



# LAS HEMBRAS DE *ZABROTES SUBFASCIATUS* REGULAN TAMAÑO Y CANTIDAD DE HUEVOS EN RESPUESTA A CONDICIONES AMBIENTALES

I.R.V. Teixeira<sup>1,2 \*</sup>

A.R.Barchuk<sup>3</sup>; L. Medeiros<sup>1</sup>; F.S.Zucoloto<sup>1</sup>

1. Laboratorio de Nutrición y Comportamiento Alimentario de Insectos, Departamento de Biología, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 2. Departamento de Biología, Centro Universitário da Fundação Educacional de Guaxupé, UNIFEG, Guaxupé. 3. Departamento de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas, Unifal - MG, Alfenas, Minas Gerais, Brasil; \*isabelfe@email.fundeg.br; ribeirodovallenteixeira@hotmail.com

## INTRODUCTION

Los organismos vivientes se adaptan a ambientes complejos modificando características morfofisiológicas. Este fenómeno es posible gracias a variaciones genéticas y a la plasticidad fenotípica (Stearns, 1992; West - Eberhard, 2003). Los artrópodos, especialmente insectos, presentan un sinnúmero de ejemplos de cambios fenotípicos en respuesta a ambientes temporal y espacialmente heterogéneos. Un caso biológicamente muy importante es la capacidad de algunas hembras de ajustar el tamaño de los huevos depositados de acuerdo con señales ambientales recibidas (Zera & Harshman, 2001). El tamaño de los huevos aumenta en condiciones ambientales que resultan pobres para el desarrollo de juveniles. Las larvas emergentes de huevos mayores pueden estar más preparadas para desarrollarse en ambientes restrictivos tales como huéspedes con baja calidad nutricional (Parker & Begon, 1986). Este fenómeno representa una característica adaptativa que ha jugado un papel importante durante la expansión y diversificación de la dieta de algunas especies de insectos (Amarillo - Suárez & Fox, 2006).

El gorgojo brucídeo *Zabrotes subfasciatus*, para quien la alimentación larval constituye la única fuente energética y de materia prima para el desarrollo del huevo, usa semillas de *Phaseolus vulgaris* como principal huésped de oviposición (Teixeira & Zucoloto, 2003; Teixeira *et al.*, 008). A pesar de no alimentarse cuando adultas, las hembras de esta especie de insecto ovipositan solamente después de encontrar semillas de su huésped (por ejemplo, poroto), evento que desencadena el proceso de vitelogénesis (Pimbert & Pierre, 1983).

Si el sustrato de oviposición gatilla de algún modo la vitelogénesis, cómo reaccionarían las hembras a variaciones en la cantidad de semillas de la misma especie huésped? Este trabajo aborda el aspecto biológico que implica la interacción entre las hembras y su medio ambiente y otros factores relacionados con esta importante cuestión.

## OBJECTIVES

Mostrar el comportamiento de *Z. subfasciatus* frente a dos muy diferentes ambientes de oviposición, en relación al número de semillas, y como este influye sobre el fitness de las crías

## MATERIAL AND METHODS

### Poblaciones de gorgojos

Los individuos salvajes de *Z. subfasciatus* (Coleoptera; Chrysomelidae; Bruchinae; Amblycerini) fueron obtenidos a partir de semillas de *P. vulgaris* recolectadas en domicilios y almacenes en la región de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil (21° 05' - 21°15'S y 47° 50' - 47° - 55'O). Para mayores informaciones sobre la biología de este insecto, ver Bondar (1937) y Teixeira & Zucoloto (2003).

Las poblaciones experimentales fueron establecidas criándolas durante generaciones sucesivas en diferentes niveles de disponibilidad de semillas del huésped (sustrato de oviposición) bajo condiciones controladas de humedad (70%) y temperatura (29 & 177; 2 & 176;C).

