local. Algodão seco é empregado como substrato para oviposição e rolos de papelão (miolo de papel higiênico ou papel toalha) servem como locais para refúgio e agregação das formas imaturas (Figura 4).

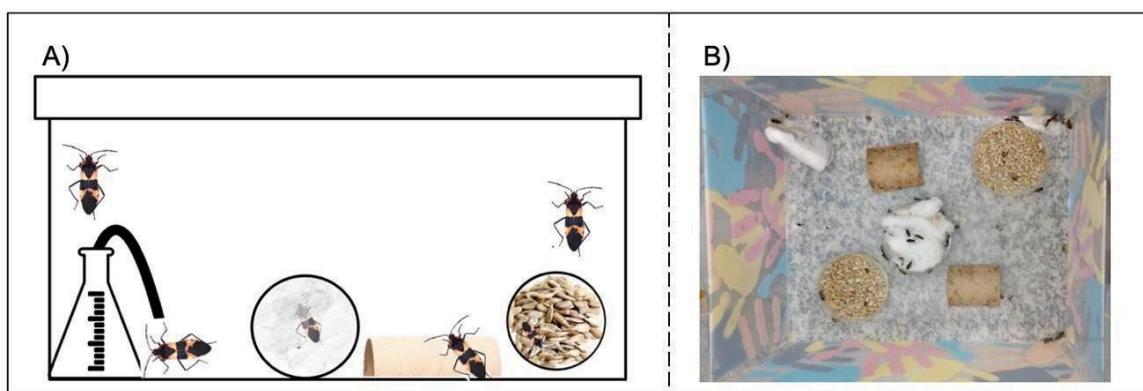


Figura 4: Caixa de criação em laboratório dos *Oncopeltus fasciatus*. A) Ilustração contendo os itens mostrados da esquerda para a direita: frasco Erlenmeyer com um pano de papel toalha, placa de Petri com algodão seco, rolo de papelão e placa de Petri com sementes de girassol. B) Imagem real de vista superior da caixa de criação.

3.2 Postura de ovos

Indivíduos adultos são mantidos a 27 ± 1 °C em estufa, conforme descrito acima. Os ovos que serão empregados nos experimentos são obtidos colocando-se um algodão novo, limpo e seco, em uma placa de Petri dentro do recipiente de plástico onde a criação de adultos é mantida. É esperado 6 horas para que as fêmeas realizem a postura dos ovos. Após esse período a placa de Petri contendo o

algodão é removida do recipiente e os ovos (com idade entre 0 e 6 horas) são removidos do algodão e manipulados com auxílio de um pincel com cerdas finas. Os ovos são contados utilizando um contador e em seguida colocados em um único recipiente para a aleatorização dos mesmos, o tempo médio desse processo até o início dos experimentos é 2h. Dessa forma, a idade dos ovos quando se iniciava os experimentos era de 2 à 8h. O tempo total de embriogênese desta espécie dura aproximadamente 6 dias (cerca de 156 horas) em temperatura de 27 °C (Lin et al., 1954), portanto no início de cada experimento os ovos possuíam idade de 1,3 a 5,1% de desenvolvimento embrionário total.

3.3 Captura de imagens digitais da embriogênese completa

Ovos recém-postos (com idade de 2 - 8 horas) são colocados diretamente em placas de Petri com um fundo uniforme de cor azul e iluminados constantemente com uma lâmpada fluorescente branca. Os ovos são observados em lupa no aumento máximo de 63x e imagens digitais são obtidas com auxílio do *smartphone* da marca Samsung, modelo Galaxy S7 Edge com câmera interna com resolução de 12 megapixels. O *smartphone* foi acoplado à lente ocular da lupa através do adaptador universal NexYZ da marca Celestron, com controle nos três eixos (x, y e z). Através do aplicativo OpenCamera para sistema Android o *smartphone* foi programado para fazer capturas de imagem com intervalos fixos de 2 horas, com foco travado, velocidade do obturador de 1/15, abertura do diafragma f/1,7 e distância focal 4,2 mm.

A iluminação local foi mantida constante e de mesma intensidade durante todo o experimento, que durou 6 dias. O datalogger Amprobe TR200-A foi alocado ao lado da placa Petri e foram realizados registros de temperatura e umidade relativa a cada 2 horas. As imagens geradas possuem resolução de 3024 × 4032 pixels, foram tratadas individualmente no programa Adobe Photoshop quanto ao brilho e em seguida foram gerados vídeos no programa Adobe Premiere.

3.4 Preparação das câmaras de umidade relativa

Foram designadas quatro condições experimentais de umidade relativa (U.R.) constante: 4,5, 29, 74 e 99%. Em todas essas condições as câmaras foram mantidas em estufa climatizada EletroLab EL202/5 a 27 °C. Papel filtro (Whatman Nº 01 circular de 150 mm de diâmetro) foi cortado em formato circular com diâmetro

de 100 mm para que encaixasse na placa de Petri de vidro de forma a cobrir toda a superfície do fundo, gerando maior aderência dos ovos a fim de evitar agrupamento dos mesmos. Cada placa de Petri foi colocada em cada uma das câmaras de U.R. Em cada réplica de cada experimento, um número de ovos que variou entre 37 e 154 indivíduos foram distribuídos de forma igualitária em cada papel filtro sobre placa de Petri.

3.4.1 Sistema de U.R. de 4,5%:

Para a obtenção da U.R. de 4,5%, foram utilizados 2 kg de sílica em gel previamente seca em estufa a 100 °C por 12 horas, em seguida colocada em um recipiente de vidro circular (10 x 20 cm). A placa de Petri contendo os ovos sobre o papel filtro é inserida no pote de vidro contendo sílica, juntamente com um datalogger Amprobe TR200-A que registra umidade relativa e temperatura a cada 2 horas. Em seguida esse a tampa desse pote contendo a sílica gel, ovos e datalogger é vedada com parafina plástica (Parafilm M).

3.4.2 Sistema de U.R. de 29%

Foi preparada uma solução de hidróxido de potássio (KOH) adicionando 358 g de KOH a 300 ml de água filtrada (Solomon 1951). O KOH juntamente com a água filtrada foram colocados em recipiente de vidro e homogeneizados com agitador magnético Corning PC-420. A solubilização do KOH é exotérmica e libera muito calor e, portanto, aguardou-se 40 minutos para a temperatura baixar. Em seguida a solução foi acrescentada a um recipiente de plástico retangular com boa vedação (13 x 16,5 x 21,5 cm de altura, largura e comprimento, respectivamente). Foram utilizadas bases de plástico fixas ao fundo para apoiar o datalogger Amprobe TR200-A e a placa de Petri contendo papel filtro e os ovos.

3.4.3 Sistema de U.R. de 74%:

Uma solução supersaturada de NaCl foi feita adicionando 300 g de NaCl em 600 mL de água que foi homogeneizada com agitador magnético e aquecimento na placa quente do Corning PC-420 (Winston e Bates 1960). Após 15 minutos de agitação foi acrescentado mais 50g de NaCl à solução supersaturada. Essa solução foi colocada em pote de plástico (13 x 16,5 x 21,5 cm de altura, largura e comprimento, respectivamente) e foram utilizadas bases de plástico fixas ao fundo para apoiar o

datalogger Amprobe TR200-A e a placa de Petri contendo papel filtro e os ovos. Avaliação da viabilidade em relação à manipulação dos ovos com pincel com o objetivo de avaliar se a manipulação dos ovos com pincel afeta a taxa de viabilidade, foi adicionada uma condição na umidade relativa de 74% em que houve pouca manipulação dos ovos. A partir dos resultados gerados observou-se que não houve diferença significativa entre as condições, portanto nos experimentos seguintes manteve-se a manipulação com pincel no início dos experimentos.

3.4.4 Sistema de U.R. de 99%

Foi utilizado o recipiente de plástico retangular de 13 x 16,5 x 21,5 cm bem vedado e foi acrescentado 2,4 L de água filtrada (Solomon, 1951). Antes do início do experimento, o sistema foi deixado com tampa aberta por 24h em estufa a 27 °C para igualar a temperatura da água e do ar a fim de evitar precipitação da água nos ovos durante o experimento. Em seguida, foram utilizadas bases de plástico fixas ao fundo para apoiar o datalogger Amprobe TR200-A e a placa de Petri contendo papel filtro e os ovos e o pote foi tampado para início do experimento.

3.4.5 Sistema de U.R. variável

Os ovos foram colocados no papel filtro em placa de Petri que em seguida foi colocada, junto do datalogger Amprobe TR200-A em pote de plástico sem tampa diretamente na estufa climatizada EletroLab EL202/5, onde foram submetidos a temperatura de 27 °C e condição variável de U.R. que ocorre naturalmente durante o funcionamento da estufa. Na estufa foram colocados 3 potes contendo água da torneira, sem tampa.

