

COMPORTAMENTO E FISIOLOGIA REPRODUTIVA DO MACHO DE *Podisus nigrispinus*
(DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

por

AGNA RITA DOS SANTOS RODRIGUES

(Sob Orientação do Professor Jorge Braz Torres)

RESUMO

A realização de múltiplas e longas cópulas por *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hem.: Pentatomidae) tem sido uma incógnita. Assim, este trabalho teve como objetivo investigar o comportamento reprodutivo de macho de *P. nigrispinus*. A cópula foi estudada em função do tamanho do macho, status prévio de acasalamento do macho e risco de predação (i). Também, foram analisados a espermatogênese e o efeito do tempo de cópula na transferência de espermatozóides para fêmeas (ii), bem como foram descritas a espermateca e estruturas relacionadas quanto à morfologia interna e modificações ocorridas durante a cópula (iii). A escolha da fêmea por machos virgens ou previamente acasalados foi estudada sob chance múltipla, parcial ou sem chance de escolha por machos grandes ou pequenos. O comportamento para o acasalamento e duração da cópula sob risco de predação [presença de *Polistes versicolor* Oliver (Hym.: Vespidae)] foi comparado com casais sem risco de predação. Fêmeas tiveram o sucesso de fertilização e inseminação avaliado através da interrupção da cópula após 30, 60, 120 e 240 minutos. Em função do status de acasalamento, machos foram dissecados e investigados quanto a produção e transferência de espermatozóides para as fêmeas. Os resultados mostram que o acasalamento em *P. nigrispinus* independe do tamanho e status prévio de acasalamento dos

machos, além de não apresentar preferência de parceiro. A duração da cópula, escolha do parceiro e a fertilidade das fêmeas não sofrem influência do tamanho do macho. Também, o risco de predação não alterou o comportamento de acasalamento e duração de cópula. Fêmeas com cópulas interrompidas após 30, 60, 120 e 240 minutos apresentaram baixa viabilidade de ovos (0; 3,1; 7,7; e 34%, respectivamente), enquanto aquelas sem interrupção de cópula (338 a 671 minutos) obtiveram 74,2% de viabilidade de ovos. Também, foi observado que machos possuem espermatogênese contínua e ausência de vesícula seminal. A análise do ducto deferente mostra espermatozoides presentes no seu lúmen independente do status de acasalamento (machos virgens, 0h, 12h ou 24h após término da cópula). Em fêmeas, o volume da espermateca não sofre alteração com a cópula. Contudo, ocorre mudança de formato do ducto elástico da espermateca a partir de 30 minutos do início da cópula. Fêmeas que tiveram cópula sem interrupção apresentaram espermatecas completamente preenchidas com espermatozoides. Para *P. nigrispinus* o sucesso de inseminação e fertilização de fêmeas é dependente da duração da cópula e de múltiplas cópulas. Por outro lado, o sucesso reprodutivo não depende do tamanho do macho e de seu status de acasalamento.

PALAVRAS-CHAVE: Asopinae, múltiplas cópulas, tamanho do macho, duração de cópula, reprodução, espermatogênese

MALE REPRODUCTIVE BEHAVIOR AND PHYSIOLOGY OF *Podisus nigrispinus*

(DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

by

AGNA RITA DOS SANTOS RODRIGUES

(Under the Direction of Professor Jorge Braz Torres)

ABSTRACT

The reasons of multiple and long successive mates accomplished by *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hem.: Pentatomidae) males has been unknown. Thus, mating behavior of *P. nigrispinus* was investigated as function of male body size (i), previous mating status (ii), risk of predation (iii), interrupted mating (iv), and spermatogenesis (v). The female choice for mating with large or small body size males was investigated under three conditions: multiples choice within a population of large and small males; partial choice (ca. only one pair of small and large male) and no choice (only small or large male). Time to initiate a copula and its duration was observed after pairing males and females under the risk of predation imposed by the presence of the predatory wasp *Polistes versicolor* Oliver (Hym.: Vespidae). Furthermore, females had their reproductive success evaluated with interrupted mating at different intervals (30, 60, 120 and 240 minutes after initiating a mating) and when mating with males previously mated. The spermatogenesis of these mated and unmated males was investigated. The outcomes show that *P. nigrispinus* female mates with males disregarding their body size, previous mating status and, exhibits no mating partner preference in successive mates. In addition, duration of mating, partner choice and female fertility were not influenced by male body size. The risk of predation did not alter mating behavior and duration of mating. However, females with interrupted mating at 30, 60, 120 and 240 minutes

exhibited low egg viability (0, 3.1, 7.7, and 34%, respectively) compared to females with uninterrupted mating (338 to 671 minutes) that showed egg viability of 74.2%. The dissection of males of different mating status shows that *P. nigrispinus* exhibits continuous spermatogenesis and absence of a storage seminal vesicle. Spermatozoa were present in the lumen of the vas deferents independent of mating status. The spermatheca does not change size according to the duration of mating, although its duct exhibited elasticity with significant deformation after mating for 30 minutes. Females under uninterrupted mating exhibited spermathecal duct fully expanded and spermatheca filled with spermatozoa. Based on the results, the reproductive success of *P. nigrispinus* male is related to the duration of copula and female requires multiple mates to fill spermatheca with spermatozoa. However, the reproductive success of the species does not depend on males' body size and their mating status.

KEY WORDS: Asopinae, multiple mating, body size, mating duration, reproduction, spermatogenesis

COMPORTAMENTO E FISIOLOGIA REPRODUTIVA DO MACHO DE *Podisus nigrispinus*
(DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

por

AGNA RITA DOS SANTOS RODRIGUES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola, da
Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de
Mestre em Entomologia Agrícola.

RECIFE - PE

Fevereiro – 2008

COMPORTAMENTO E FISIOLOGIA REPRODUTIVA DO MACHO DE *Podisus nigrispinus*
(DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

por

AGNA RITA DOS SANTOS RODRIGUES

Comitê de Orientação:

Jorge Braz Torres – UFRPE

Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Herbert Álvaro Abreu de Siqueira - UFRPE

RECIFE - PE

Fevereiro – 2008

COMPORTAMENTO E FISIOLOGIA REPRODUTIVA DO MACHO DE *Podisus nigrispinus*
(DALLAS) (HEMIPTERA: PENTATOMIDAE)

por

AGNA RITA DOS SANTOS RODRIGUES

Orientador: _____
Jorge Braz Torres – UFRPE

Examinadores: _____
Valéria Wanderley Teixeira – UFRPE

Hebert Álvaro Abreu de Siqueira – UFRPE

José Eduardo Serrão – UFV

À Deus por ter me dado a liberdade para lutar pelos meus objetivos e a resignação nos momentos de angústia. Aos meus pais pela força, carinho e amor incondicional. Aos meus irmãos pela confiança e ajuda para que realizasse meus humildes sonhos. Aos meus pequenos pela esperança de dias repletos de felicidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através do Programa PROCAD nº 83054.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia Agrícola (PPGEA) pela oportunidade da realização deste curso.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Laboratório de Biologia Celular pelo acolhimento e oportunidade para executar parte da minha pesquisa.

Ao meu Orientador Jorge Braz Torres por todo e qualquer tipo de auxílio prestado durante o tempo de convívio, principalmente pelas palavras e confiança.

Aos professores do PPGEA: Ailton, Auristela, Edmilson, Jorge, Herbert, Manoel Guedes, Reginaldo, Souza Leão, Valéria e Vargas.

Ao professor Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, pelos aconselhamentos durante as fases de planejamento e execução desse trabalho.

Ao professor José Eduardo Serrão pela ajuda, amizade e conhecimento passado. A Mércia e Igor por ter me recebido em sua casa. Ao pessoal do laboratório da UFV: Aline, Carolina, Cirlei, Dihego, Luiza, Madu, Malu, Marcília, Marcus, Margareth, Marina, Monteiro, Riviane e Wagner.

À Dra. Teresinha Zanuncio pela prontidão em ajudar no período em que estive em Viçosa.

Aos secretários da Coordenação da Fitossanidade, Darci e Romildo, pela dedicação e presteza.

Aos meus amigos Miguel e Mirian por um dia terem se preocupado comigo e ajudado quando precisei.

Ao amigo Hélio Wilson “Mestre da Ciência” que sempre transmitiu palavras de incentivo e se fez presente em minha vida.

Ao “Drº Pesquisador Phd” Joézio e ao mestre Ivênio pela confiança. A minha irmã Heliete, Sandrinha, pela dedicação.

À Joana Maria Santos Ferreira, Marcelo da Costa Mendonça e Genésio Tâmara Ribeiro pela experiência.

Aos amigos do Laboratório de Entomologia da Embrapa CPATC: Valda Cleide, Joel, Raimundo e Jorge.

Aos meninos do PPGEA: Alberto, Alexandre, Alicely, André, Christian, Eduardo, Érika, Esmeralda, Fernanda, Hugo, Júnior, Lígia, Marcos, Roberta, Shênia, Tarcísia e Wendel.

Aos colegas de Laboratório Alisson, Bruno, Izeudo, Roberta Leme e Robério.

Aos componentes do grupo Maguari: Alan, Aline Alves, José Reginaldo, Vanice e Viviane.

À Alan Azevedo, Aline Vasconcelos e Daniela Carraro pelo acolhimento em Viçosa.

À Erlen Keila Candido e Silva pela amizade, respeito e confiança no dia a dia.

Às minhas amigas Daniela, Lourdes, Rosana e Zil, por compartilharem comigo momentos de alegria.

Aos meus pais José Arlindo Rodrigues e Josefa dos Santos Rodrigues fonte de amor inesgotável. Aos meus irmãos: Alexandra, Alex, Adeyde e Werik. Aos irmãos adquiridos: Robson, Valmir e Marcela. Aos meus pequenos, razão da minha vida: Ana Melanie, Matheus, Meyve e Júnior.

Enfim, a todos os colegas, companheiros e diversos que um dia conheci.

SUMÁRIO

	Páginas
AGRADECIMENTOS	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO	01
LITERATURA CITADA	04
2 ACASALAMENTO EM <i>Podisus nigrispinus</i> (DALLAS) (HEM.: PENTATOMIDAE) REQUER LONGAS CÓPULAS PARA O SUCESSO REPRODUTIVO.....	07
RESUMO	08
ABSTRACT	09
INTRODUÇÃO	10
MATERIAL E MÉTODOS	12
RESULTADOS.....	17
DISCUSSÃO.....	20
AGRADECIMENTOS.....	24
LITERATURA CITADA.....	24
3 ESPERMATOGÊNESE E SUCESSO REPRODUTIVO EM <i>Podisus nigrispinus</i> (DALLAS) (HEM.: PENTATOMIDAE)	32
RESUMO	33
ABSTRACT	34
INTRODUÇÃO	35

MATERIAL E MÉTODOS	37
RESULTADOS.....	39
DISCUSSÃO.....	41
AGRADECIMENTOS.....	45
LITERATURA CITADA.....	45

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hem.: Pentatomidae) é uma espécie nativa do Brasil e ocorre naturalmente em diversos ecossistemas agrícolas (Torres *et al.* 2006). Este percevejo apresenta hábito alimentar generalista, alimentando-se primariamente de larvas e lagartas, sendo constatado como predador natural de 34 diferentes espécies de insetos de importância econômica (Torres *et al.* 2006). Atualmente, *P. nigrispinus* tem sido criado e liberado para o controle biológico aplicado de pragas, principalmente de lagartas desfolhadoras em florestas de eucalipto (Zanuncio *et al.* 1994, Torres *et al.* 2006).