### Experimento 1: Efecto de diferentes niveles de disponibilidad de sustrato

Fue evaluado el comportamiento de hembras que habían sido criadas durante 10, 15 ó 41 generaciones en dos diferentes niveles de disponibilidad de semillas y fueron analizadas las características biológicas de las crías. Las dos situaciones de disponibilidad fueron las siguientes: Pocos Huéspedes: baja disponibilidad de semillas para oviposición. Cada repetición poblacional estuvo compuesta por seis parejas de insectos y seis semillas de *P. vulgaris* en una caja de acrílico (13 x 13 x 3 cm). Muchos Huéspedes: alta disponibilidad de semillas para oviposición. Cada repetición estuvo compuesta por seis parejas de insectos y 200 semillas de *P. vulgaris*. De las centenas de descendientes de cada repetición, 6 parejas de individuos recién emergidos

fueron usadas para iniciar la siguiente generación. Fueron establecidas diez repeticiones/situación/generación.

El fitness de las poblaciones fue determinado midiendo la fecundidad (número medio de huevos por hembra) y la sobrevivencia (número de adultos emergentes sobre el número total de huevos *imes100*) por repetición y situación. Los “huevos” fueron contados y medidos 10 días después del período de oviposición, cuando son más visibles y la respectiva larva se encuentra desarrollando dentro de la semilla. Debido a que los huevos están adheridos a la superficie de las semillas, son fácilmente destruidos durante las tentativas de remoción. Por esa razón, solamente un huevo, al azar, era dejado sobre cada semilla y medido. Los otros eran removidos con la ayuda de hojas de bisturí. Esta estrategia permitía mediciones sucesivas por el mismo profesional. Como los huevos son elípticos, sus tamaños relativos eran determinados multiplicando longitud y anchura, usando oculares microscópicos con escala milimetrada. De esta forma fueron medidos 50 huevos seleccionados al azar de cada situación de disponibilidad y generación, neutralizando así la eventual influencia de la posible correlación entre tamaño de huevo y edad de la hembra.

El tamaño de los gorgojos emergentes de la 10<sup>o</sup> generación en cada situación de disponibilidad fue estimado midiendo la longitud mayor del ala derecha de las hembras. Setenta hembras/situación/generación elegidas al azar fueron medidas usando oculares microscópicos con escala milimetrada. Los individuos recién emergidos eran pesados y el consumo durante su desarrollo post - embrionario fue estimado relacionando la reducción del peso de las semillas con el número de gorgojos emergidos.

#### **Experimento 2:**

Efecto de cambios en los niveles de disponibilidad de sustrato

Parejas de gorgojos provenientes de las poblaciones criadas durante 12, 31 ó 40 generaciones en una cantidad específica de semillas fueron colocadas en situaciones opuestas de disponibilidad de sustrato y las características biológicas de sus crías fueron analizadas. Brevemente, 10 grupos de 6 parejas recién emergidas de la población Pocos Huéspedes (PH) fueron colocados en la situación PH y otros 10 grupos de 6 parejas provenientes de la situación PH fueron puestos en la situación Muchos Huéspedes (MH). El mismo procedimiento fue realizado con parejas provenientes de la situación MH. Después del período de oviposición, fueron estimados el tamaño de los huevos y el fitness (fecundidad y sobrevivencia). La disponibilidad de sustrato fue como descrito en el Experimento 1 (situaciones Pocos Huéspedes y Muchos Huéspedes).

#### **Experimento 3:**

Flexibilidad del tamaño de huevos durante el período de oviposición

Fue evaluado el comportamiento de hembras frente a la variación de la disponibilidad de sustrato durante el período de oviposición. Este experimento fue realizado para evaluar si las hembras pueden alterar el tamaño de los huevos durante el período de oviposición (aproximadamente 10 días; Teixeira & Zucoloto, 2003) en respuesta a variaciones ambientales. Fueron usados individuos recién emergidos de

poblaciones criadas durante 38 generaciones en las situaciones PH y MH. Una pareja proveniente de cada una de esas poblaciones fueron primeramente mantenidas durante las primeras 48h en la situación PH y seguidamente llevadas a una situación MH por otras 48h. Los huevos puestos fueron contados y medidos. Fueron realizadas diez repeticiones/situación.