3.4.6 Sistema de inundação parcial dos ovos

Para a condição de ovos parcialmente inundados foi colocado 1 mL de água filtrada, com auxílio de uma pipeta, diretamente no papel filtro em placa de Petri em que os ovos foram colocados. A placa de Petri é tampada e vedada com Parafilm M para impedir a evaporação e saída de água do sistema. Os ovos ficaram parcialmente inundados, ou seja, com uma parte da sua superfície da casca e algumas micrópilas em contato com a água e outra parte em contato com o ar com alta umidade.

3.5 Avaliação da perda de peso

Barquinhas de papel alumínio foram confeccionadas com dimensões de 5,5 x 4 cm. Grupos de ovos com idade de 2 à 8 horas foram colocados diretamente nas barquinhas de alumínio onde passaram todo o período da embriogênese até a eclosão. Foram empregados aproximadamente 100 ovos em cada réplica nas condições de 4,5, 74 e 99% U.R. Foram realizadas medidas gravimétricas das barquinhas vazias e de forma individualizada, em seguida foram adicionados os ovos e pesados novamente. Os ovos com idade de 2 à 8h (chamado de “tempo zero”) tiveram os seus pesos iniciais registrados e em seguida foram colocados nas câmaras de U.R. Em intervalos fixos de 24 horas foram pesados até o quinto dia (~ 77% da embriogênese total). Todas as pesagens foram realizadas em balança analítica de precisão Shimadzu AY 220 de capacidade máxima de 220 g e capacidade mínima de 10m g. Após a pesagem no quinto dia de embriogênese os ovos foram mantidos nas câmaras de U.R. até a eclosão e em seguida foi analisada a viabilidade conforme descrito abaixo.

3.6 Viabilidade de ovos

Nesse item será apresentado como foi realizada a análise de viabilidade de todos os experimentos mencionados acima (viabilidade e perda de peso em diferentes condições de disponibilidade hídrica). O final da embriogênese era aguardado até o processo completo da eclosão das ninfas, que eram analisadas em lupa e fotografadas com auxílio de um smartphone Samsung, modelo Galaxy S7 Edge e adaptador universal NexYZ da marca Celestron e contadas com auxílio de um contador. As ninfas que não eclodiram até o sexto dia de embriogênese, eram mantidas nas condições experimentais por mais 24h. Ao final desse período todos os ovos eram retirados e analisadas em Lupa como citado acima para garantir que nenhum ovo de embriogênese mais lenta fosse deixado fora da análise. Nesses casos os ovos eram analisados individualmente a fim de identificar suas características.

3.7 Análises estatísticas

A Análise de Variância (ANOVA) ($P > 0,05$) one-way foi aplicada no experimento de influência da disponibilidade de água na viabilidade e eclosão dos

ovos, seguido pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey. Para o experimento de perda de peso foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA) ($P > 0,05$) two-way seguido pelo Teste de Comparação Múltipla de Tukey.

4 Resultados

4.1 Registro visual da embriogênese

Foram realizados três experimentos independentes em que se registrou, a cada duas horas, a embriogênese completa de *O. fasciatus*, desde logo após a oviposição até a eclosão das ninfas. O primeiro desses experimentos, com quatro ovos, está representado na Figura 5. Na apresentação oral da defesa será mostrado um vídeo obtido a partir dessas imagens. É possível observar uma mudança de coloração nos ovos: no momento em que são postos são amarelo claro e gradativamente escurecem para um tom laranja avermelhado. Também se observa a katatrepsis, o fechamento dorsal e o desenvolvimento de estruturas anatômicas nos tempos de 60, 62 e 66% de embriogênese, respectivamente, além de alterações no formato da casca (vide abaixo). Ao todo foram capturadas imagens de 14 ovos e destes, nove ovos eclodiram em um tempo total de embriogênese que variou entre 128 e 152 horas. A temperatura ambiente variou entre 23,1 e 29,9 °C e a umidade relativa ambiente foi mantida aproximadamente em 62%. Desses nove ovos viáveis, seis apresentaram alterações no formato do ovo (Tabela 1), que foram interpretados como uma retração da casca (Figura 5). Em 34 a 60% do desenvolvimento embrionário os ovos começaram a apresentar retração da casca, que perdura até 91 a 100%. ou seja, três ovos dos que eclodiram não apresentaram visualmente essa retração.

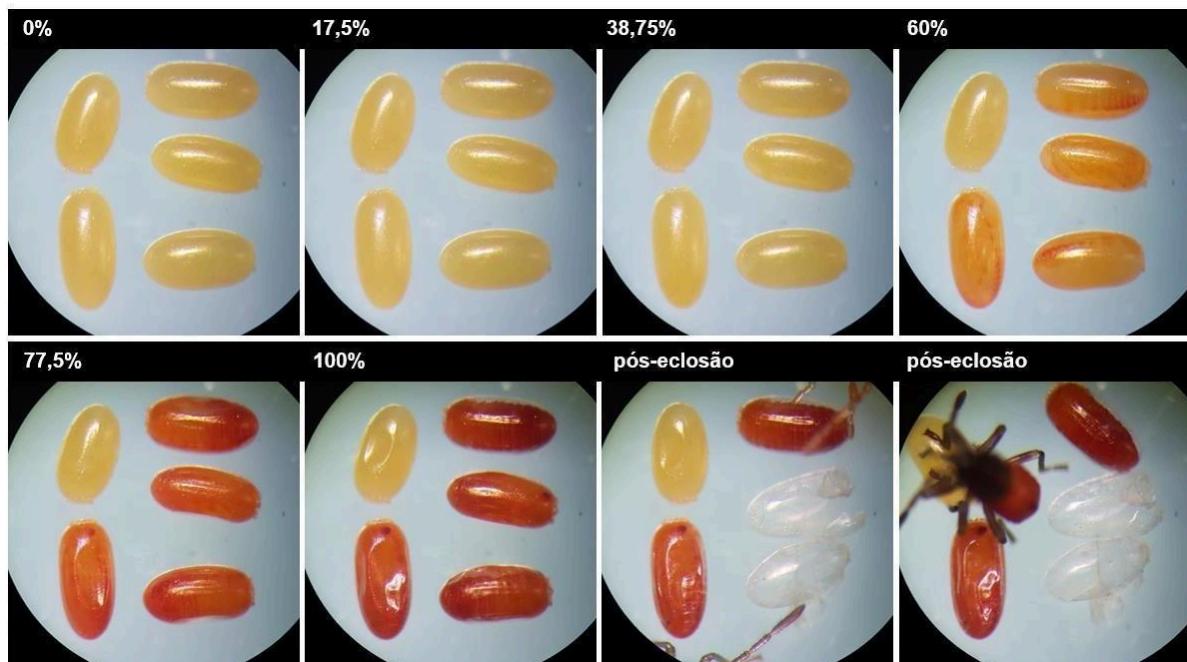


Figura 5: Visualização externa da embriogênese completa de *O. fasciatus*. Ovos que se desenvolveram a temperatura ambiente (24,8 a 28,3°C). Tempo total de embriogênese de 152 ± 3 h. Na sequência se evidencia a mudança na cor dos ovos, retração da casca de alguns deles, um ovo que não se desenvolveu e indício de canibalismo desse ovo por uma ninfa recém eclodida.

Tabela 1: Parâmetros relacionados com os ovos viáveis que apresentaram retração da casca. Foram utilizados ao todo 14 ovos nesse experimento dos quais 6 tiveram alteração de formato.

Indivíduo	Períodos da embriogênese relacionados com a contração da casca (horas - percentual)			Duração da embriogênese (horas - percentual)
	Início	Duração	Término	
1	54h - 34%	102h - 64%	156h - 98%	160h - 100%
2	58h - 37%	88h - 56%	146h - 94%	156h - 100%
3	71h - 54%	60h - 46%	127h - 97%	131h - 100%
4	73h - 56%	54h - 41%	127h - 97%	131h - 100%
5	88h - 55%	64h - 40%	160h - 100%	160h - 100%
6	90h - 56%	62h - 39%	160h - 100%	160h - 100%

4.2 Registro visual da eclosão

Também foram realizados registros fotográficos da saída da ninfa de dentro do ovo (Figura 6) A visualização do processo externo da eclosão da ninfa é iniciada pelo momento em que a parte mais superior da casca (parte dorsal) é rompida e finalizado quando ocorre a retirada completa de todas as seis pernas de dentro da cutícula embrionária. Esse processo dura aproximadamente 20 minutos. Na apresentação oral da defesa será mostrado um vídeo obtido a partir dessas imagens. Na apresentação oral da defesa será mostrado um vídeo do processo de eclosão.