Estudos de biologia e comportamento mostram que fêmeas de *P. nigrispinus* realizam múltiplas cópulas (poliandria). Em laboratório, uma fêmea pode realizar até 13 cópulas, enquanto que apenas três a quatro cópulas em intervalos de uma a duas semanas são suficientes para fertilizar os ovos produzidos e manter a taxa de eclosão de ninfas acima de 80% durante a sua vida (Torres *et al.* 1997). Este comportamento de múltiplas cópulas em insetos é considerado uma estratégia elaborada pelas fêmeas para manter não somente a alta fertilidade, mas também obter benefícios secundários como nutrientes transferidos junto ao material seminal durante a cópula (Koshiyama *et al.* 1996) e aumentar a heterogeneidade dos descendentes (Thornhill & Alcock 1983).

No campo, fêmeas de *Podisus* utilizam feromônios sexuais para atrair os machos e obter a cópula (Aldrich *et al.* 1984). O encontro com machos para a realização da cópula e, conseqüentemente, a reposição de espermatozóides pode ser dificultada em situações de baixa densidade populacional. Isto porque *P. nigrispinus* pode ocorrer em diferentes habitats, mas em

baixas populações (Aldrich *et al.* 1997). Essas populações em baixas densidades podem ser encontradas nas bordaduras das lavouras, áreas de pousio nos períodos de entressafra e no interior das lavouras com baixa provisão de alimento. Legaspi *et al.* (1994) dissecaram fêmeas de *Podisus maculiventris* (Say) virgens e com 24-48h após a cópula. Esses autores observaram que fêmeas virgens possuíam o ducto espermatecal, que na ocasião denominaram de espermateca, delgados e menores quando comparados àqueles oriundos de fêmeas copuladas e de mesma idade, os quais eram maiores e completamente dilatados. Portanto, apesar de realizarem múltiplas cópulas, as fêmeas de *Podisus* parecem aproveitar o máximo de uma cópula realizada preenchendo completamente a sua espermateca (Soares 2006).

O papel do reacasamento em trazer benefícios às fêmeas de *P. nigrispinus*, além da fertilização dos ovos, tem sido investigado. A longevidade e a fecundidade das fêmeas têm sido utilizadas como medidas indiretas dos benefícios. Os resultados, no entanto, mostram que fêmeas submetidas ao acasalamento manipulado no tempo e em menor número (<3) vivem, aproximadamente, duas semanas a mais que fêmeas continuamente pareadas (Torres *et al.* 1997, Sousa-Souto *et al.* 2006). Conseqüentemente, são mais fecundas (com produção superior, em média de 150 ovos) do que fêmeas continuamente pareadas (Torres *et al.* 1997). A menor sobrevivência de fêmeas continuamente pareadas pode ser um resultado possivelmente ocasionado do desgaste das fêmeas pela constante perturbação dos machos na tentativa de copular. Quanto à produtividade de ovos, existe claro efeito da cópula na dinâmica de oviposição, mas não na produção total. Fêmeas sem copular exibem maior período de pré-oviposição e intervalos entre posturas (De Clercq & Degheele 1997, Torres *et al.* 1997). Resultado este que expressa um comportamento da fêmea de esperar uma possível cópula, e ter seus ovos fertilizados. Além disso, a ovogênese em *Podisus* parece ser constante e independente das fêmeas estarem copuladas ou não (Legaspi & Legaspi 2005). Portanto, a eficiência da cópula exerce

papel importante no crescimento populacional deste predador em campo, seja visto que fêmeas de campo se apresentam como menos fecundas, depositam posturas menores e mais irregulares no tempo comparadas àquelas criadas em laboratório (Evans 1982, Legaspi & Legaspi 2005). Características estas diretamente influenciadas pelo status nutricional das fêmeas criadas nas condições irregulares de alimento em campo (Wiedenmann *et al.* 1996), mas que pode, também, estar relacionada com a ausência de cópulas freqüentes. Isto porque fêmeas de *Podisus* sem copular apresentam redução significativa na sua fecundidade e irregularidades na produção de ovos (Torres *et al.* 1997).

A capacidade de fêmeas de insetos em armazenar espermatozóides oriundos de múltiplas cópulas pode ter ocasionado uma pressão de seleção no comportamento de cópula dos machos. Este comportamento pode forçar à criação de adaptações para assegurar a produção de descendentes. Esta evolução é constatada desde o ato de estimular a aceitação da fêmea até o impedimento de futuras cópulas. Durante o comportamento de corte é comum, em alguns grupos de predadores, a oferta de presas a parceira e até o comportamento de produção de substâncias para interrupção do canal copulatório após o término da cópula para evitar futuras cópulas (Alcock 1994). Entre estes extremos, diversos comportamentos foram desenvolvidos pelos machos para atingirem os seus objetivos. Assim, podemos citar a produção de grande quantidade de material seminal para o preenchimento completo da espermateca induzindo inaptidão nas fêmeas para futuras cópulas, substâncias acessórias de valor nutritivo para seus espermatozóides e para as fêmeas (espermatóforos), espermatozóides apyrene para induzir competição entre espermatozóides, prolongamento da cópula para garantir que os ovócitos já desenvolvidos sejam fertilizados pelos seus espermatozóides (Thornhill & Alcock 1983, McLain 1989). Para esta última estratégia embora não investigada sob o aspecto do tempo, podemos ter duas situações: (i) tempo necessário para a transferência de espermatozóides e completo preenchimento da

espermoteca da fêmea ou (ii) guarda da fêmea para permitir que seus espermatozóides fertilizem o máximo de ovócitos já desenvolvidos.

Fêmeas do percevejo predador *P. nigrispinus* tornam-se receptivas a partir do segundo dia de idade e com o pico de aceitação de machos para copular aos quatro dias (Carvalho *et al.* 1994). Estando a fêmea receptiva à cópula e iniciando esta, a duração é variável e pode chegar até 13h (Torres & Zanuncio 2001). Este comportamento de longas cópulas pode estar relacionado à garantia que os ovócitos já formados sejam fertilizados imediatamente. A partir do período de maturação sexual das fêmeas de *P. nigrispinus* (3 a 4 dias) ocorre ovogênese independente de estarem copuladas ou não. De Clercq & Degheele (1997) observaram que fêmeas de *P. maculiventris* com a ausência de cópulas, apresentaram maior período de pré-oviposição e ao serem dissecadas apresentavam ovócitos completamente desenvolvidos a espera de serem fertilizados. Fêmeas sem copular são forçadas a depositarem os ovócitos já desenvolvidos após certo período mesmo não estando fertilizados. Deste ponto de vista, a estratégia do macho em prolongar a cópula garante que aqueles ovócitos já desenvolvidos seriam fertilizados pelos seus espermatozóides. Assim, foi testada a hipótese que cópulas prolongadas estão relacionadas à capacidade do macho em guardar a fêmea de futuras cópulas e garantir que os ovócitos já desenvolvidos sejam fertilizados pelos seus espermatozóides. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo investigar o comportamento de cópula e a fisiologia reprodutiva de machos de *P. nigrispinus* em função do seu tamanho, status prévio de acasalamento e risco de predação.

Literatura Citada

Alcock, J. 1994. Postinsemination associations between males and females in insects: the male-guarding hypothesis. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 1-21.

- Aldrich, J.R., J.C. Zanuncio, E.F. Vilela, J.B. Torres & R.D. Cave. 1997.** Fields tests of predaceous pentatomid pheromones and semiochemistry of *Podisus* and *Supputius* species (Heteroptera: Pentatomidae: Asopinae). An. Soc. Entomol. Bras. 26: 1-14.
- Aldrich, J.R., J.P. Kochansky & C.B. Abrams. 1984.** Attractant for a beneficial insect and its parasitoids: pheromone of the predatory spined soldier bug, *Podisus maculiventris* (Hem.: Pentatomidae). Environ. Entomol. 13: 1031-1036.
- Carvalho, R.D.S., E.F. Vilela, M. Borges & J.C. Zanuncio. 1994.** Ritmo do comportamento de acasalamento e atividade sexual de *Podisus connexivus* Bergroth (Heteroptera: Pentatomidae: Asopinae). An. Soc. Entomol. Bras. 23: 197-202.
- De Clercq, P. & D. Degheele. 1997.** Effects of mating status on body weight, oviposition, egg load, and predation in the predatory stinkbug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 90: 121-127.
- Evans, E.W. 1982.** Timing of reproduction by predatory stinkbugs (Hemiptera: Heteroptera, Pentatomidae): patterns and consequences for a generalist and a specialist. Ecology 63: 147-158.
- Koshiyama, Y., H. Tsumuki, K. Fujisaki, & F. Nakasuji. 1996.** Nutritional contribution to females of ¹⁴C-labeled male secretions transferred during mating in *Menida scotti* (Heteroptera: Pentatomidae). Res. Popul. Ecol. 38: 51-56.
- Legaspi J.C. & B.C. Legaspi. 2005.** Body weights and egg loads in field-collected *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). Fl. Entomol. 88: 38-42.
- Legaspi, J.C., V. Russell & B.C. Legaspi Jr. 1994.** Microscopic examination of the spermatheca as an indicator of mating success in *Podisus maculiventris* (Say). Southwest. Entomol. 19: 189-190.
- McLain, D.K. 1989.** Prolonged copulation as a post-insemination guarding tactic in a natural population of the ragwort seed bug. Anim. Behav. 38: 659-664.
- Soares, M.A. 2006.** Capacidade reprodutiva de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) com diferentes frequências de acasalamento e troca de parceiros em plantas de soja. Dissertação de Mestrado, Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 102p.
- Sousa-Souto, L., W.S. Evangelista Jr. & E.R. Lima. 2006.** What the costs and benefits of female multiple mating and polyandry in a stinkbug predator *Podisus nigrispinus* Dallas (Heteroptera: Pentatomidae)? Braz. Arch. Biol. Tech. 49: 923-926.
- Thornhill, R. & J. Alcock. 1983.** The evolution of insect mating systems. Cambridge, Harvard University Press, 564p.
- Torres, J.B. & J.C. Zanuncio. 2001.** Effects of sequential mating by males on reproductive output of the stinkbug predator, *Podisus nigrispinus*. BioControl 46: 469-480.

- Torres, J.B., J.C. Zanuncio & M.C. Oliveira. 1997.** Mating frequency and its effect on female reproductive output in the stinkbug predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent. 62: 491-498.
- Torres, J.B., J.C. Zanuncio & M.A. Moura. 2006.** The predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*: biology, ecology and augmentative releases for lepidopteran larval control in *Eucalyptus* in Brazil. Persp. Agric. Vet. Sci. 15: 1-16.
- Zanuncio, J.C., J.B. Alves, T.V. Zanuncio & J.F. Garcia. 1994.** Hemipterous predators of eucalypt defoliator caterpillars. For. Ecol. Manag. 65: 65-73.
- Wiedenmann, R. N., J. C. Legaspi & R. J. O'Neil. 1996.** Impact of prey density and facultative plant feeding on the life history of the predator *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae), p. 94-118. In O. Alomar & R.N. Wiedenmann (eds.), Zoophytophagous Heteroptera: implications for life history and integrated pest management. Lanham, Entomological Society of America, 202p.

CAPÍTULO 2

ACASALAMENTO EM *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEM.: PENTATOMIDAE) REQUER LONGAS CÓPULAS PARA O SUCESSO REPRODUTIVO

AGNA R.S. RODRIGUES¹, JORGE B. TORRES¹, HERBERT A.A. SIQUEIRA¹ E VALÉRIA W. TEIXEIRA²

¹Departamento de Agronomia – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av.
Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos 52171-900 Recife, PE.