Antes de la realización de este experimento, fue estimado el tamaño de los huevos puestos por día durante los primeros cuatro días del período de oviposición de 10 hembras. No fueron encontradas diferencias en tamaño de huevo (Kruskal - Wallis ANOVA,  $P < 0.001$ ).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **1. Las hembras regulan el tamaño de los huevos de acuerdo con la disponibilidad de sustrato**

El número medio de descendientes por repetición fue de  $271 \pm 81$  en el ambiente PH y de  $376 \pm 53$  en el ambiente MH. Además, las hembras que vivieron durante 10, 15 ó 41 generaciones en ambientes extremadamente diferentes en relación a la disponibilidad de sustrato de oviposición pusieron huevos de tamaños claramente diferentes. Aquellas criadas en baja densidad de semillas (PH) pusieron huevos mayores y en menor cantidad (28 huevos/semilla) que aquellas criadas en alta densidad de semillas (1 - 2 huevos/semilla), mostrando trade - off en estas características reproductivas (ANOVA de Friedman y coeficiente de concordancia de Kendall,  $P < 0.000001$ ; ANOVA de Kruskal - Wallis,  $P < 0.5$ ; Statistica v5.0).

Las diferencias en tamaño de huevo fueron claras y estadísticamente significativas, así como las diferencias en número, con llamativos 40%. La sobrevivencia (porcentaje de emergencia) también fue claramente superior en la situación ambiental PH.

El tamaño de los emergentes y el consumo de estos durante la vida en el interior de las semillas después de 10 generaciones también fue mayor en las crías provenientes de la situación MH (ANOVA de Kruskal - Wallis,  $P < 0.5$ ). Sorprendentemente, no hubo diferencia de peso entre los adultos provenientes de las dos situaciones estudiadas (PH y MH).

### **2. La capacidad de regular el tamaño de huevos se mantiene después de generaciones en la misma situación ambiental:**

Hembras provenientes de poblaciones criadas por 12, 31 ó 40 generaciones en una situación ambiental específica de disponibilidad de sustrato de oviposición y sometidas a la situación invertida mostraron el mismo comportamiento que aquellas que fueron mantenidas en la situación original. El valor adaptativo de las poblaciones PH en la situación MH fue equivalente al de las poblaciones MH en la situación MH. De igual manera, el valor adaptativo de las poblaciones MH en la situación PH fue equivalente al valor adaptativo de las poblaciones PH en la situación PH (ANOVA de Friedman y coeficiente de concordancia de Kendall,  $P < 0.000001$ ; ANOVA de Kruskal - Wallis,  $P < 0.5$ ).

### **3. Las hembras regulan el tamaño de los huevos de acuerdo a la disponibilidad de sustrato durante el período de oviposición:**

Las hembras que enfrentaron variaciones de disponibilidad de sustrato durante el período de oviposición ajustaron el tamaño y el número de los huevos depositados. Durante las primeras 48h en la situación ambiental PH, las hembras provenientes de la situación PH pusieron pocos huevos y grandes. Sin embargo, cuando llevadas a una situación invertida (MH) se comportaron de acuerdo con el nuevo ambiente, depositando muchos huevos pequeños. Lo opuesto fue observado cuando fueron analizadas las hembras provenientes de la situación ambiental MH (Test de Wilcoxon  $P < 0.001$ ).