Figura 6: Imagens externas do processo da eclosão de um ovo de *O. fasciatus*. O ovo registrado se desenvolveu em temperatura e umidade relativa ambiente, conforme descrito na Metodologia para a criação da espécie. Antes da casca ser rompida ocorrem movimentos de contração do embrião dentro do ovo (não mostrados aqui). Esses movimentos continuam durante o rompimento da casca e seguem durante a saída completa do corpo da ninfa de dentro da cutícula embrionária.

4.3 Influência da disponibilidade de água na viabilidade e eclosão dos ovos

A viabilidade e eclosão dos ovos foram avaliadas sob seis condições distintas de disponibilidade hídrica: quatro condições de umidade relativa (U.R.) constante (4,5, 29, 74 ou 99,9% U.R.), uma condição de umidade relativa variável, que mimetiza o regime ambiental encontrado na natureza (Halbritter, 2020) e uma condição de inundação parcial dos ovos, que mimetiza a situação hipotética de uma chuva seguida de um alagamento do sítio de oviposição. Em todos os experimentos, as quatro condições fixas tiveram a sua constância de U.R. mantida de forma satisfatória, com pouca variação, enquanto a condição ambiental variou entre 48 e 95% U.R. (Figuras 7 e 8).

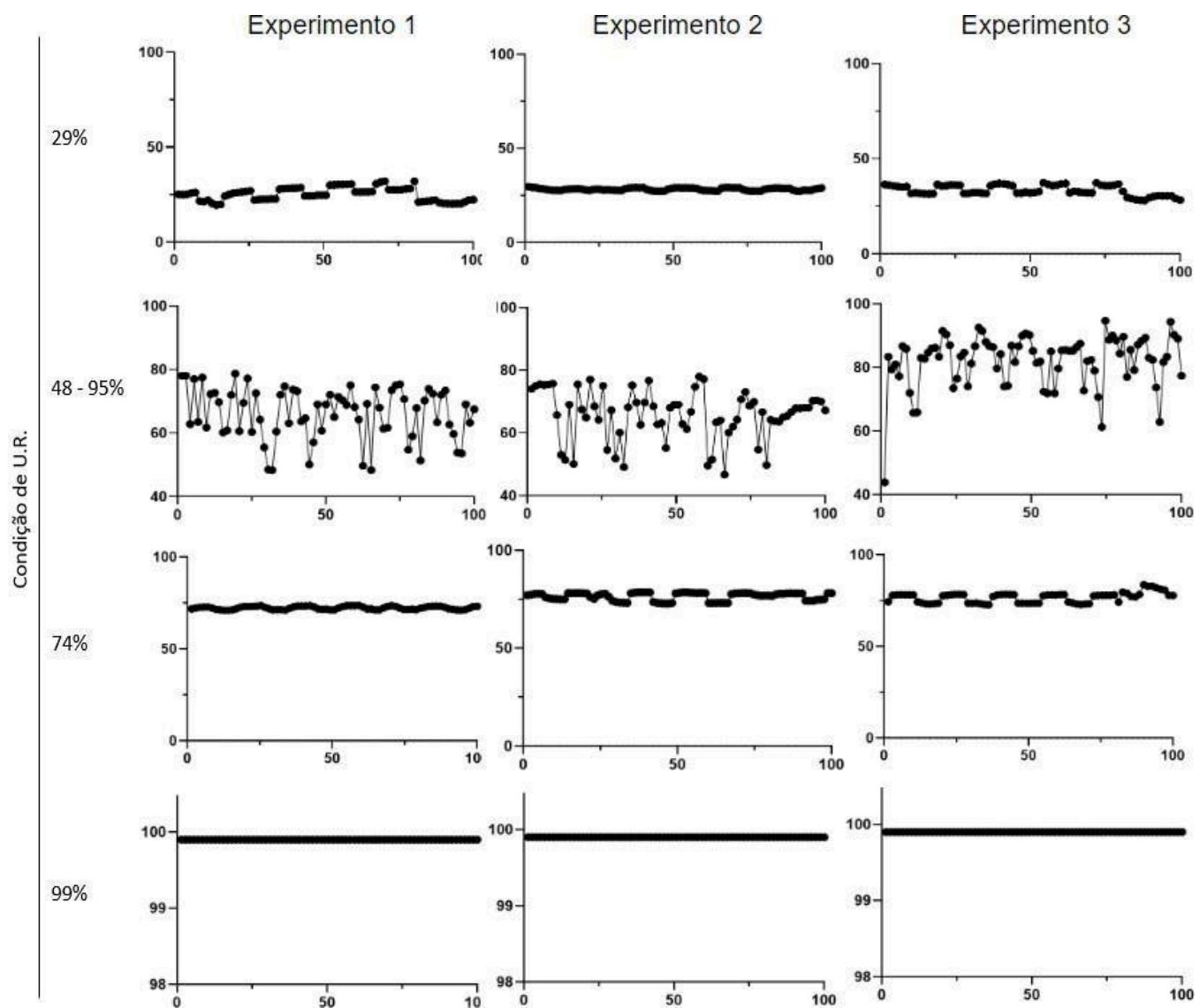


Figura 7: Gráficos da variação da Umidade Relativa nas diferentes câmaras ao longo do tempo.
 A variação na U.R. (eixo y) ao longo do tempo (eixo x) de cada experimento foi registrada. Cada coluna representa dados de experimentos independentes e cada linha a condição hídrica (29, condição variável de 48 a 95, 74 e 99,9%). Todas as condições de U.R. ficaram a 27 °C.

Condição de U.R. – 4,5%

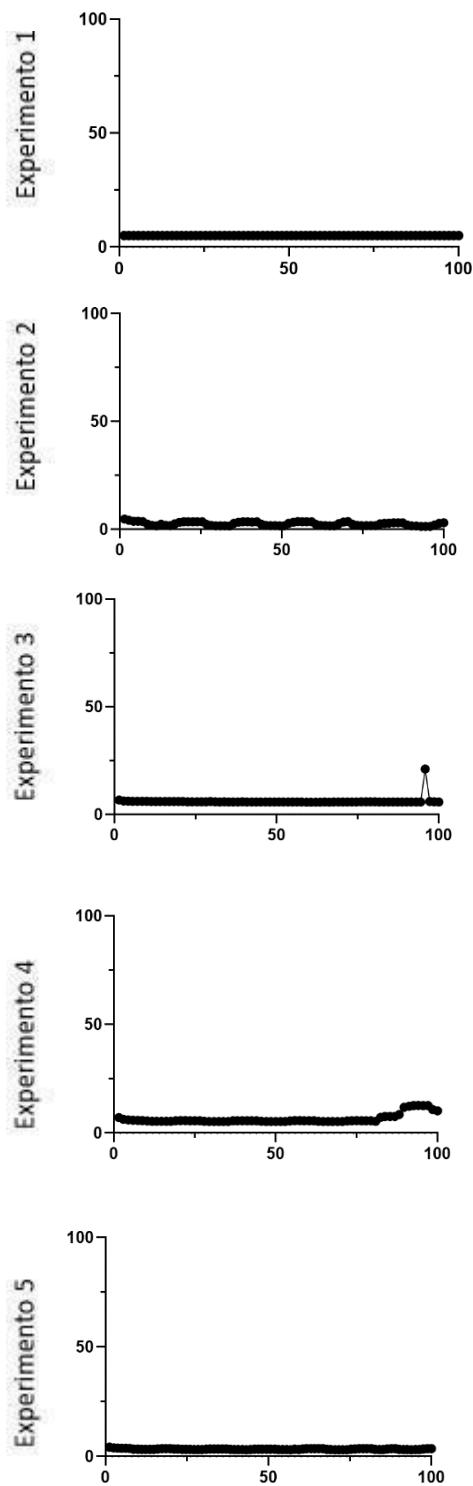


Figura 8: Gráficos da variação da Umidade Relativa na câmara de 4,5% ao longo do tempo. A variação na U.R. (eixo y) ao longo do tempo (eixo x) de cada experimento foi registrada. Cada linha representa um experimento independente em que todos foram mantidos a 27°C.