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco
Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos 52171-900 Recife, PE.

Rodrigues, A.R.S., J.B. Torres, H.A.A. Siqueira & V.W. Teixeira. Acasalamento em *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hem.: Pentatomidae) requer longas cópulas para o sucesso reprodutivo. Neotropical Entomology.

RESUMO – A realização de múltiplas e longas cópulas pelo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hem.: Pentatomidae) tem sido uma incógnita. Neste estudo foram investigados o comportamento de cópula e sucesso reprodutivo de *P. nigrispinus* em função do tamanho do macho, seu status prévio de acasalamento, risco de predação e interrupção de cópulas. A escolha da fêmea para o acasalamento foi estudada sob chance múltipla, parcial ou sem chance de escolha por machos grandes ou pequenos. O comportamento para o início do acasalamento e tempo de cópula sob risco de predação [presença de *Polistes versicolor* Oliver (Hym.: Vespidae)] foi comparado com casais sem risco de predação. Também, objetivando determinar os motivos de longas cópulas, fêmeas tiveram a cópula interrompida em diferentes intervalos. Os resultados mostram que machos e fêmeas de *P. nigrispinus* acasalaram independente do tamanho e status prévio de acasalamento dos machos, além de não apresentarem preferência de parceiro. A duração da cópula, escolha do parceiro e a fertilidade das fêmeas não sofreram influência do tamanho do macho e, também, o risco de predação não alterou o comportamento de acasalamento e duração de cópula. Fêmeas com cópulas interrompidas após 30, 60, 120 e 240 minutos apresentaram baixa viabilidade de ovos (0; 3,1; 7,7 e 34%, respectivamente), enquanto aquelas com tempo natural de cópula (338 a 671 minutos) obtiveram 74,2% de viabilidade. Portanto, o sucesso reprodutivo de *P. nigrispinus* não depende da qualidade do macho e seu status de acasalamento, mas requer longas cópulas para a transferência de espermatozóides.

PALAVRAS-CHAVE: Asopinae, múltiplas cópulas, tamanho do macho, duração de cópula, reprodução

Podisus nigrispinus (DALLAS) (HEM.: PENTATOMIDAE) REQUIRES LONG MATINGS
FOR REPRODUCTIVE SUCCESS

ABSTRACT – In order to investigate the role of multiple and long matings in *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hem.: Pentatomidae) regarding their reproductive success, a series of experiments was conducted. The reproductive success of *P. nigrispinus* was investigated as function of females' choice for their mating pair based on male body size and previous mating status, risk of predation and duration of mating. The female mating behavior was studied with female having multiple, partial or no partner choice based on male body size. Time to initiate a mating and its duration was observed after pairing males and females under risk of predation imposed by the presence of the predatory wasp *Polistes versicolor* Oliver (Hym.: Vespidae). In addition, aiming to determine the reasons for lasting matings, female had their mating interrupted on different intervals. The results indicate that *P. nigrispinus* does not select male partners as function of body size and mating status. Furthermore, females do not exhibit partner preference. Duration of mating, mating partners' choice, and female fecundity and fertility were not influenced by the male size and risk of predation imposed by the predatory wasps. Mating interrupted after 30, 60, 120 and 240 minutes resulted in only 0, 3.1, 7.7 and 34% of egg hatching compared to 74.2% under uninterrupted mating that ranged from 338 to 671 minutes. Therefore, the reproductive success of *P. nigrispinus* females does not depend on male size and its mating status, but requires long-lasting mating as condition to spermatozoa transference to the females.

KEY WORDS: Asopinae, multiple mating, male size, reproduction

Introdução

Para determinadas espécies de insetos, a ocorrência de múltiplas cópulas sugere que uma ou poucas cópulas não são suficientes para as fêmeas obterem o máximo de sucesso na produção de descendentes (Ridley 1990). Embora múltiplas cópulas possam resultar em benefícios reprodutivos, estas também podem gerar desvantagens para as fêmeas. Como desvantagens são relatados o aumento do custo de energia e tempo (Thornhill & Alcock 1983, Arnqvist 1989), o aumento do risco de predação e injúrias físicas (Arnqvist 1989, Crudgington & Siva-Jothy 2000), a transferência de patógenos (Rolff & Siva-Jothy 2002), o efeito tóxico de substâncias transferidas junto ao material seminal (Chapman *et al.* 1995), dentre outros. Já os benefícios têm sido apresentados baseados em duas razões: (i) ganho em material genético e (ii) ganho em material nutricional (Reynolds 1996). O ganho em material genético ocorre através da manipulação da paternidade dos descendentes (Edvardsson & Arnqvist 2000), diminuição da incompatibilidade de genótipos (Zeh & Zeh 1996) e impedimento de consangüinidade na população (Tregenza & Wedell 2002). Quanto ao ganho de nutrientes é citada a transferência de substâncias acessórias contidas no material seminal que são utilizadas no processo de respiração celular e vitelogênese (Koshiyama *et al.* 1996), no processo de oviposição (Herndon & Wolfner 1995), no processo de ativação dos espermatozoides (Osanai & Chen 1993), na manutenção da viabilidade dos espermatozoides durante o estoque na espermateca (Tram & Wolfner 1999), que garantem o seu uso (Edvardsson & Canal 2006).

Fêmeas do percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hem.: Pentatomidae) realizam múltiplas e longas cópulas. A função do reacasalamento em trazer benefícios às fêmeas de *P. nigrispinus*, além da fertilização dos ovócitos, tem sido investigado, utilizando a longevidade e a fecundidade das fêmeas como medidas indiretas dos benefícios das múltiplas cópulas. Os resultados, no entanto, mostram que fêmeas de *P. nigrispinus* submetidas a tempos de

acasalamento diferenciados e com três cópulas vivem, aproximadamente, duas semanas a mais que fêmeas continuamente pareadas (Torres *et al.* 1997, Sousa-Souto *et al.* 2006). Conseqüentemente, são mais fecundas (produção superior, em média de 150 ovos) do que as fêmeas continuamente acasaladas (Torres *et al.* 1997). Estes resultados sugerem que cópulas em número excessivo não favorecem as fêmeas. Em laboratório sob condição de pareamento contínuo, uma fêmea de *P. nigrispinus* pode realizar até 13 cópulas com o mesmo macho (J.B. Torres, dados não publicados). Entretanto, caracteres para seleção de cópula em *P. nigrispinus* não são ainda conhecidos. Contudo, em insetos o tamanho do macho é um dos traços mais favorecidos e relatados com sucesso de paternidade em situação onde a fêmea pode escolher o parceiro (Andersson 1994).

Estudos usualmente contrastam o número de descendentes produzidos em diferentes proporções de acasalamentos como forma de avaliar a necessidade de múltiplas cópulas (Harano *et al.* 2006). Múltiplas cópulas e o entendimento de seleção sexual têm sido revisados, notadamente com enfoque na reprodução diferencial entre machos (Arnqvist & Danielson 1999). Tal reprodução pode ser resultante dos dois mecanismos da seleção sexual: a competição entre machos e a escolha da fêmea (Thornhill & Alcock 1983). Em múltiplas cópulas, conseqüentemente, fêmeas podem escolher parceiros que trazem maiores benefícios (Berrigan & Locke 1991, Parker & Simmons 1994). Para alguns insetos, recursos oferecidos como território, morfologia genital, peso e tamanho do macho ou o tamanho de estruturas relacionadas ao comportamento de corte são sexualmente selecionados e estão associados ao sucesso de cópula (Andersson 1994, Andersson & Iwasa 1996, Tadler *et al.* 1999). Como fêmeas de *P. nigrispinus* realizam múltiplas e longas cópulas, duas hipóteses foram testadas: fêmeas deste percevejo predador ao realizar múltiplas cópulas escolhem machos que oferecem maiores benefícios para o seu sucesso reprodutivo e longevidade e, assim, a escolha do parceiro é direcionada pelo tamanho

do parceiro e seu status prévio de acasalamento (i) e; quanto a longas cópulas, este fato estaria envolvido no comportamento do macho em guardar as fêmeas de futuras cópulas ou exigir este tempo para um completo sucesso em transferir material seminal às fêmeas (ii). Isto porque fêmeas de *Podisus* possuem ovócitos formados quando receptivas ao acasalamento (De Clercq & Degheele 1997), os quais seriam fertilizados no período de guarda utilizando aqueles espermatozoides imediatamente transferidos. Dessa forma, objetivando testar as duas hipóteses acima citadas, o presente estudo desenvolveu experimentos para investigar o comportamento das fêmeas de *P. nigrispinus* na escolha dos machos para copular baseado no seu tamanho e no status prévio de acasalamento (i); verificar a influência do tamanho e do status prévio de acasalamento do macho na duração de cópula e o desempenho reprodutivo das fêmeas (ii); investigar se o risco de predação interfere com o comportamento e a duração da cópula (iii), e avaliar a duração da cópula como fator determinante do sucesso de fertilização das fêmeas de *P. nigrispinus* (iv).

Material e Métodos

Os adultos de *P. nigrispinus* utilizados nos experimentos foram obtidos da criação do Laboratório de Controle Biológico do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), mantida de acordo com a metodologia descrita por Torres *et al.* (2006), sob $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e 12h de fotofase. Ninfas de segundo instar de *P. nigrispinus* foram separadas em potes plásticos de 500mL ou em gaiolas de acrílico de criação de ninfas. O alimento foi oferecido em abundância durante toda a fase ninfal, sendo utilizadas como presas pupas de *Tenebrio molitor* L. (Col.: Tenebrionidae) ou lagartas do curuquerê-do-algodoeiro, *Alabama argillacea* (Hübner) (Lep.: Noctuidae). Nos estudos foram utilizados insetos adultos de idade, tamanho e peso conhecidos, os quais foram manipulados durante a criação das ninfas mediante

densidade populacional por recipiente de criação para obtenção de machos adultos com variação de tamanho e peso desejado.

Influência do tamanho do macho na escolha da fêmea - chance de múltipla escolha. Adultos do predador com quatro dias de idade e, ainda virgens, foram utilizados nos experimentos, considerando que tanto machos quanto fêmeas são receptivos a cópula a partir dos três dias de idade adulta (Carvalho *et al.* 1994). As fêmeas utilizadas foram de peso variando de 70 a 80 mg e macho de duas categorias de pesos: pequeno (<40 mg) ou grande (>50 mg). Após a segunda cópula, os machos foram mortos por congelamento e medidos (distância entre espinhos do escutelo) empregando estereomicroscópio com ocular micrométrica para averiguar a correlação entre tamanho e peso das categorias de machos utilizadas. De modo geral, o peso de adultos machos e fêmeas de *P. nigrispinus* varia entre 35 a 100 mg e 45 a 140 mg, respectivamente (Torres *et al.* 2006). O experimento com chance múltipla de escolha foi realizado com 60 casais divididos em três grupos de 20 (i.e., 20 casais por gaiola). Os insetos foram marcados no dorso com etiquetas (~2 mm de diâmetro) numeradas. Estes, então, foram liberados em gaiolas de acrílico transparente (31 x 43 x 44 cm) para observação da escolha e duração do período de cópula. Com o término da cópula, os insetos que acasalaram foram individualizados. O reacasalamento foi realizado após 15 dias, sendo realizadas novas observações para a escolha da fêmea quanto à preferência de parceiro. As observações procederam quanto ao tamanho do macho para primeira e segunda cópula e à duração do período de cópula, parâmetros definidos quando a fêmea escolhia o mesmo macho para a segunda cópula ou machos de mesma categoria de tamanho dentre os machos oferecidos. Durante o período entre as cópulas (i.e., 15 dias), as fêmeas e machos foram mantidos individualizados em potes plásticos de 500 mL. Os insetos foram alimentados com pupas de *T. molitor*, vagem de feijão e água. Esta última foi oferecida utilizando tubo anestésico de 1,5 mL. As fêmeas foram mantidas e observadas a cada dois dias com

substituição da presa consumida, coleta das posturas e contagem de sobreviventes. As posturas foram retiradas dos potes com um chumaço de algodão e os ovos contados. Cada postura foi mantida isolada em placas de Petri, para obtenção de ninfas.