#### Discusión:

Nuestros resultados muestran que las hembras de *Z. subfasciatus* responden a variaciones de disponibilidad de semillas de la misma especie huésped regulando tamaño y número de huevos. Hembras en situación de baja densidad de semillas pusieron huevos mayores y en menor cantidad que las hembras en situación de alta densidad de semillas, evidenciando trade-off reproductivo. Las situaciones ambientales analizadas también sugieren que las primeras enfrentaron situaciones de mayor competición por sustrato de oviposición que las últimas. Resultados similares fueron reportados para el gorgojo *Callosobruchus maculatus* (Kawecki, 1995) y *Sitophilus zeamais* (que preda maíz; Danho *et al.*, 2002) y para las mariposas *Lycaena hippothoe* (Fischer & Fiedler, 2001) y *Parnara guttata guttata* (Mizumoto & Nakasuji, 2007). Sin embargo, a diferencia de la situación relacionada a *C. maculatus*, en la cual la competición dentro de las semillas promueve el desarrollo de animales grandes (Messina, 2004), en nuestros experimentos, los gorgojos resultantes de las situaciones de alta competición (baja disponibilidad de semillas) eran menores que los de baja competición. De manera interesante, sus pesos fueron similares, como reportado por Dendy & Credland (1991) y no observamos respuesta a la presión de selección ofrecida al criar los gorgojos por muchas generaciones en el mismo y uniforme ambiente de disponibilidad de sustrato. Esto último puede indicar que las poblaciones de *Z. subfasciatus* se comportaron de acuerdo a sus normas de reacción, que ya les permitía una adaptación rápida a variaciones de la disponibilidad de sustrato de oviposición. Huevos mayores resultan en desarrollo y metamorfosis más rápidos dando origen a larvas y pupas mejor preparadas para la competición dentro de las semillas. Debido a que moléculas de reserva son acumuladas en los cuerpos grasos durante el desarrollo post-embrionario, las características morfológicas de los individuos resultantes serán comparables con aquellas de los criados en situación de alta disponibilidad de sustrato. De esta manera, el comportamiento de las hembras resulta adaptativo, permitiendo una mejor explotación de ambientes cambiantes.

La flexibilidad fisiológica para poner huevos de diferentes tamaños de acuerdo con el ambiente sugiere que por lo menos dos factores contribuyen para el éxito biológico de esta especie: Una alta capacidad de “sensar” el ambiente y una rápida incorporación de esta información transfiriéndola en cambios fisiológicos internos. Las hembras sensan el ambiente durante su período de inspección, el cual es el tiempo dedicado para examinar las condiciones ambientales antes de resolver poner huevos. Es sabido que en

situaciones de competición por recursos, el período de inspección es largo, lo cual atrasa la oviposición (Chung *et al.*, 1995). Así, cuanto más encuentros con otras hembras una de ellas experimenta, más tiempo tendrá para incorporar vitelogenina en sus huevos, lo que resultará en huevos mayores, explicando la flexibilidad de esta característica. Enfrentando la misma situación de escasez ambiental, hembras de otras especies resorben sus huevos o los depositan en cualquier lugar (Jervis *et al.*, 2005; Messina *et al.*, 2007). De manera interesante, esta habilidad no es determinada en el primer contacto con el ambiente. Si la disponibilidad de sustrato se altera, las hembras pueden cambiar su estrategia reproductiva, como fue observado en este trabajo durante los primeros cuatro días del período de oviposición. Esta capacidad de acumular proteínas vitelogénicas en un corto período de tiempo es encontrada en otras especies de insectos. El tamaño de los huevos del mosquito de la fiebre amarilla *Aedes aegypti* aumenta más de 300 veces en 36h después que la hembra se alimenta de sangre (Raikhel *et al.*, 2002). Savalli & Fox (2002) observaron que las hembras de *S. limbatus* necesitan de 24 a 36h entre la oviposición en un huésped y la oviposición en un segundo para ajustar el tamaño de los huevos de acuerdo a la calidad nutricional del huésped a ser usado. Esto muestra que las hembras son capaces de alterar el tamaño de los huevos a depositar independientemente de sus primeras experiencias.

#### CONCLUSION

En *Z. subfasciatus*, el contacto con el huésped gatilla la vitelogénesis, así, el período de inspección representa el tiempo que le lleva a una hembra para encontrar un lugar calmo para poner huevos. De esta forma, cuanto más “compañeras” de nicho ella encuentre, más tiempo tendrá para incorporar vitelogenina en sus huevos en desarrollo. Y, como demostrado en este trabajo, todo esto puede acontecer dentro de 48h. Este fenómeno explica el valor adaptativo de los descendientes, inclusive bajo condiciones adversas, y el éxito biológico de esta especie.