Cada condição experimental foi obtida em três réplicas biológicas independentes no tempo, com exceção das condições de 4,5% U.R. e inundação parcial que tiveram 5 réplicas. Em todos os casos as fêmeas realizaram oviposição por um período de 6 horas (que equivale a 5,5% da embriogênese total) em chumaço de algodão seco, na condição da criação, em umidade relativa de ~ 65%. Em seguida, os grupos de ovos com idade entre 2 e 8 horas foram transferidos para as distintas condições de disponibilidade hídrica e aí mantidos até o fim da embriogênese e eclosão. A viabilidade (Figura 9) foi considerada quando a ninfa se desprende completamente da casca do ovo. Nas condições de U.R. constante de 29, 74 e 99,9% e de U.R. variável, as taxas de viabilidade foram elevadas, sempre acima de 80%. Já nas condições extremas de 4,5% U.R. e inundação a viabilidade cai significativamente ($P<0,0001$) quando comparado às outras condições, com valores de 43 e 44%, respectivamente.

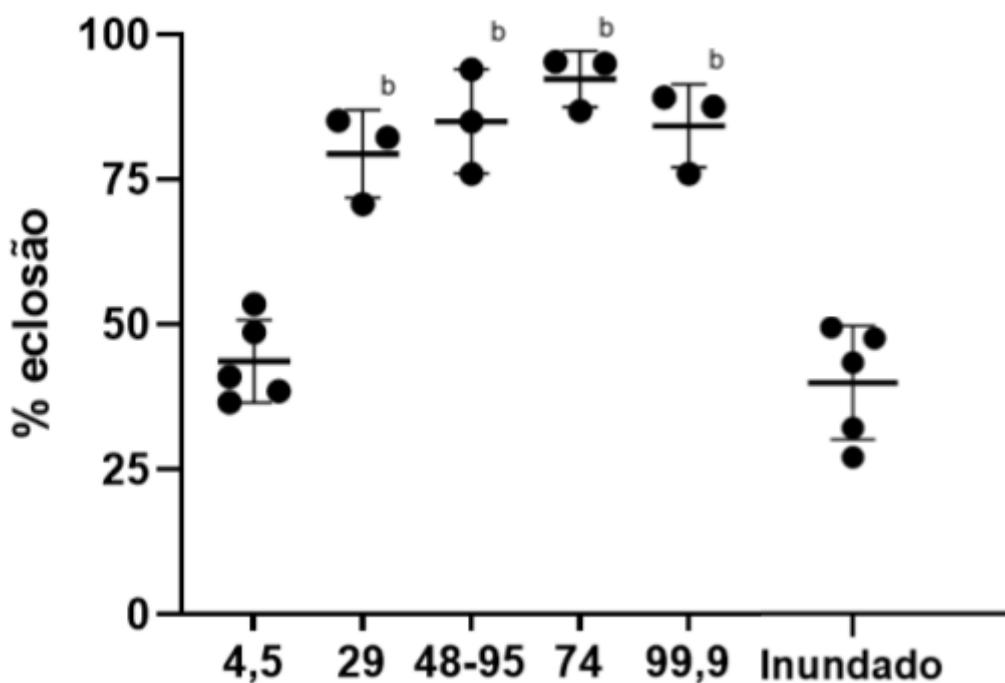


Figura 9: Viabilidade de ovos de *O. fasciatus* submetidos a diferentes condições hídricas. Na condição "Inundado" os ovos ficaram em contato com a água na região lateral. Cada círculo corresponde a uma réplica biológica que possui entre 37 e 154 ovos. Linhas horizontais em negrito indicam a média e as linhas horizontais nas extremidades das linhas verticais indicam o desvio padrão. Um total de 2.505 ovos foram utilizados, considerando todas as condições. Em todos os casos a temperatura foi de $27,7 \pm 0,3$ °C. Para cada condição de umidade relativa, os valores são seguidos por

diferentes letras minúsculas indicando se foram significativamente diferentes de acordo com o Teste de Comparação Múltipla de Tukey, exceto a condição de inundação não foi comparada no teste realizado.

De acordo com observações visuais, a maioria das ninfas que eclodem em condição de 5% de U.R. possuem a região abdominal mais achatada e aspecto ressecado. Nas demais condições de umidade relativa as ninfas recém-eclodidas não apresentaram morfologia alterada.

Nos ovos da condição de inundação parcial a região central do ovo e algumas micrópilas estiveram em contato direto com a água e as outras regiões do ovo que estavam em contato com o ar estavam em alta U.R., próxima de 100%. Das ninfas que eclodiram nessa condição foi identificado um padrão de morfologia alterada (Figura 10). Essa alteração foi perceptível na região do abdômen devido ao alongamento do corpo e menor pigmentação. Dos 477 ovos empregados na condição de inundação, 135 (28,5 %) completaram a embriogênese, mas morreram tentando sair de dentro do ovo. Como a mortalidade dessa condição foi de 56% (posto que a viabilidade foi de 44%, vide acima) metade dos indivíduos morreram após finalizarem a embriogênese, mas sem conseguirem completar a eclosão.

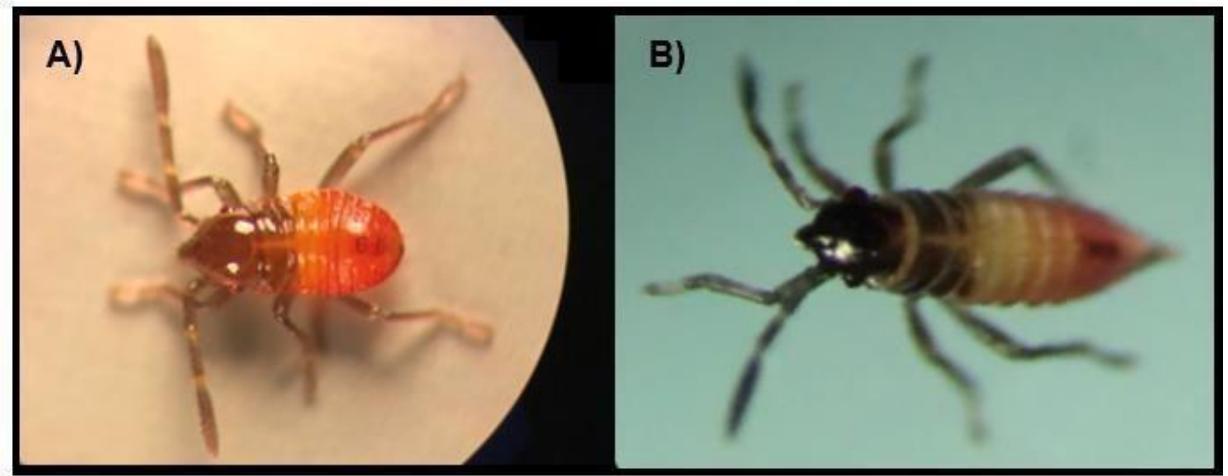


Figura 10: Imagens de ninfas que se desenvolveram e eclodiram em condição de 74% DE U.R. e inundação parcial. A) Ninfas que se desenvolveu em condição de 74% de U.R. B) Ninfas que se desenvolveu em condição de inundação parcial. Ambos os indivíduos se desenvolveram em temperatura de 27°C.

4.4 Avaliação da perda de peso molhado em ovos de *O. fasciatus* em diferentes UR

Esse experimento foi realizado nas condições de 5, 75 e 99,9% UR (Figura 12). Os dados estão apresentados em percentual do peso inicial cujo valor médio é de $265,6 \pm 26,0$ µg por ovo. Todos os valores apresentados são de peso molhado (*wet weight*) e foram avaliados entre 0 e 5 dias após oviposição, ou seja, entre 0 e 77% da embriogênese total. Em todas as condições os ovos perderam peso, com maiores taxas de perda ocorrendo em menores UR. Em 5% U.R. a média de perda de peso total foi de 26% e ocorreu uma maior taxa de perda de peso a partir de 50% do desenvolvimento (3 dias), quando se está iniciando o processo de katatrepsis. Nas condições de 75 e 99,9% UR a média de perda de peso total foi de 9% e 2%, respectivamente. A porcentagem de eclosão nas condições de 5, 75 e 99,9% de U.R. foi de respectivamente 46, 91 e 90%, condizente com os dados obtidos anteriormente (Figura 9).