Influência do tamanho e status prévio de acasalamento do macho na escolha da fêmea - chance parcial de escolha. Adultos do predador com quatro dias de idade e, ainda virgens, foram utilizados no estudo. Os machos também foram ranqueados, conforme descrito no item anterior, em machos grandes e machos pequenos. A chance parcial de escolha consistiu na observação de acasalamento na condição de 1 fêmea e 2 machos totalizando três situações: sem chance de escolha, (i) 2 machos grandes >50 mg e (ii) 2 machos pequenos <40 mg; e com chance parcial de escolha (iii) 1 macho grande >50 mg e 1 macho pequeno <40 mg. Os insetos foram marcados no dorso com etiquetas numeradas e liberados em gaiolas plásticas transparente de 1 L. Nesta condição, após o término da cópula a fêmea foi retirada e, imediatamente, uma segunda fêmea virgem foi introduzida no recipiente, assim, sendo exposta a escolha de um macho ainda virgem ou macho que acabou de realizar um acasalamento. Para a primeira e segunda fêmea foram feitas observações de escolha e duração do período de cópula. Após 15 dias, a primeira fêmea oferecida foi reagrupada com os machos em cada situação, sendo realizadas novas observações para a escolha da fêmea, duração do período de cópula e preferência de parceiro. Durante o período experimental, machos e fêmeas do predador foram mantidos semelhantemente ao ítem anterior.

Risco de predação e comportamento de cópula. Adultos de *P. nigrispinus* foram submetidos ao risco de predação quanto ao comportamento de acasalamento. O risco de predação consistiu na presença da vespa predadora *Polistes versicolor* Olivier (Hym.: Vespidae) junto aos percevejos. Ninhos com cinco a seis vespas adultas foram coletados nas instalações do campus da UFRPE. Para isso, utilizou-se sacolas de papel de 2 L de volume e ao anoitecer (i.e., 18:00 a 19:00h) os ninhos das vespas foram transferidos para o interior de gaiolas de acrílico transparentes de

dimensões 31 x 43 x 44 cm. A gaiola apresentava aberturas circulares fechadas com tela para favorecer a ventilação e duas aberturas fechadas com mangas de camisa para facilitar a manipulação do material e insetos no interior da mesma. Os ninhos das vespas, dentro da sacola, foram fixados na parte superior da gaiola em posição semelhante a que estava preso ao substrato original. No interior da gaiola foi, também, introduzido dois ponteiros de algodão de ~20 cm de altura com folhas jovens e com cinco a oito folhas completamente desenvolvidas. Estes ponteiros foram acondicionados em frascos de vidro de 50 mL contendo água para evitar murchamento precoce das folhas. Lagartas de *A. argillacea* de terceiro/quarto instares foram liberadas sobre os ponteiros de algodão como presas para os percevejos e vespas predadoras.

A avaliação do risco de predação consistiu na observação do comportamento e duração de cópula em duas condições: risco de predação para iniciar a cópula – indivíduos com risco (i) e risco de predação após iniciado a cópula – casais com risco (ii). A condição indivíduos com risco foi estudada observando 40 casais divididos em quatro repetições de 10 casais por gaiola contendo as vespas, antes de iniciar a cópula. Na condição casais com risco, o pareamento foi realizado anteriormente e após início efetivo da cópula (posicionamento opostos), os casais foram introduzidos em gaiolas contendo as vespas. Estas condições foram comparadas com uma terceira situação onde fêmeas e machos foram liberados nas gaiolas sem vespas (indivíduos sem risco).

Tempo de cópula. Foram utilizados adultos virgens com quatro dias de idade para investigar o efeito da interrupção da cópula no sucesso reprodutivo das fêmeas de *P. nigrispinus*. Os insetos foram liberados em gaiolas de acrílico transparente permitindo livre escolha de parceiros. Logo após observado o início da cópula, os casais foram retirados e distribuídos aleatoriamente para compor os diferentes tempos de interrupção da cópula: insetos com cópula interrompida aos 30, 60, 120 e 240 minutos, comparados ao tempo natural de duração de cópula sem interrupção. Cada tratamento constou de 14 casais (repetições). Após atingirem o tempo para interrupção da cópula,

os casais foram separados e as fêmeas mantidas em potes plásticos de 500 mL, recebendo mesma alimentação empregada nos experimentos anteriores. As posturas foram coletadas e mantidas em placas de Petri para observação da produção de ninfas como medida indireta da transferência de espermatozoides para as fêmeas.

Análises. Para averiguar se havia correlação entre peso dos machos selecionados e ranqueados em dois grupos (pequeno e grande) e seu tamanho externo entre espinhos dorsais, os dados de tamanho e peso foram submetidos à análise de correlação utilizando-se o Proc CORR do SAS. Os resultados de escolha da fêmea pelo macho como parceiro foram analisados usando o Proc FREQ do SAS e interpretados pelo teste de χ^2 . As características de comportamento e de reprodução avaliadas como duração de cópula, número de ovos e ninfas produzidas, longevidade da fêmea e viabilidade de ovos foram submetidas à análise de variância (Proc ANOVA) ou teste t (Proc TTEST), após serem submetidos aos testes de Kolmogorov e Bartlett para normalidade e homogeneidade de variância, respectivamente. O efeito do risco de predação na frequência de cópula após a exposição às vespas predadoras na gaiola, nas situações indivíduos com risco e indivíduos sem risco, foi analisado através do Proc FREQ do SAS e teste de χ^2 . A duração de cópula observada para os casais expostos a risco de predação antes do início da cópula, após terem iniciado a cópula e sem risco de predação foi submetida à análise de variância através do Proc ANOVA, comparando os três tratamentos. Os resultados obtidos das fêmeas submetidas à interrupção do tempo de cópula, período de pré-oviposição, produção de ovos e ninfas (variáveis dependentes) e intervalos de interrupção de cópula (variável independente) foram submetidos à análise de regressão através do Proc REG do SAS. O efeito da interrupção da cópula na longevidade da fêmea foi analisado através de análise de variância (Proc ANOVA) do SAS. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa SAS Version 8.02 (SAS Institute 2001).

Resultados

Influência do tamanho do macho na escolha da fêmea - chance de múltipla escolha. O peso dos machos foi, em média, de 38,1 mg para machos pequenos e de 53,4 mg para machos grandes. Enquanto que os dados de tamanho foram, em média, de 5,4 mm para machos pequenos e de 5,9 mm para machos grandes. Assim, foi observado que os dados de tamanho e peso de machos ranqueados no estudo correlacionaram entre maior peso e maior tamanho ($r = 0,77$, $P < 0,0001$).

Entre as fêmeas e machos pareados, verificou-se que 10% das fêmeas não acasalaram pela primeira vez, portanto de 60 pareamentos, 54 acasalamentos foram observados de fato. A escolha das fêmeas em condição de múltipla escolha entre machos grandes e pequenos para copular foi similar tanto na primeira cópula ($\chi^2 = 0,33$; $P = 0,5631$) quanto na segunda cópula ($\chi^2 = 0,05$; $P = 0,8185$). Fêmeas com escolha inicial, seja por macho grande ou macho pequeno, manteve a mesma proporção para a realização da segunda cópula para machos grandes ($\chi^2 = 2,66$; $P = 0,102$) e para machos pequenos ($\chi^2 = 1,87$; $P = 0,1715$). Entre as 38 fêmeas acasaladas pela segunda vez, apenas 13% ($n = 5$) das fêmeas demonstraram preferência de parceiro entre primeira e segunda cópula.

O tamanho do macho não influenciou a duração de cópula tanto na primeira ($t_{42,5} = -1,42$; $P = 0,1626$) quanto na segunda cópula da fêmea ($t_{25,5} = -1,07$; $P = 0,2952$) (Fig. 1A). Contudo, na análise sem distinção do efeito do tamanho do macho (macho grande + pequeno) na duração da cópula foi observado que machos de *P. nigrispinus* apresentaram maior investimento de tempo na primeira cópula realizada ($F_{1, 88} = 10,1$; $P = 0,0020$) (Fig. 2).

As características reprodutivas de fêmeas de *P. nigrispinus*, realizando as duas cópulas ($n = 37$) aos 4 e 19 dias de idade não foram afetadas pelas classes de tamanhos dos machos utilizados. A longevidade das fêmeas variou, em média, de 55,4 a 64,2 dias ($F_{2, 34} = 1,18$; $P = 0,3204$); o

número de ovos produzidos foram de 507,3 a 621,8 ($F_{2, 34} = 0,82$; $P = 0,4488$); e o número de ninfas de 428,3 a 513,2 ($F_{2, 34} = 0,38$; $P = 0,6877$).

Influência do tamanho e status prévio de acasalamento do macho na escolha da fêmea - chance parcial de escolha. O peso dos machos ranqueados como pequeno foi, em média, de 37,4 mg e, como macho grande de 53,7 mg. Já o tamanho foi, em média, de 5,3 mm para machos pequenos e de 5,8 mm para machos grandes. Assim, os dados de tamanho e peso de macho correlacionaram entre maior peso e maior tamanho ($r = 0,78$, $P < 0,0001$), mostrando consistência quanto a relação tamanho e peso dos machos utilizados, como encontrado no estudo com múltipla escolha.

A escolha de parceiro para segunda cópula foi similar quando as fêmeas foram submetidas aos machos de mesma categoria de peso: dois machos grandes ($\chi^2 = 0,13$; $P = 0,7232$) ou dois machos pequenos ($\chi^2 = 0,04$; $P = 0,8444$). Da mesma forma, quando as fêmeas foram submetidas a condição de escolha parcial de machos de diferentes classes de peso, foi observado que a escolha de parceiro entre machos grandes e pequenos foi similar na primeira ($\chi^2 = 0,22$; $P = 0,6426$) e na segunda cópula ($\chi^2 = 0,03$; $P = 0,8638$). Para fêmeas com escolha inicial, seja por macho grande ou macho pequeno, a realização da segunda cópula para machos grandes ($\chi^2 = 0,25$; $P = 0,6143$) e para machos pequenos ($\chi^2 = 0,05$; $P = 0,8134$) permaneceu na mesma proporção. Entre as fêmeas acasaladas pela segunda vez, 53% ($n = 9/17$) das fêmeas não demonstraram preferência de parceiro entre primeira e segunda cópula. O efeito do status prévio de acasalamento não alterou o comportamento de escolha. A escolha da segunda fêmea virgem quando expostas a machos virgens ou acasalados foi similar tanto nas situações sem escolha, dois machos grandes ($\chi^2 = 0,03$; $P = 0,8638$), dois machos pequenos ($\chi^2 = 0,03$; $P = 0,8638$) como na situação com chance parcial de escolha, 1 macho grande e 1 macho pequeno ($\chi^2 = 0,04$; $P = 0,5150$).