#### Agradecimientos:

Agradecemos a Ana Paula dos Santos y Laércio Massocato por la asistencia técnica en los laboratorios. Este trabajo fue financiado por la Capes (Brasil). </p>

#### REFERENCES

- Amarillo - Suárez, A.R., Fox, C.W. (2006) Population differences in host use by a seed-beetle: Local adaptation, phenotypic plasticity and maternal effects. *Oecologia*, 150, 247 - 258
- Bondar, G. (1937) Notas biológicas sobre Bruchideos observados no Brasil. *Arquivos do Instituto de Biologia Vegetal*, 3, 1 - 44
- Chung, S.H., Choi, W.I., Ryoo, M.I. (1995) Egg laying decision of adzuki bean weevil (Coleoptera, Bruchidae): Effects of seed size and egg distribution pattern on a seed. *Korean Journal of Entomology*, 25, 313 - 321
- Danho, M., Gaspar, C., Haubruge, E. (2002) The impact of grain quantity on the biology of *Sitophilus zeamais*

- Motschulsky*, (Coleoptera: Curculionidae): oviposition, distribution of eggs, adult emergence, body weight and sex ratio. *Journal of Stored Products Research*, 38, 259 - 266
- Dendy, J., Credland, P.F. (1991) Development, fecundity and egg dispersion of *Zabrotes subfasciatus*, . *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 59, 9 - 17
- Fischer, K., Fiedler, K. (2001) Egg weight variation in the butterfly *Lycaena hippothoe*: more small or fewer larger eggs? *Population Ecology*, 43, 105 - 109
- Fox, C.W., Martin, J.K., Thakar, M.S., Mosseau, T.A. (1996) Clutch size manipulations in two seed beetles: consequences for progeny fitness. *Oecologia*, 108, 88 - 94
- Jervis, M.A., Boggs, C.L., Ferns, P.N. (2005) Egg maturation strategy and its associated trade - offs: a synthesis focusing on Lepidoptera. *Ecological Entomology*, 30, 359 - 375
- Kawecki, T.J. (1995) Adaptive plasticity of egg size in response to competition in the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*, (Coleoptera: Bruchidae). *Oecologia*, 102, 81 - 85
- Messina, F.J. (2004) Predictable modification of body size and competitive ability following a host shift by a seed beetle. *Evolution*, 58, 2788 - 2797
- Messina, F.J., Morrey, J., Mendenhall, M. (2007) Why do host - deprived seed beetles 'dump' their eggs? *Physiological Entomology*, 32, 259 - 267
- Mizumoto, M., Nakasuji, F. (2007) Egg size manipulation in the migrant skipper, *Parnara guttaguttata* (Lepidoptera: Hesperidae), in response to different host plants. *Population Ecology*, 49, 135 - 140
- Parker, G.A., Begon M. (1986) Optimal egg size and clutch size: Effects of environment and maternal phenotype. *American Naturalist*, 128, 573 - 592
- Pimbert, M.P., Pierri, D. (1983) Ecophysiological aspects of bruchid reproduction. I. The influence of pod maturity and seeds of *Phaseolus vulgaris* and the influence of insemination on the reproductive activity of *Zabrotes subfasciatus*. *Ecological Entomology*, 8, 87 - 94
- Raikhel, A.S., Kokoza, V.A., Zhu, J, Martin, D., Wang, S - F., Li, C., Sun, G., Ahmed, A., Dittmer., N., Attardo, G. (2002) Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of anti - pathogen immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32, 1275 - 1286
- Savalli, U.M., Fox, C.W. (2002) Proximate mechanisms influencing egg size plasticity in the seed beetle *Sator limbatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 95, 724 - 734
- Stearns, S.C. (1992) The evolution of life histories. Oxford University Press, USA
- Teixeira, I.R.V., Barchuk, A.R., Zucoloto, F.S. (2008) Host preference of the bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. *Insect Science*, 15, 335 - 341
- Teixeira, I.R.V., Zucoloto, F.S. (2003) Seed suitability and oviposition behaviour of wild and selected populations of *Zabrotes subfasciatus*(Boheman) (Coleoptera, Bruchidae) on different host. *Journal of Stored Products Research*, 39, 131 - 140
- West - Eberhard, M.J. (2003) Developmental plasticity and evolution. Oxford University Press, USA
- Zera, A.J., Harshman, L.G. (2001) The physiology of life history trade - offs in animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32, 95 - 126