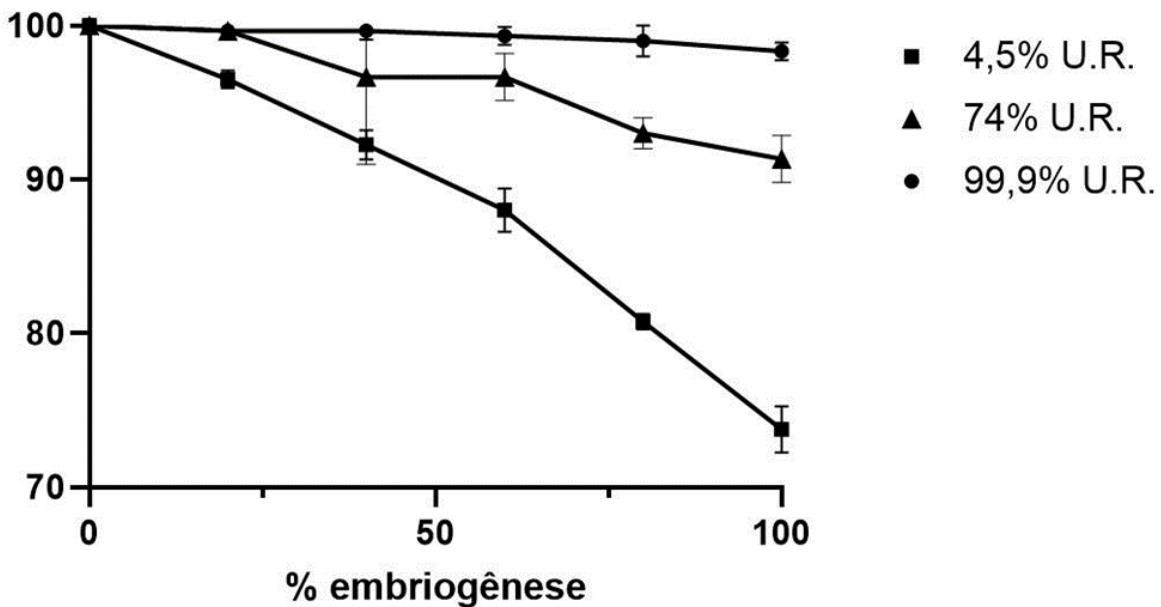


Figura 11: Perda de peso dos ovos de *O. fasciatus* ao longo da embriogênese em diferentes condições de umidade relativa. Todas as fêmeas ovipuseram por um período de 6 horas, passando mais 2 horas até o início do experimento, quando todos os ovos foram pesados e os valores obtidos foram considerados como 100%. O valor médio do peso de um ovo, logo após ser posto, é de $265,6 \pm 26,0 \mu\text{g}$. Grupos de ovos foram acondicionados nas diferentes UR e pesados a cada 24 horas, até o dia 5 de embriogênese. Foram realizados 4 experimentos independentes para a condição de 4,5% de UR. e para a condição de 74 e 99,9% UR. foram realizados 3 experimentos independentes. Ao todo foram utilizados 1124 ovos. Para cada condição de umidade relativa, os valores são seguidos por diferentes letras minúsculas indicando que foram significativamente diferentes de acordo com o TwoWay ANOVA ($P<0,0001$).

4.5 Comparação da perda de peso e da taxa respiratória em ovos de *Oncopeltus fasciatus*

De acordo com dados publicados por Richards e Suanraksa (1962) houve um aumento significativo na taxa de consumo de oxigênio (Figura 13) em ovos de *Oncopeltus fasciatus* com aproximadamente 42% do desenvolvimento embrionário. Logo em seguida, em aproximadamente 50% do desenvolvimento, de acordo com dados gerados neste trabalho, os ovos apresentam a maior tendência de perda de peso.

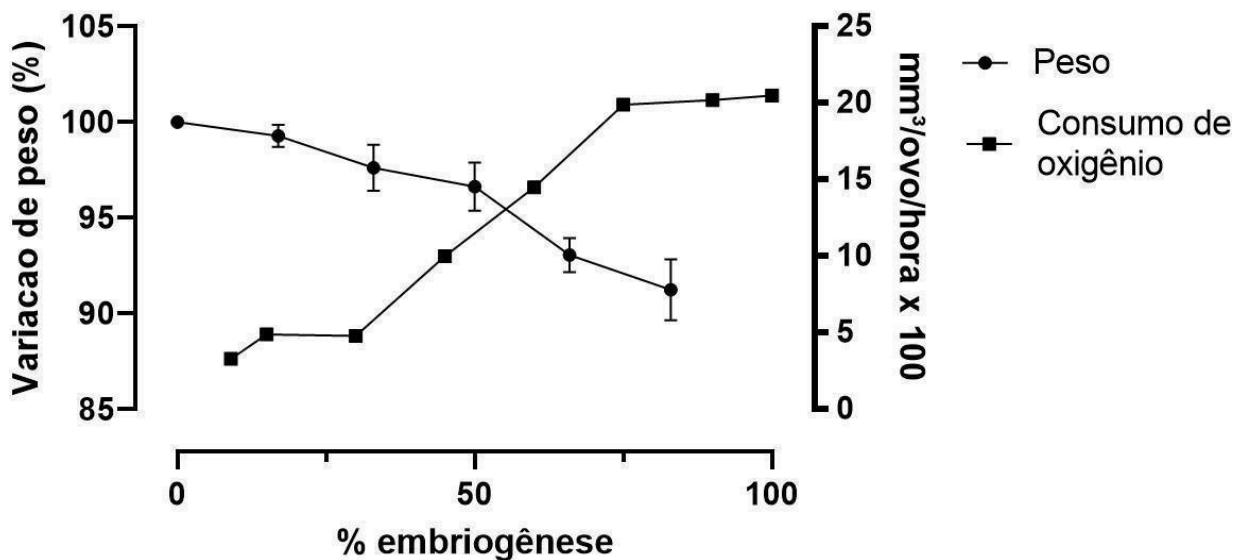


Figura 12: Relação entre perda de peso e taxa respiratória ao longo da embriogênese de *O. fasciatus*. Os dados experimentais de perda de peso em 75% U.R. presente na Figura 8 foram relacionados com os dados de consumo de oxigênio obtidos por Richards e Suanraksa (1962).

4.5 Perspectiva: Estudo de higropreferencia do estágio de vida do ovo

Os resultados obtidos nas seções 4.1, 4.2 e 4.3 apontam que existe um desacoplamento entre os processos de embriogênese e eclosão em *O. fasciatus*. Em outras palavras: um embrião pode se tornar uma ninfa com sucesso dentro do ovo (indicando que a embriogênese foi completada), mas ainda assim morrer durante o processo de eclosão. Dessa forma, a viabilidade dos ovos só é alcançada quando ocorre a finalização de dois processos que são sucessivos e independentes, ainda que parcialmente relacionados entre si: embriogênese e eclosão. Essas considerações geraram o seguinte questionamento: Extremos de umidade relativa afetam diferencialmente o embrião nos processos de embriogênese e eclosão?

Assim, foi realizado um experimento piloto exploratório, com apenas uma réplica, com o seguinte delineamento:

- 1) Ovos mantidos em 5% UR até o quinto dia de desenvolvimento embrionário, quando foram colocados em 75% UR até a eclosão completa de todas as ninhas; 2) Ovos mantidos inundados até o quinto dia, quando foram colocados em 75% UR até a eclosão completa;
- 3) Ovos mantidos em 75% UR até o quinto dia, quando foram colocados em 5% UR até a eclosão completa;
- 4) Ovos mantidos em 75% UR até o quinto dia, quando foram inundados e aí mantidos até a eclosão completa;
- 5) Ovos mantidos em 75% UR até a eclosão completa (situação controle); Após a eclosão completa foi analisada a viabilidade (Figura 14) de acordo com a metodologia descrita no Item 3.6 acima. Os ovos que se desenvolveram em 75% UR e no último dia foram colocados em condições extremas de 5% U.R. ou inundação tiveram menor percentual de viabilidade quando comparado às condições em que os ovos se desenvolvem em condições extremas e eclodiram em 75%

U.R..