Quando na situação sem chance de escolha, o tamanho do macho não influenciou a duração de cópula tanto na primeira ($t_{25,3} = 0,29$; $P = 0,7746$) quanto na segunda cópula ($t_{15,5} = 1,34$; $P = 0,1993$) (Fig. 1B). Também, para fêmeas em chance parcial de escolha, a duração da primeira cópula não foi influenciada pelo tamanho do macho ($t_{18,9} = -1,39$; $P = 0,1812$), porém a duração da segunda cópula foi maior para machos pequenos comparado a machos grandes ($t_{15} = -2,24$; $P = 0,0406$) (Fig. 1C). Em cópulas sucessivas com a primeira e segunda fêmea virgem, o tamanho do macho não influenciou a duração da primeira ($F_{1,25} = 2,08$; $P = 0,1618$) e da segunda cópula ($F_{1,25} = 1,25$; $P = 0,2745$) (Fig. 1D). Entretanto, independente do tamanho do macho (i.e., não houve diferença entre classes de tamanho de macho na duração da primeira e segunda cópula) foi observado que machos de *P. nigrispinus* apresentaram maior investimento de tempo na primeira cópula realizada na situação sem chance de escolha ($F_{1,61} = 15,3$; $P = 0,0002$), na situação com chance parcial de escolha ($F_{1,52} = 2,92$; $P = 0,0427$) e, em cópulas sucessivas ($F_{1,50} = 54,19$; $P < 0,0001$) (Fig. 2).

Tanto para a primeira quanto para a segunda fêmea virgem, o tamanho do macho não afetou o sucesso reprodutivo. As características reprodutivas da primeira fêmea de *P. nigrispinus* realizando as duas cópulas ($n = 46$ fêmeas) aos 4 e 19 dias de idade não foram afetadas pelas classes de tamanhos dos machos utilizados. A longevidade das fêmeas variou, em média, de 45,7 a 51,9 dias ($F_{2,43} = 0,40$; $P = 0,6700$); o número de ovos produzidos de 397,8 a 448,5 ($F_{2,43} = 0,30$; $P = 0,7457$); e o número de ninfas de 301,8 a 351,1 ($F_{2,43} = 0,39$; $P = 0,6780$).

A realização da segunda cópula do macho foi, em média, de 44,4 a 58,2 minutos após o término da primeira cópula e não variou entre tamanhos de machos ($F_{1,25} = 0,04$; $P = 0,8355$). Apesar deste pouco espaço de tempo observado entre cópulas para ambos os tamanhos de machos, o sucesso reprodutivo das fêmeas também não foi alterado. Em média, a longevidade das fêmeas foi de 35,0 a 43,9 ($F_{1,25} = 1,94$; $P = 0,1760$); produção de ovos de 264,2 a 308,8 ($F_{1,25} =$

0,68; $P = 0,4162$); e produção de ninfas de 197,8 a 221,5 ($F_{1, 25} = 0,33$; $P = 0,5715$), para ambos os tamanhos de machos.

Risco de predação e comportamento de cópula. A presença de vespas não inibiu o início da cópula para os casais que foram expostos ao risco de predação, antes de iniciarem o acasalamento ($n = 37$) comparado aqueles sem risco ($n = 29$) ($\chi^2 = 0,4866$; $P = 0,4854$). Da mesma forma, a duração de cópula foi semelhante nas diferentes situações avaliadas, com risco e sem risco de predação ($F_{2, 103} = 0,31$; $P = 0,7362$), variando, em média, de 451,9 a 465,6 minutos.

Tempo de cópula. O tempo natural de cópula observado neste experimento variou de 338 a 671 minutos. A interrupção da cópula nos tempos de 30, 60, 120 e 240 minutos influenciou o período de pré-oviposição (Fig. 3 - superior), número de ovos e número de ninfas produzidas (Fig. 3 - inferior). Entretanto, a duração de cópula não teve efeito sobre a longevidade das fêmeas ($F_{4, 62} = 1,06$; $P = 0,3862$).

Discussão

O caráter peso foi adequado para inferir sobre o tamanho do macho de *P. nigrispinus*, uma vez que houve correlação consistente entre tamanho e peso dos machos ao longo dos dois experimentos com chance múltipla e parcial de escolha (i.e., mais de 170 machos). Contudo, o tamanho do macho não afetou a escolha da fêmea. Entre machos de diferentes categorias de peso, a escolha da fêmea para cópula foi similar para as fêmeas que possuíam maior ou menor chance de escolha. A tendência à não-preferência por uma categoria de peso do macho foi confirmada por escolhas semelhantes para a segunda cópula entre as fêmeas de *P. nigrispinus*. Também, foi observado que a primeira escolha não determina a escolha para a segunda cópula, uma vez que a fêmea não exibiu preferência de parceiro e categoria de peso de parceiro para o reacasalamento. A baixa preferência de parceiro por fêmeas de *P. nigrispinus* foi representada com maior evidência

durante a situação sem escolha entre machos de mesmo tamanho. Então, nesta situação, a fêmea poderia ter realizado igual escolha de macho para a segunda cópula confirmando a preferência, pois tanto na primeira quanto na segunda cópula, a fêmea tinha disponível macho de mesmo tamanho. O comportamento de não-preferência de parceiro concorda com Thornhill & Alcock (1983). Segundo estes autores, cópulas com diferentes machos podem resultar em ganho genético para a fêmea, por permitir a heterogeneidade dos descendentes. Adicionalmente, a ocorrência de múltiplas cópulas com diferentes machos pode representar uma resposta à seleção para manutenção do suprimento de esperma (McLain 1992). Esta condição pode ser observada em acasalamentos onde machos diferem na quantidade ou viabilidade de espermatozoides transferidos (McLain & Marsh 1990).

Os resultados obtidos indicam que *P. nigrispinus* possui diferente estratégia de acasalamento em função do tamanho e status prévio de acasalamento de machos, quando comparados a outras espécies de insetos. O tamanho do macho é um dos traços mais favorecidos e relatados com o sucesso de paternidade em insetos (Andersson 1994). Estudos de escolha da fêmea pelo parceiro mostram correlação positiva entre cópulas com machos grandes e aumento na fecundidade e fertilidade (Tadler *et al.* 1999). Segundo Cordero (1995) a qualidade do genótipo e fenótipo de machos grandes pode beneficiar as fêmeas. Esta qualidade está relacionada com a capacidade de machos em transferir compostos nutritivos utilizados pelas fêmeas na vitelogênese ou na manutenção de processos vitais (Koshiyama *et al.* 1996, McLain 1998). Para McLain *et al.* (1990), a seleção para cópula poderia favorecer fêmeas a exercer preferência por machos grandes, quando eles transferem grande quantidade de esperma e são menos adequados a transmitir patógenos. Estes comportamentos, entretanto, não foram observados para o percevejo predador *P. nigrispinus*. Os machos de *P. nigrispinus* independente do tamanho e status de acasalamento não sofreram preferência das fêmeas para acasalamento. A ausência de efeito do tamanho do macho e

estados de acasalamento no sucesso reprodutivo corroboram com a não seleção de parceiro pela fêmea baseando nestes parâmetros. Além disso, mantêm a capacidade de promover à fêmea semelhante resposta reprodutiva, criando alternativas para os paradigmas do comportamento reprodutivo de insetos. Entretanto, uma melhor interpretação desses resultados será obtida pela análise da qualidade dos espermatozoides transferidos às fêmeas entre tamanho e status de acasalamento dos machos, bem como a qualidade dos descendentes produzidos (e.x., tamanho e viabilidade ninfal).

Em relação à duração de cópula, machos pequenos e grandes apresentaram semelhante investimento, tanto na primeira cópula como no reacasamento, com exceção para machos pequenos em chance parcial de escolha. Estes machos apresentaram maior investimento na segunda cópula quando comparado a machos grandes. A diferença no investimento pode estar relacionada à maior produção de ovos por algumas fêmeas antes do reacasamento e, conseqüentemente, utilização do estoque de espermatozoides, liberando espaço na espermateca para o preenchimento. Isto pode ser verdadeiro, pois no segundo reacasamento, o tempo de cópula foi menor para ambos os tamanhos de machos. Pelos resultados obtidos, o tempo de cópula de *P. nigrispinus* está relacionado à transferência de material seminal para as fêmeas (Fig. 3), e não a guarda da fêmea. Após o período de 15 dias ou produção de 200 ovos, o intervalo entre posturas aumenta e a viabilidade de ovos diminui, indicando necessidade de reacasamento (Torres & Zanuncio 2001). No entanto, a presença de espermatozoides remanescentes na espermateca da fêmea é indicada pela produção de ninfas após 15 dias da primeira cópula. Portanto, a presença de espermatozoides remanescentes na espermateca por ocasião do reacasamento, ou seja, segunda escolha da fêmea pode ter resultado em menor duração de cópula, assim, o macho de *P. nigrispinus* necessitaria de menor período de transferência de material seminal para completo preenchimento da espermateca.

O comportamento de cópula sucessiva em *P. nigrispinus* não impede ou minimiza o reacasamento de machos. Pelas observações de escolha de cópula, as fêmeas submetidas a machos de diferentes status de acasalamento escolheram, de modo semelhante, machos virgens e pré-acasalados, embora o investimento na segunda cópula fosse menor em todas as situações de acasalamento. Em cópulas sucessivas, machos reacasaram passados, em média, 50 minutos da primeira cópula. Apesar deste intervalo entre cópulas, a transferência de espermatozóides viáveis para a fêmea proporcionando o início de produção de ninfas exige tempo, o qual pode ser estimado em torno de 42,5 minutos (Fig. 3 - inferior). Assim, em cópulas sucessivas com fêmeas virgens, duas situações podem estar acontecendo: (i) machos necessitam de menor período de tempo para iniciar a transferência de espermatozóides e (ii) machos podem sofrer redução na produção e transferência de espermatozóides a curto prazo. Por outro lado, o efeito de cópulas sucessivas no sucesso reprodutivo de fêmeas de *P. nigrispinus* segue o mesmo padrão dos resultados encontrados por Torres & Zanuncio (2001). Estes autores não encontraram diferença no sucesso de paternidade do macho após primeira cópula, quando realizaram até cinco cópulas sucessivas. Assim, estes resultados sugerem que foi adequada a transferência de espermatozóides para as fêmeas entre machos virgens e reacasalados, mesmo com menor intervalo de tempo entre cópulas.

A presença de vespas no ambiente não impediu o início do acasalamento, nem a duração do período de cópula em *P. nigrispinus*. Então, para obtenção do sucesso de cópula, os insetos podem se submeter a risco de vida pela predação, mas não alteram o comportamento de iniciar e manter a cópula. De outra forma, a maximização de sinais aposemáticos em cópula, como emissão de feromônio de alarme por percevejos (Gamberale & Tullberg 1996), a coloração esverdeada a pálea escura reduzindo o contraste com o ambiente, bem como a sua localização na planta podem ajudar na defesa contra predação o que merece estudos em campo.

Pelos resultados podemos concluir que fêmeas de *P. nigrispinus* acasalam independente do tamanho do macho e do status de acasalamento desses, além de não apresentar preferência de parceiro. A duração da cópula não sofre influência do tamanho do macho. O investimento de tempo por machos que acasalam com fêmeas virgens parece ser maior que nos reacasalamentos. O tamanho do macho não correlacionou com o número de ovos e ninfas, longevidade e duração de cópula, embora essa característica possua efeito significativo para as fêmeas (Zanuncio *et al.* 1992). Além disso, a necessidade de longos períodos de cópula não é afetada pelo risco de predação, o qual não inibe o início da cópula, bem como a sua duração. Assim, a hipótese de que machos maiores passariam benefícios às fêmeas de *Podisus* e, assim, por realizarem múltiplas cópulas poderiam selecionar o parceiro pelo seu tamanho não procede. Da mesma forma, a realização das múltiplas cópulas não indica que os machos guardem as fêmeas do reacasalamento, mas sim requerem este tempo para a transferência de material seminal em quantidade apropriada às fêmeas.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão de bolsa ao primeiro autor. A Robério C. Neves e Roberta L. dos Santos do Laboratório de Controle Biológico da UFRPE, pelo fornecimento de presas utilizadas na criação dos predadores.