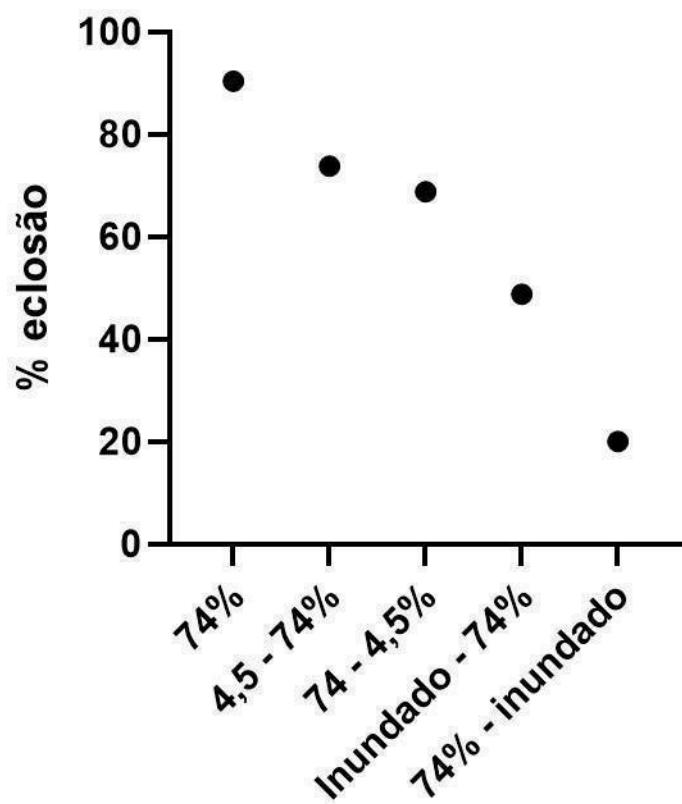


Figura 13: Higropreferência de ovos de *O. fasciatus* quando submetidos a diferentes condições hídricas. Um grupo de ovos ficou durante todo o desenvolvimento em condição de 75% de U.R. e outros 4 grupos ficaram 5 dias nas condições de 5, 75, inundação parcial e 75% de U.R., no restante da embriogênese e eclosão ficaram respectivamente nas condições de: 75, 5, 75% U.R. e inundação parcial. Os ovos ficaram em temperatura de 27 °C e para esse experimento foram utilizados 372 ovos.

5. Discussão

Assim como todos os outros seres vivos, os insetos são influenciados por diversos fatores abióticos, que podem afetar positivamente ou negativamente os indivíduos e populações. Estudar como esses fatores influenciam os insetos é importante para compreender como alterações ambientais condicionam as espécies quanto a fecundidade, longevidade, velocidade do desenvolvimento e condições favoráveis à sobrevivência das espécies, dentre outros aspectos da sua fisiologia (Begon, 2009).

A umidade e temperatura são dois dos fatores abióticos que mais influenciam a fisiologia dos insetos (Wigglesworth, 1972). A Umidade Relativa é uma forma de se medir a quantidade de água no ar, sendo a razão entre a pressão de vapor da água e a pressão de vapor de saturação da água em uma mesma temperatura, expressa em porcentagem. A quantidade de água no ar também pode ser medida através da pressão de vapor por unidade de ar. A pressão de vapor por unidade de ar é alterada de acordo com a mudança de temperatura (Al saffar, 1995). Em outras palavras: uma mesma umidade relativa, quando ocorrendo em duas temperaturas diferentes, apresentará diferentes pressões de vapor.

A quantidade de água no corpo dos insetos adultos varia em função do tipo de alimento que é ingerido e do ambiente em que vive, no estágio de ovo essa quantidade de água pode variar dependendo da espécie e local no qual os ovos são postos (Hadley, 1994). Existem cerca de 900.000 espécies terrestres de insetos (aproximadamente 90% de todos os insetos) ou seja, um percentual próximo de 90% dos ovos de insetos são postos em ambientes secos e tendem a perder água para o ambiente, conforme observado neste trabalho para ovos de *O. fasciatus* e em trabalho anterior realizado pelo grupo para ovos de *T. castaneum* (Santos e Rezende (não publicados, vide Figura 1).

A disponibilidade hídrica afeta a sobrevivência e desenvolvimento embrionário de *Oncopeltus fasciatus*. A espécie estudada possui uma faixa ampla de U.R. no qual seus ovos são capazes de se desenvolver, além da condição de inundação parcial dos ovos. Neste trabalho descobrimos que são capazes de se desenvolverem em faixa de 4,5 á 99.9% de U.R., porém com viabilidade reduzida na U.R. mais baixa. A espécie estudada neste trabalho ocorre principalmente na América do Norte e América Central e habita pastagens abertas, margens de estrada e ambientes com perturbações (Baldwin e Dingle, 1986). Na condição em que os ovos ficaram

parcialmente inundados, ou seja, com uma parte da sua superfície em contato com a água e outra parte em contato com o ar com alta umidade, foram observados dois padrões dentre os ovos que não eclodiram: muitos se desenvolveram até o final da embriogênese e aparentemente morreram aí enquanto outros iniciaram o processo de eclosão, saíram parcialmente de dentro da casca do ovo, mas não conseguiram concluir-lo, morrendo durante esse processo. De forma semelhante, foi observado com *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae) (Levi-Mourao et al, 2021; Norhisham et al, 2013) que ovos que foram submetidos a condição de alta U.R. (>90%) tiveram a eclosão afetada.

Ovos de algumas espécies de insetos absorvem água ao longo da embriogênese (Wigglesworth 1972; Hadley 1994), mas em *O. fasciatus* estruturas especializadas para esta função são desconhecidas. No entanto, durante a respiração os embriões podem absorver água, presumivelmente pela região das micrópilas, que são estruturas por onde passam os espermatozoides para a fecundação do ovo localizadas na região anterior dos ovos. Absorção de água em excesso durante o desenvolvimento embrionário acarreta inchaço do embrião, dependendo da espécie esse processo pode dificultar processos mecânicos nos indivíduos (Dorn, 1976). A limitação mecânica nos indivíduos pode dificultar movimentos musculares necessários para a eclosão.

A taxa de trocas gasosas em ovos de *O. fasciatus* aumenta quatro vezes entre 30 e 70% de seu desenvolvimento. Em 30%, o consumo de oxigênio está em aproximadamente $0,05 \text{ mm}^3 / \text{ovo} / \text{hora}$ e em 70% chega em $0,2 \text{ mm}^3 / \text{ovo} / \text{hora}$ (Figura 13). De 70 até 100% de embriogênese o consumo de oxigênio se mantém estável em $0,2 \text{ mm}^3 / \text{ovo} / \text{hora}$ (Richards and Suanraska et al. 1962). Em paralelo a isso, com aproximadamente 50% do desenvolvimento a taxa de perda de peso nos ovos é aumentada até o final da embriogênese, sugerindo que de fato a maior respiração por parte do ovo leva a uma maior perda de peso. O volume do oxigênio consumido é uma medida também utilizada para inferir a taxa metabólica do organismo (Willmer et al., 2005).

De acordo com os dados da Tabela 1, em média em 49% do desenvolvimento inicia-se a retração da casca dos ovos e em seguida quando o consumo de oxigênio atinge $0,15 \text{ mm}^3 / \text{ovo} / \text{hora}$ (em 50% do desenvolvimento embrionário) a perda de peso se intensifica. De acordo com os resultados observados neste trabalho, a retração da casca é devido ao murchamento do ovo, por conta da perda de água e só

é observada em alguns indivíduos, possivelmente decorrente da posição em que os ovos se encontram apoiados na placa de petri e a alta intensidade luminosa sobre eles.

Em condições de 99% de Umidade Relativa os ovos perdem pouca água para o ambiente tendo uma redução de 1 - 2% em seu peso total, enquanto em condição de 74% de U.R. perde cerca de 8 - 9%; em ambas as condições a eclosão foi de 80%. Em condição de baixa umidade relativa (4,5%) houve tanto um aumento na perda de peso em 18% em relação a condição ideal quanto uma perda de viabilidade, indicando que pode existir um limite de perda de peso suportada pelos ovos da espécie sem que ocorra perda de viabilidade e que, em 4,5% de U.R., esse limite foi ultrapassado.

Ovos de *O. fasciatus* são postos de forma agrupada com cerca de 10 a 30 ovos por aglomerado (Baldwin e Dingle, 1986). Assim como observado por Clark e Faeth 1998 com ovos de *Chlosyne lacinia* (Lepidoptera: Nymphalidae) e por Clements (1992) com ovos de *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) o ato de agrupar os ovos fará com que os mantidos na parte interna do aglomerado estejam protegidos contra a perda de água, garantindo maior sobrevivência da espécie.

A fim de se contextualizar de forma mais ampla os dados obtidos acima, foi realizada uma comparação da viabilidade dos ovos de *Oncopeltus fasciatus* em diferentes U.R. com ovos de outros dois insetos considerados terrestres: o besouro *T. castaneum* e a mosca *D. melanogaster* (Figura 11). Tendo em vista que a pressão de vapor varia mais que a umidade relativa quando se altera a temperatura (Al saffar, 1995), todos os experimentos comparados foram realizados na temperatura de ~27 °C. Cada espécie apresenta padrão distinto: ovos de *O. fasciatus* apresentam alta viabilidade entre 25 e 99,9% UR enquanto ovos de *T. castaneum* possuem alta viabilidade entre 5 e 75% UR. Já os ovos de *D. melanogaster* apresentam uma faixa muito mais estreita com alta viabilidade: apenas entre 95 e 100% UR.

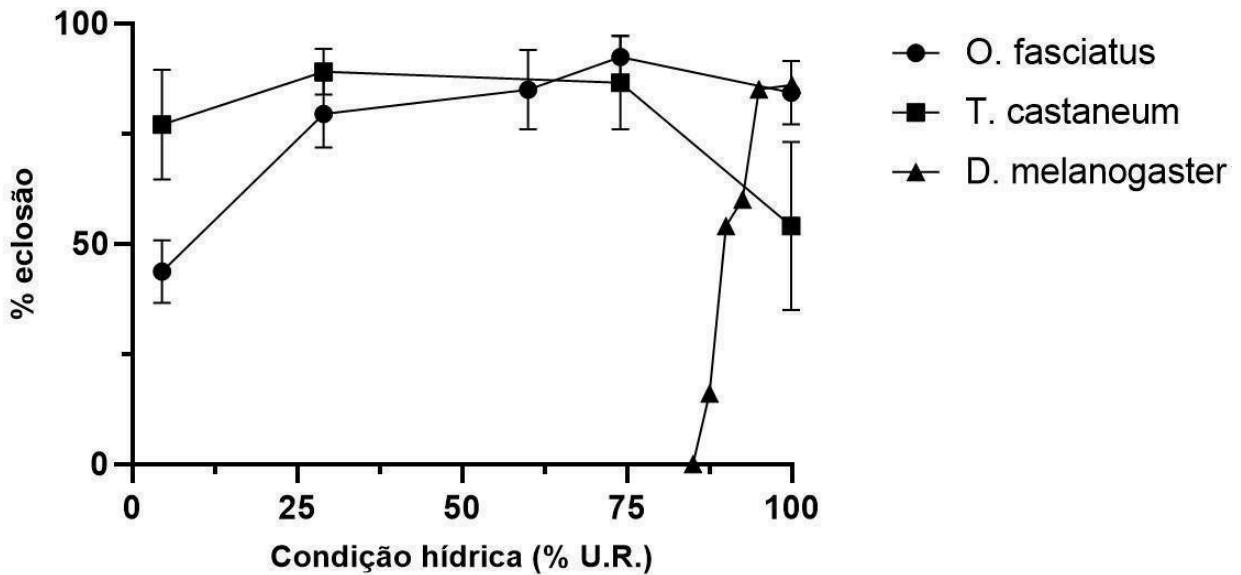


Figura 14: Viabilidade de ovos de *Oncopeltus fasciatus*, *Tribolium castaneum* e *Drosophila melanogaster* em diferentes condições de umidade relativa. Todos os dados foram obtidos na temperatura de 27,0 - 27,5 °C. Os dados de *O. fasciatus* são os mesmos apresentados na Figura 5. Um total de 1.120 ovos foram utilizados, considerando todas as condições. Linhas horizontais nas extremidades das linhas verticais indicam o desvio padrão. Os dados de *T. castaneum* foram obtidos pela Dra. Josiana Gomes de Andrade, LQFPP, UENF, em 4 experimentos independentes e os de *D. melanogaster* foram extraídos de Al-saffar *et al.* (1995).

A embriogênese de *O. fasciatus* dura em torno de 6 dias em condição de 74% de umidade relativa e temperatura de 27 °C. Os ovos *O. fasciatus* possuem viabilidade alta em uma faixa ampla de condições de baixas e altas umidades, além de inundação parcial. Ovos de *T. castaneum* possuem o tempo de desenvolvimento com cerca de 4 dias em condições ideais (aproximadamente 75% de U.R.) e maior porcentagem de viabilidade em condições de baixa umidade, e em condições de alta U.R. apresentam queda na taxa de eclosão. A mosca *D. melanogaster* possui a sobrevivência de seus ovos em uma faixa muito curta de umidade relativa, mas, por outro lado, o tempo de embriogênese é mais curto, durando 24 horas. Portanto, apesar da espécie *D. melanogaster* sobreviver em uma faixa curta de umidade relativa, ela tem o ciclo de vida do ovo muito curto e assim esse estágio de vida têm menos chances de, na natureza, se deparar com condições de baixa U.R..

Durante a respiração dos insetos adultos, ocorre a perda de água através dos espiráculos. Em relação aos ovos que são organismos em estágio imobilizado, a respiração é fundamental para seu desenvolvimento embrionário (Chown e Nicolson, 2004). No entanto, ainda são pouco conhecidos os controles para evitar perda de água durante esse processo em *O. fasciatus* (Rutschky e Joseph, 1957).

Com base nos resultados de viabilidade em diferentes Umidades Relativas, foi realizado um experimento exploratório para identificar se os embriões que desenvolveram na condição de inundação teriam maiores percentuais de eclosão se colocados ao final da embriogênese, muito próximo à eclosão, em condições de umidade relativa de 74 e 4,5%. E também se os embriões se desenvolvessem em condição de 74% e 5% de umidade relativa e no final da embriogênese fossem colocados em condição de inundação ou baixa U.R., se teriam menores percentuais de eclosão. A Partir desses resultados, foi gerado indícios que a umidade tem grande influência não apenas no desenvolvimento embrionário, mas como no processo de eclosão.

6. Conclusão

- 1) Ovos de *O. fasciatus* apresentam retração da casca durante o desenvolvimento embrionário;
- 2) O ovo consegue se desenvolver em amplas faixas de disponibilidade hídrica;
- 3) Durante o desenvolvimento embrionário de *O. fasciatus*, maiores valores de viabilidade são obtidos quando os indivíduos são submetidos a condições entre 29 e 99,9% U.R.;
- 4) Ocorre perda de peso durante o desenvolvimento embrionário em *O. fasciatus*.
- 5) Os ovos perdem peso ao longo da embriogênese, com maior perda ocorrendo em menores U.R.;
- 6) Embriogênese e eclosão parecem ser fenômenos desacoplados em *O. fasciatus*;

7. Referências Bibliográficas

Abram P.K., Guerra-Grenier E., Després Einspenner M. L., S. Ito, K. Wakamatsu, G. Boivin, J. Brodeur. An insect with selective control of egg coloration. *Curr. Biol.*, 25 (2015), pp. 2007-2011

Addo-Bediako, Chown A. S. L., Gaston K. J. 2001. Revisiting water loss in insects: a large-scale view. *Journal of Insect Physiology*. 47: 1377–1388

Al-Saffar Z.Y., Grainger J.N.R., Aldrich J. Influence of constant and changing temperature and humidity on the development and survival of the eggs and pupae of *Drosophila melanogaster* (Meigen). *Journal of Thermal Biology*. Volume 20, Issue 5, October 1995, Pages 389-397.

Allsopp, M.H., De Lange, W.J., & Veldtman, R. 2008. Valuing insect pollination services with cost of replacement. *PLOS One*.

Baldwin D., Dingle J., Geographic variation in the effects of temperature on life-history traits in the large milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* . *Oecologia* 69, 64–71 (1986).
<https://doi.org/10.1007/BF00399039>

Begon, M., Townsend, C.R., & Harper, J.L. (2006). Ecology: from individuals to ecosystems. 4th edition. Blackwell publishing.

Beament J. 1989. Eggs--the neglected insects. *J. R. Army Med Corps.* Jun;135(2):49-56.

Baldwin, D.J., Dingle, H. (1986) Geographic variation in the effects of temperature on life history traits in the large milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. *Oecologia* 69(1): 64-71.

Bernays, E. and A. O. P. J. M. Minkenberg. 1997. Insect herbivores: different reasons for being a generalist. *Ecology* 78: 1157– 1169. doi: 10.1136/jramc-135-02-03. PMID: 2671357.

Brusca, R. C., W. Moore and S. E. Shuster. 2018. Invertebrados, 3a edição. Saraiva Academic Press, São Paulo.

Burdfield-Steel ER, Shuker DM. The evolutionary ecology of the Lygaeidae. *Ecol Evol.* 2014 Jun;4(11):2278-301. doi: 10.1002/ece3.1093. Epub 2014 May 2. PMID: 25360267; PMCID: PMC4201440.

Clark B.R. and S.H. Faeth. 1998. The evolution of egg clustering in butterflies: a test of the egg desiccation hypothesis. *Evol Ecol* 12:543–552.

Chapman, R.F. 2013. The Insects: structure and function. 5 ed. Cambridge University Press. New York. 929p.

Chauvin, G., Hamon, C., Vancassel, M., Vannier G. The eggs of *Forficula auricularia* L. (Dermaptera, Fofliculidae): ultrastructure and resistance to low and high temperatures. *Canadian Journal of Zoology.* 69(11): 2873-2878.