Literatura Citada

Andersson, M. 1994. Sexual selection. Princeton, Princeton University Press, 599p.

Andersson, M. & Y. Iwasa. 1996. Sexual selection. Trends Ecol. Evol. 11: 53-58.

- Arnqvist, G. & I. Danielsson. 1999.** Postmating sexual selection: the effects of male body size and recovery period on paternity and egg production rate in a water strider. *Behav. Ecol.* 10: 358-365.
- Arnqvist, G. 1989.** Multiple mating in a water strider: mutual benefits or intersexual conflict? *Anim. Behav.* 38: 749-756.
- Carvalho, R.D.S., E.F. Vilela, M. Borges & J.C. Zanuncio. 1994.** Ritmo do comportamento de acasalamento e atividade sexual de *Podisus connexivus* Bergroth (Heteroptera: Pentatomidae: Asopinae). *An. Soc. Entomol. Bras.* 23: 197-202.
- Berrigan, D. & S.H. Locke. 1991.** Body size and male reproductive performance in the flesh fly, *Neobellieria bullata*. *J. Insect Physiol.* 37: 575-581.
- Chapman, T., L.F. Liddle, J.M. Kalb, M.F. Wolfner & L. Partridge. 1995.** Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females is mediated by male accessory gland products. *Nature* 373: 241-244.
- Cordero, C. 1995.** Ejaculate substances that affect female insect reproductive physiology and behavior: honest or arbitrary traits? *J. Theor. Biol.* 174: 453-461.
- Crudgington, H.S. & M.T. Siva-Jothy. 2000.** Genital damage, kicking and early death. *Nature* 407: 855-856.
- De Clercq, P. & D. Degheele. 1997.** Effects of mating status on body weight, oviposition, egg load, and predation in the predatory stinkbug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90: 121-127.
- Edvardsson, M. & D. Canal. 2006.** The effects of copulation duration in the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Behav. Ecol.* 17: 430-434.
- Edvardsson, M. & G. Arnqvist. 2000.** Copulatory courtship and cryptic female choice in red flour beetles *Tribolium castaneum*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267: 559-563.

- Gamberale, G. & B.S. Tullberg. 1996.** Evidence for a more effective signal in aggregated aposematic prey. *Anim. Behav.* 52: 597-601.
- Harano, T., Y. Yasui & T. Miyatake. 2006.** Direct effects of polyandry on female fitness in *Callosobruchus chinensis*. *Anim. Behav.* 71: 539-548.
- Herndon, L.A. & M.F. Wolfner. 1995.** A *Drosophila* seminal fluid protein, Acp26Aa, stimulates egg laying in females for 1 day after mating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10114-10118.
- Koshiyama, Y., H. Tsumuki, K. Fujisaki, & F. Nakasuji. 1996.** Nutritional contribution to females of ¹⁴C-labeled male secretions transferred during mating in *Menida scotti* (Heteroptera: Pentatomidae). *Res. Popul. Ecol.* 38: 51-56.
- McLain, D.K. & N.B. Marsh. 1990.** Male copulatory success: heritability and relationship to mate fecundity in the southern green stinkbug, *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Heredity* 60: 161-167.
- McLain, D.K. 1998.** Non-genetics benefits of mate choice: fecundity enhancement and sexy sons. *Anim. Behav.* 55: 1191-1201.
- McLain, D.K., D.L. Lanier & N.B. Marsh. 1990.** Effects of female size, mate size, and number of copulations on fecundity, fertility, and longevity of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83: 1130-1136.
- McLain, D.K. 1992.** Preference for polyandry in female stink bugs, *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *J. Insect Behav.* 5: 403-410.
- Osanai, M. & P.S. Chen. 1993.** A comparative study on the arginine degradation cascade for sperm maturation of *Bombyx mori* and *Drosophila melanogaster*. *Amino Acids* 5: 341-350.
- Parker, G.A. & L.W. Simmons. 1994.** Evolution of phenotypic optima and copula duration in dungflies. *Nature* 370: 53-56.
- Reynolds, J.D. 1996.** Animal breeding systems. *Trends Ecol. Evol.* 11: 68-72.

- Ridley, M. 1990.** The control and frequency of mating in insects. *Funct. Ecol.* 4: 75-84.
- Rolff, J. & M.T. Siva-Jothy. 2002.** Copulation corrupts immunity: a mechanism for a cost of mating in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9916-9918.
- SAS Institute. 2001.** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Sousa-Souto, L., W.S. Evangelista Jr., E.R. Lima, J.C. Zanuncio & M.G. Fonseca. 2006.** Sperm depletion: a cost for single mated females of *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae). *Braz. Arch. Biol. Tech.* 49: 923-926.
- Tadler, A., H.L. Nemeschkal & G. Pass. 1999.** Selection of male traits during and after copulation in the seedbug *Lygaeus simulans* (Heteroptera, Lygaeidae). *Biol. J. Linn. Soc.* 68: 471-483.
- Thornhill, R. & J. Alcock. 1983.** The evolution of insect mating systems. Cambridge, Harvard University Press, 547p.
- Torres, J.B. & J.C. Zanuncio. 2001.** Effects of sequential mating by males on reproductive output of the stinkbug predator, *Podisus nigrispinus*. *BioControl* 46: 469-480.
- Torres, J.B., J.C. Zanuncio & M.A. Moura. 2006.** The predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*: biology, ecology and augmentative releases for lepidoperan larval control in *Eucalyptus* in Brazil. *Persp. Agric. Vet. Sci.* 15: 1-16.
- Torres, J.B., J.C. Zanuncio & M.C. Oliveira. 1997.** Mating frequency and its effect on female reproductive output in the stinkbug predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent* 62: 491-498.
- Tram, U. & M.F. Wolfner. 1999.** Male seminal fluid proteins are essential for sperm storage in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 153:837-844.

Tregenza, T. & N. Wedell. 2002. Polyandrous females avoid cost of inbreeding. *Nature* 415: 71-73.

Zanuncio, J.C., M.A.L. Bragança, J.L.S. Diaz & R.C. Sartório. 1992. Avaliação dos parâmetros de fecundidade de *Podisus connexivus* (Hemiptera: Pentatomidae) de diferentes pesos. *Rev. Ceres* 39: 591-596.

Zeh, J.A. & D.W. Zeh. 1996. The evolution of polyandry I: Intragenomic conflict and genetic and genetic incompatibility. *Proc. R. Soc. Lond. B* 263: 1711-1717.

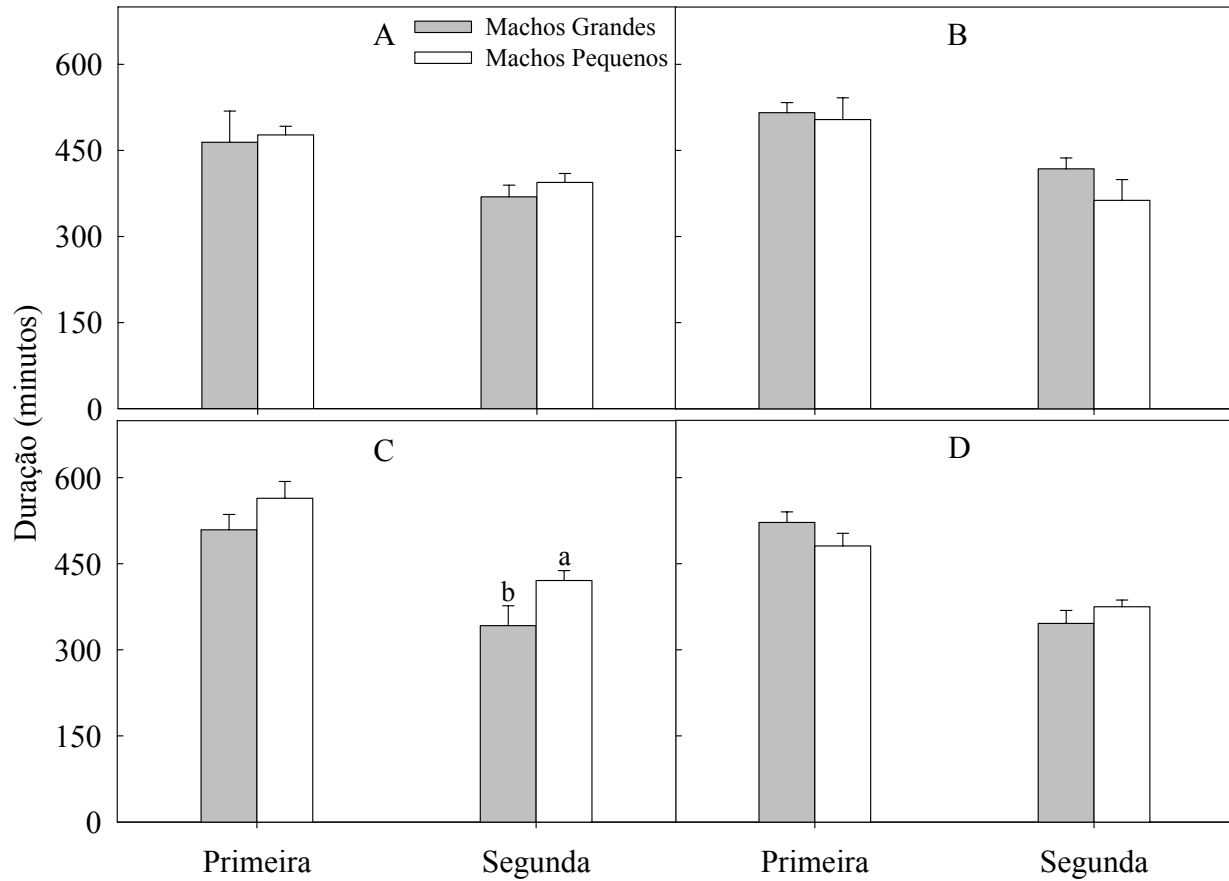


Figura 1. Duração média de cópula (+EP) para fêmeas de *Podisus nigrispinus* acasalando com machos de diferentes classes de peso, quando com chance de múltipla escolha (A), sem chance de escolha (B), com chance parcial de escolha (C) e em cópulas sucessivas (D). Barras sem letras, não diferem entre si, e barras com letras diferem pelo teste t ao nível de 5% de probabilidade.