Chown S.L., Sorensen J.G., Terblanche J.S. 2011. Water loss in insects: an environmental change perspective. *J Insect Physiol* 57: 1070– 84.

Chown, S.L. e Nicolson, S.W. 2004. Insect Physiological Ecology. Mechanisms and Patterns, 1st edn. Oxford University Press, Oxford.

Church, S.H., Donoughe, S., de Medeiros, B.A.S. et al. Insect egg size and shape evolve with ecology but not developmental rate. *Nature* 571, 58–62 (2019).

Dingle H., Evans K.E., Palmer J.O. 1988. Responses to selection among life- history traits in a nonmigratory population of milkweed bugs (*Oncopeltus fasciatus*). *Evolution*, 42(1), pp. 79-92.

Duffey S.S., Scudder G.G.E. Cardiac glycosides in *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) (Hemiptera: Lygaeidae). I. The uptake and distribution of natural cardenolides in the body. *Canadian Journal of Zoology*. 52(2): 283-290.

Dore, M.H.I., 2005. Climate change and changes in global precipitation patterns: what do we know? *Environ Int* 31(8):1167–1181

Dorn, A., 1976. Ultrastructure of embryonic envelopes and integument of *Oncopeltus fasciatus* Dallas (Insecta, Heteroptera). *Zoomorphologie* 85, 111–131.

Edney E.B. 1977. Water Balance in LandArthropods. Vol. 9. Zoophysiology and Ecology. NY: Springer. 282 pp.

Farnesi L.C, Vargas H.C.M, Valle D, Rezende G.L. 2017. Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors. *PLoS Negl Trop Dis* 11:e0006063.

Feir D. 1974. *Oncopeltus fasciatus*: A research animal. *Annu. Rev. Entomol.*, 19: 81–96.

Gordon G., Headrick D.H. 2001 A dictionary of entomology. Oxford: CABI Publ series.

Guerra-Grenier E. 2019 Evolutionary ecology of insect egg coloration: A review. *Evol.*

Ecol. 33, 1–19.

Grimaldi, D., Engel, M.S. 2005. Evolution of the Insects. 1 ed. Cambridge University Press. 755p.

Halbritter DA. 2020. Exposed *Neophasia terlooii* (Lepidoptera: Pieridae) Eggs are Resistant to Desiccation During Quiescence. Environ Entomol. doi: 10.1093/ee/nvaa066. PMID: 32514519.

Hadley N. F., Machin J. & Quinlan M. C. 1986. Cricket cuticle water relations: Permeability and passive deter insect cuticular lipids minants of cuticular water content. Physiol. Zool. 1:84-94

Hadley N.F., 1994. Water relations of terrestrial arthropods. Academic Press.

Hoffmann A. A. e Blows M. W. 1994. Species borders: ecological and evolutionary perspectives. Trends in Ecology and Evolution, 9 (6), pp. 223-227.

Harrison J.F., Woods H.A., Roberts S.P. 2012. Ecological and Environmental Physiology of Insects. Oxford University Press, Oxford, UK.

Hinton H.E. 1981. Biology of insect eggs, vol 1-3. Pergamon Press, Oxford

Jacobs C.G.C., Rezende G.L., Lamers G.E.M., van der Zee M. 2013 The extraembryonic serosa protects the insect egg against desiccation. Proc R Soc B 280: 20131082. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.1082>

Janzen D.H., Schoener T.W. Differences in Insect Abundance and Diversity Between Wetter and Drier Sites During a Tropical Dry Season. Ecology, Vol. 49, No. 1 (Jan., 1968), pp. 96-110.

Panfilio K.A., Vargas Jentzsch I.M., Benoit J.B., Ereyilmaz D., Suzuki Y., Colella S., Robertson H.M., Poelchau M.F., Waterhouse R.M., Ioannidis P., et al. 2019.

Molecular evolutionary trends and feeding ecology diversification in the Hemiptera, anchored by the milkweed bug genome. *Genome Biol.* 20:64.

Levi-Mourao, A.; Madeira, F.; Meseguer, R.; García, A.; Pons, X. Effects of Temperature and Relative Humidity on the Embryonic Development of *Hypera postica* Gyllenhal (Col.: Curculionidae). *Insects* **2021**, *12*, 250.
<https://doi.org/10.3390/insects12030250>

Lin, S., Hodson, A. C., & Richards, A. G. (1954). An Analysis of Threshold Temperatures for the Development of *Oncopeltus* and *Tribolium* Eggs. *Physiological Zoology*, *27*(4), 287–311. <http://www.jstor.org/stable/30152364>

Lockey, K.H., 1988. Lipids of the insect cuticle: origin, compositions and function. Comparative Physiology an Biochemistry *89*: 595-45.

Martínez G., Soler R. e Dicke M. 2013. Behavioral ecology of oviposition-site selection in herbivorous true bugs. *Advances in the Study of Behavior* (ed. by HJ Brockmann, TJ Roper, M Naguib, JC Mitani, LW Simmons & L Barrett), pp. 175–207. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

O’Gorman, P.A. 2015. Precipitation Extremes Under Climate Change. *Curr Clim Change Rep* *1*, 49–59. <https://doi.org/10.1007/s40641-015-0009-3>

Oparin A.I., Pasynskii A. G., Braushtein A. E., Pavlovskaya T. E., 1957. *Proceedings of the first international symposium on the origin of life on the earth*. Pergamon press.

Panfilio K.A., Liu P.Z., Akam M., Kaufman T.C. 2006. *Oncopeltus fasciatus* zen is essential for serosal tissue function in katatrepsis. *Dev Biol.* Apr *1*;292(1):226-43. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.12.028.

Price P.W., Denno R.F., Eubanks M.D., Finke D.L.. 2011. *Insect ecology: behavior, populations, and communities*. Cambridge University Press, Kaplan, New York.

Ralph C.P. Natural food requirements of the large milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera: Lygaeidae), and their relation to gregariousness and host plant morphology. *Oecologia*. 1976 Jun;26(2):157-175.

Rezende G.L., Vargas H.C.M., Moussian B., Cohen E. 2016. Composite Eggshell Matrices: Chorionic Layers and Sub-chorionic Cuticular Envelopes. Springer International Publishing Switzerland. *Extracellular Composite Matrices in Arthropods*. DOI 10.1007/978-3-319-40740-1_9.

Resh V.H., Cardé R.T. 2009. *Encyclopedia of insects*. 2 e.d. Academic Press. 1168p.
Richards G.A., Suanraksa S. 1962. Energy expenditure during embryonic development under constant versus variable temperatures (*Oncopeltus fasciatus* (Dallas)). *Entomologia experimentalis et applicata*. pp 167-178. North-Holland Publishing Co., Amsterdam.

Richards A. G., Suanraksa S. 1962. Energy expenditure during embryonic development under constant versus variable temperatures (*Oncopeltus fasciatus* (Dallas)). *Entomologia Experimentalis Applicata*. Vol 5. Issue 3.

Roonwal, M. (1936). The Growth-Changes and Structure of the Egg of the African Migratory Locust, *Locusta migratoria migratorioides*, R. & F. (Orthoptera, Acrididae). *Bulletin of Entomological Research*, 27(1), 1-14. doi:10.1017/S0007485300058089

Rota-Satàbelli O., Daley A.C., Pisani D. 2013. Molecular Timetrees Reveal a Cambrian Colonization of Land and a New Scenario for Ecdysozoan Evolution. *Current biology*, 23.

Sauer D. e Feir D. 1973. Studies on natural populations of *Oncopeltus fasciatus* (Dallas), the large milkweed bug. *Am Midi Nat*, 90, 13–37.

Selden, P.A. 2016. Origins of land animals. In Kliman, R. M. (ed.), *Encyclopedia of evolutionary biology*. volume 2: 288–295. Oxford: Academic Press.

Sweet, M. H. 2000. Seed and Chinch Bugs (Lygaeoidea). Pp.143–264 in C. W. Schaefer, A. P. Panizzi, eds. *Heteroptera of economic importance*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Winston, P.W. and Bates, D.H. (1960) Saturated Solutions for the Control of Humidity in Biological Research. *Ecology*, 41, 232-237. <http://dx.doi.org/10.2307/1931961>

Wigglesworth, V.B. (1972) *The Principles of Insect Physiology*. 8th Edition. Chapman and Hall, London, 434 p. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-5973-6>

Zhang Z.Q., 2011. Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa*. 3148 Vol. 237p.

Zeh D.W., Zeh J.A., Smith R.L. 1989. Ovipositors, amnios and eggshell architecture in the diversification of terrestrial arthropods. *Quarterly Review of Biology* 64, 147-168.