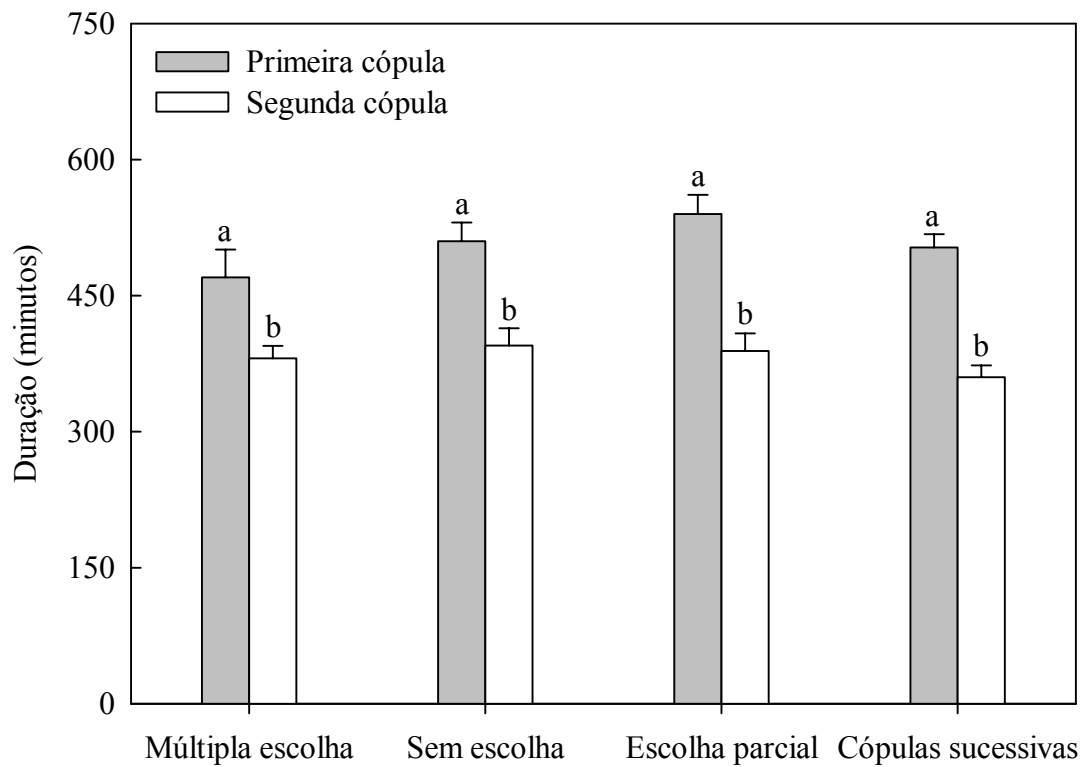


Figura 2. Duração média da primeira e segunda cópula (+EP) de fêmeas de *Podisus nigrispinus* sob diferentes possibilidades de escolha do parceiro independente do tamanho do macho. Barras sob diferentes letras diferem estatisticamente pelo teste t ($P < 0,05$).

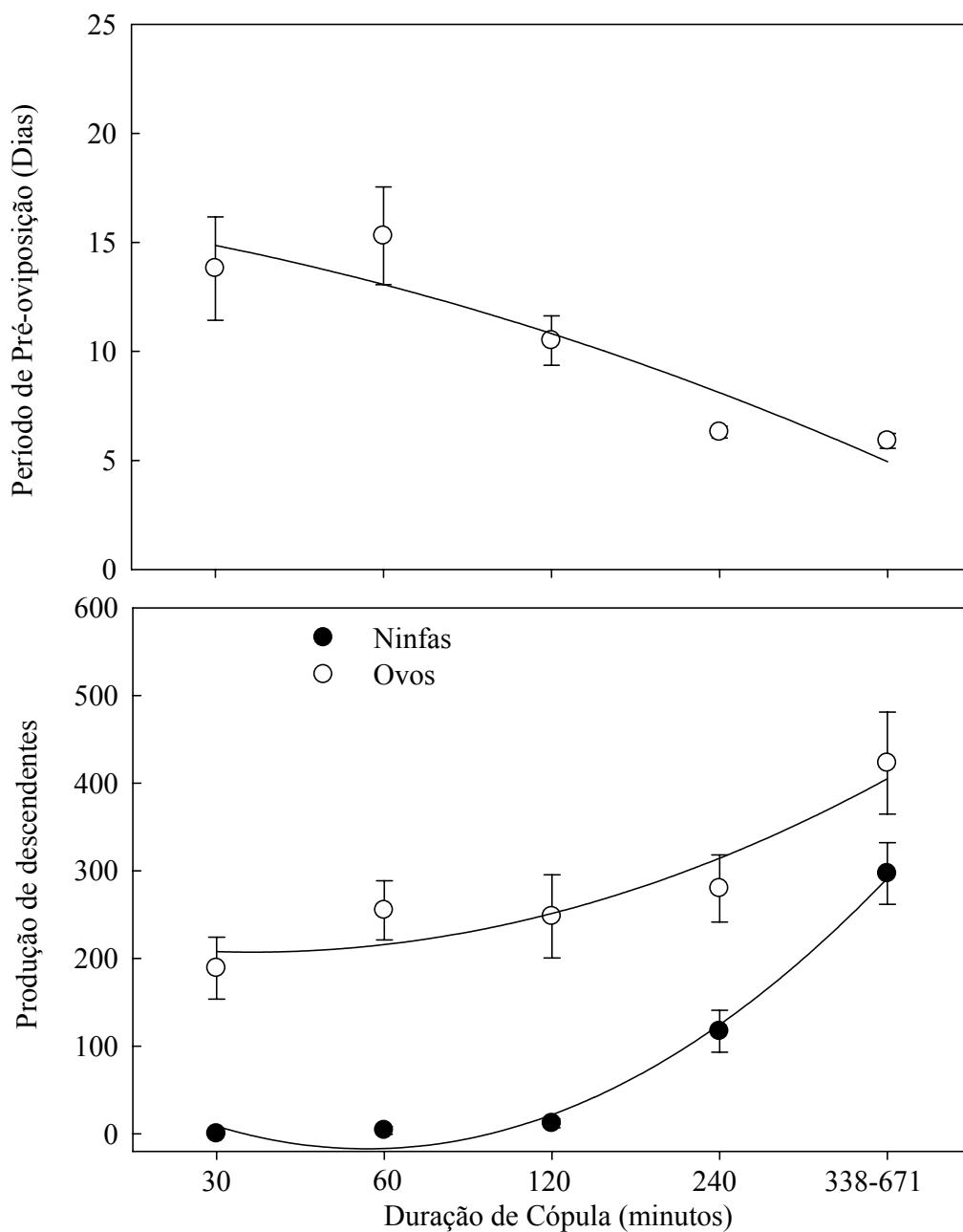


Figura 3. Efeito da duração da cópula mediante a sua interrupção no período de pré-oviposição (Superior: $\hat{y} = 17,05065 - 0,06390x + 0,00008590x^2$, $F = 13,12$, $P = 0,0708$, $R^2 = 0,92$) e, no número de ovos (Inferior: $\hat{y} = 17,05 - 0,064x + 0,000086x^2$, $F = 36,31$, $P = 0,0092$, $R^2 = 0,92$) e, de ninfas (Inferior: $\hat{y} = 17,87 - 0,679x + 0,0064x^2 + 0,0000079x^3$, $F = 390,32$, $P = 0,0372$, $R^2 = 0,99$) produzidas por fêmeas de *Podisus nigrispinus*.

CAPÍTULO 3

ESPERMATOGÊNESE E SUCESSO REPRODUTIVO EM *Podisus nigrispinus* (DALLAS) (HEM.: PENTATOMIDAE)

AGNA R.S. RODRIGUES¹, JOSÉ E. SERRÃO², VALÉRIA W. TEIXEIRA³ E JORGE B. TORRES¹

¹Departamento de Agronomia/Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av.
Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos 52171-900 Recife, PE.

²Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000 Viçosa, MG.

³Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos 52171-900 Recife, PE.

Rodrigues, A.R.S., J.E. Serrão, V.Wanderley-Teixeira & J.B. Torres. Espermatogênese e sucesso reprodutivo em *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hem.: Pentatomidae). A ser submetido.

RESUMO - O macho do percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hem.: Pentatomidae) realiza múltiplas e longas cópulas. Portanto, neste estudo foi investigada a hipótese de que este comportamento está relacionado à produção e transferência de espermatozóides às fêmeas. Assim, o presente estudo teve como objetivos investigar a produção de espermatozóides em *P. nigrispinus* sob diferentes status de acasalamento; observar a transferência e localização dos espermatozóides no ducto deferente; descrever a espermateca e estruturas associadas quanto à morfologia interna e modificações ocorridas durante a cópula; e avaliar a duração da cópula como fator determinante do sucesso de inseminação de fêmeas de *P. nigrispinus*. A análise histológica do ducto deferente mostrou a presença de espermatozóides no seu lúmen independente do status de acasalamento (machos virgens, 0h, 12 ou 24h após término da cópula). Estes resultados mostram que machos de *P. nigrispinus* possuem espermatogênese contínua e que o ducto deferente serve como local de armazenamento de espermatozóides. Em fêmeas, o volume da espermateca não sofre alteração com o aumento da duração do período de cópula. Contudo, ocorre mudança de formato do ducto elástico da espermateca a partir de 30 minutos do início da cópula. Assim, múltiplas cópulas são requeridas tanto para suprir a necessidade de espermatozóides maximizando o sucesso reprodutivo, como de substâncias acessórias transferidas pelos machos durante a cópula. Da mesma forma, que a realização de longas cópulas indica que os machos apresentam dependência temporal para a transferência de material seminal em quantidade apropriada às fêmeas.

PALAVRAS-CHAVE: Histologia, predador, espermateca, acasalamento, reprodução

SPERMATOGENESIS AND REPRODUCTIVE SUCCESS IN *Podisus nigrispinus* (DALLAS)
(HEM.: PENTATOMIDAE)

ABSTRACT – Males of the predatory stinkbug, *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hem.: Pentatomidae), accomplish long and multiple matings and we hypothesize in this study that this behavior is engaged due to spermatozoa production and transference to the females. Thus, this work investigated the effect of mating status of males on spermatozoa transference; the location of spermatozoa in the male reproductive system during mating, morphological alterations on female spermatheca and associated structures during a copula; and the duration of mating on spermatozoa transference to the females according to the mating status of the males. The analyses of male reproductive system showed presence of spermatozoa in the vas deferent independent of the mating status (ca. unmated, 0, 12 and 24h after a mating) indicating a continuous spermatogenesis and absence of seminal vesicle. The female spermatheca has not changes associated to the duration of mating. However, the spermathecal duct is already expanded at 30 min of mating duration. However, the success of males in filling the female spermatheca with spermatozoa depends on duration of mating. Thus, the results indicate that multiple mating is a requirement for reproduction success in the species by transference of spermatozoa and accessory substances stored in the spermathecal duct. Likewise, the long mating is a male requirement to transfer materials in appropriate amount to the female.

KEY WORDS: Histology, predatory, spermatheca, mating, reproduction

Introdução

A cópula exerce importante papel no sucesso de inseminação de fêmeas (Chapman 1998). E, apesar da transferência de espermatozóides ocorrer logo após o início da cópula, alguns insetos apresentam comportamento de cópula prolongada (García-González & Gomendio 2004). Há três hipóteses principais que tentam explicar o comportamento de longas cópulas: (i) escolha críptica da fêmea (Eberhard 1994); (ii) comportamento de guarda da fêmea (Harari *et al.* 2003); e (iii) transferência/armazenamento de espermatozóides (Dickinson 1986). A primeira hipótese faz referência à capacidade da fêmea em distinguir a qualidade do parceiro no período de pós-cópula (Eberhard 1994). Já a segunda retrata o comportamento do macho em garantir que os ovos produzidos pelas fêmeas sejam fertilizados pelos seus espermatozóides (Alcock 1994). E, para a terceira hipótese, o prolongamento da cópula é citado como fator determinante na quantidade de espermatozóides transferidos, aumentando a capacidade de competição espermática (Dickinson 1986). Durante a cópula, os machos podem transferir além de espermatozóides, substâncias acessórias utilizadas pelas fêmeas nos processos de vitelogênese (Koshiyama *et al.* 1996), de oviposição (Herndon & Wolfner 1995), de ativação dos espermatozóides (Osanai & Chen 1993) e na manutenção da viabilidade dos espermatozóides durante o estoque na espermateca e que garantem o seu uso (Tram & Wolfner 1999). Por outro lado, tais substâncias podem retardar futuras cópulas através da alteração na produção de feromônio sexual (Kingan *et al.* 1995) e emissão de compostos antiafrodisiacos (Andersson *et al.* 2000).

Fêmeas do percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hem.: Pentatomidae) realizam múltiplas e longas cópulas. As múltiplas cópulas fornecem espermatozóides para a manutenção da fertilidade das fêmeas, embora as fêmeas possuam espermateca, estrutura responsável pelo armazenamento de esperma (Soares 2006). Fêmeas de *P. nigrispinus* preenchem completamente a sua espermateca durante a cópula (Soares 2006). Entretanto, após o período de 15 dias ou

produção de 200 ovos, o intervalo entre posturas aumenta e a viabilidade de ovos diminui, indicando necessidade de reacasalamento (Torres & Zanuncio 2001). Legaspi *et al.* (1994) dissecaram fêmeas de *Podisus maculiventris* (Say) (Hem.: Pentatomidae), com 24-48h após a cópula e fêmeas virgens. Esses autores observaram que fêmeas virgens possuíam ducto elástico da espermateca delgados e menores quando comparados àquelas oriundos de fêmeas copuladas e de mesma idade, os quais eram maiores e completamente dilatados que denominaram na ocasião como sendo a espermateca. A duração de cópula em *P. nigrispinus* é variável de 3,2 a 13h, sendo que cópulas com duração inferior a 3,2h não foram adequadas para obtenção do sucesso de fertilização (Torres & Zanuncio 2001). E, conseqüentemente, sugere-se que a duração de cópula afeta o período de pré-oviposição, o número de ovos e ninfas produzidas pelas fêmeas de *P. nigrispinus*.

O comportamento de cópula prolongada em *P. nigrispinus* não impede ou minimiza o reacasalamento (A.R.S. Rodrigues, dados não publicados). Em relação ao comportamento de cópula desta espécie, duas hipóteses foram testadas. Longas cópulas são resultantes da necessidade temporal para a inseminação de fêmeas (i) e, machos deste percevejo apresentam produção contínua de espermatozóides (ii). Então, a diminuição tanto do intervalo entre cópulas como da duração do período de cópula em acasalamentos sucessivos seria em resposta à capacidade de transferência de espermatozóides desde o início da segunda cópula. Isto porque o sucesso de fertilização nessa espécie é tempo-dependente (Capítulo 2). Dessa forma, o presente estudo teve quatro objetivos principais: investigar a produção de espermatozóides em *P. nigrispinus* sob diferentes status de acasalamento (machos virgens, 0h, 12 ou 24h após término da cópula) (i); observar a capacidade de transferência de espermatozóides para as fêmeas e a localização destes no ducto deferente sob diferentes status de acasalamento (ii); descrever a espermateca e estruturas relacionadas quanto à morfologia interna e modificações ocorridas

durante a cópula (iii); e avaliar a duração da cópula como fator determinante do sucesso de inseminação de fêmeas de *P. nigrispinus* (iv).

Material e Métodos

Adultos machos e fêmeas de *P. nigrispinus* utilizados nos experimentos foram obtidos da criação do Laboratório de Controle Biológico do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, mantida de acordo com a metodologia descrita por Torres *et al.* (2006), a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e 12h de fotofase e conduzidos para o laboratório de realização dos experimentos. Como alimento para o predador foi oferecido pupas de *Tenebrio molitor* L. (Col.: Tenebrionidae) em abundância durante toda a fase ninfal. Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Biologia Molecular e Celular, Citogenética e Histologia Reprodutiva do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG.

Tempo de cópula, espermatogênese e histologia do ducto elástico e espermateca. Neste estudo, foram utilizados adultos virgens com quatro dias de idade, considerando que tanto machos quanto fêmeas são receptivos a cópula a partir dos três dias de idade adulta (Carvalho *et al.* 1994). Os insetos foram liberados na proporção de 1:1 (fêmea e macho) em potes plásticos transparente de 1L permitindo livre escolha de parceiros. Para avaliar a produção e armazenamento de espermatozoides foram analisados cinco machos submetidos às seguintes condições: virgens e 0h, 12h e 24h após o término da cópula.

Variações na dilatação do ducto elástico da espermateca foram avaliadas em função da condição de acasalamento ou não (fêmeas virgens ou após 0h, 24h e 72h do término da cópula). A capacidade de transferência de espermatozoides para as fêmeas pelos machos de *P. nigrispinus* foi determinada interrompendo a cópula em diferentes intervalos de tempo. Após iniciarem a cópula,

os casais foram isolados e distribuídos aleatoriamente para compor os diferentes tempos de interrupção da cópula: fêmeas com cópula interrompida aos 30, 60, 120, 240 minutos e comparadas a fêmeas virgens e, fêmeas com duração natural de cópula sem interrupção. A interrupção da cópula procedeu pela separação dos indivíduos através de pressão feita com pincel entre eles nos respectivos intervalos pré-estabelecidos.

Os adultos, então, foram dissecados em presença de solução salina (0,1 M NaCl, 0,1 M Na₂HPO₄, 0,1 M KH₂PO₄). Para os machos foram analisados os testículos e ductos deferentes enquanto para as fêmeas foram analisados o ducto espermatecal e espermateca. As amostras foram transferidas para solução fixadora de formalina Millonig-Carson contida em tubo Eppendorf de 1,5 mL e deixadas por 24h.

As imagens a fresco do ducto elástico espermatecal e da espermateca foram obtidas utilizando-se estereomicroscópio Nikon SMZ1500 acoplado a uma câmara de vídeo, e a captura das imagens foi feita pelo programa Helicon Focus, versão 4.10 (Helicon Soft Ltda).

Para a análise histológica, as amostras foram desidratadas em série alcoólicas crescentes de 70%, 80%, 90% e 95% por cinco minutos cada. Após a desidratação, as amostras foram mantidas em tubo Eppendorf e embebidas em historesina Leica por 24h. Então, as amostras foram incluídas em moldes de 400µL contendo a resina ainda líquida e colocadas para polimerização por 24h a temperatura ambiente. Após a polimerização, os blocos de resina com as amostras foram fixados em suportes de madeira e, serialmente seccionados em cortes com 3µm de espessura e coradas com hematoxilina e eosina. Imagens dos cortes foram obtidas utilizando-se microscópio Olympus BX-60 acoplado a uma câmara de vídeo, e as imagens capturadas pelo programa Qcapture para a análise histológica de testículos, ducto deferente, ducto elástico e espermateca.

Para a morfometria interna foram analisadas três espermatecas e três ductos elásticos em cada tratamento. De cada espermateca e ducto foram analisadas 10 amostras (cortes). O intervalo

entre cortes na estrutura analisada foi determinado pela razão entre o número de cortes obtidos para cada estrutura pelo número de amostras. A área da espermateca e ducto elástico foi medida com auxílio do programa Image Pro Plus, versão 4.5 (Media Cybernetics). O volume da espermateca e do ducto foi obtido pela fórmula $V = A \times E \times N$, onde A = média da área do lúmen, E = espessura do corte e N = número total de cortes obtidos (Coggeshall 1992).

Os dados do volume da espermateca e ducto elástico foram analisados através de análise de variância (Proc ANOVA do SAS) após serem submetidos aos testes de Kolmogorov e Bartlett para normalidade e homogeneidade de variância, respectivamente. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa SAS Version 8.02 (SAS Institute 1999-2001).

Resultados

A produção de espermatozóides em machos de *P. nigrispinus* é contínua e ocorre antes e ao longo da cópula. Em machos virgens e nos diferentes status de acasalamento foram observadas todas as etapas do processo de espermatogênese nos folículos testiculares (Fig. 1A), espermatócitos em divisão celular (Fig. 1B), diferenciação de espermátides em espermatozóides (Fig. 1C) e feixes de espermatozóides (Fig. 1D). Também, foi verificado que machos virgens, e com 0, 12 e 24h após o término da cópula apresentavam espermatozóides ao longo do ducto deferente (Fig. 1E).

A espermateca de *P. nigrispinus* é um reservatório globoso de coloração amarela a fresco, com um ducto que se mostra mais volumoso do que este reservatório (Fig. 2A) O lúmen da espermateca de fêmeas virgens é preenchido com substância homogênea de natureza básica e é delimitado por uma espessa íntima (Fig. 3A). O epitélio da espermateca é formado por duas camadas de células, sendo a camada interna formada por células achatadas e a externa formada por células colunares com núcleo bem desenvolvido (Fig. 3B). A camada celular interna é

responsável pela formação da íntima. Nas células colunares da espermateca de fêmeas virgens foram observados pequenos grânulos citoplasmáticos com conteúdo acidófilo, uma vez que apresentaram afinidade pela eosina (Fig. 3A). Com o início da cópula, observou-se a formação de grânulos maiores, com conseqüente acúmulo destes na região apical da célula (Fig. 3B). Entre o ducto elástico e a espermateca observa-se uma área de transição com células cúbicas no ducto passando para células colunares na espermateca (Fig. 3C). Nesta transição da espermateca para o ducto há uma dobra do epitélio formando uma válvula (Fig. 3D).

O ducto da espermateca é elástico e saculiforme permitindo a passagem dos espermatozóides para a espermateca (Fig. 2A). Fêmeas virgens possuem ducto alongado revestido por epitélio simples colunar o qual se projeta para a luz do órgão formando dobras (Fig. 3E). Durante a cópula, a parede do ducto se expande (Fig. 3F) e o ducto passa a apresentar formato esférico (Fig. 2B). Após 24h do término da cópula, o ducto da espermateca ainda apresentou formato esférico (Fig. 2C). Entretanto, com 72h do término da cópula, o ducto passou a apresentar formato alongado similar ao padrão observado em fêmeas virgens (Fig. 2D). O ducto da espermateca se comunica com o oviduto comum por um prolongamento que não se expande (Fig. 2A). A lâmina epitelial do ducto é constituída por epitélio simples colunar e pavimentoso com íntima, separado por uma projeção formando uma válvula caracterizando, assim, uma região de transição (Fig. 4A). As células achatadas formam o canal do ducto. Durante a cópula ocorre acúmulo de substância na luz do ducto (Fig. 3F).

A análise morfométrica revelou que o status de acasalamento das fêmeas (virgem ou acasalada), bem como os diferentes intervalos de interrupção da cópula não modificaram o volume da espermateca que variou, em média, de $11,89 \times 10^5$ a $18,20 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ ($F_{5, 14} = 2,05$; $P = 0,1327$). Não foi possível realizar a análise morfométrica do ducto das fêmeas virgens devido às dobras da parede do ducto. Também, foi observado que não houve influência dos intervalos de

interrupção da cópula (a partir de 30 minutos) no volume do ducto que, em média, foram de $279,74 \times 10^5$ a $446,73 \times 10^5 \mu\text{m}^3$ ($F_{4,12} = 1,37$; $P = 0,3024$).

Em relação à transferência de espermatozóides, as espermatecas de fêmeas com cópula interrompida aos 30, 60 e 120 minutos não apresentaram espermatozóides no seu interior (Fig. 4B). A transferência de espermatozóides somente foi observada a partir de 240 minutos de cópula, porém verificou-se que a espermateca não estava completamente preenchida (Fig. 4C). No entanto, fêmeas que tiveram duração de cópula sem interrupção apresentaram espermatecas completamente preenchidas com espermatozóides (Fig. 4D).

Discussão

A ausência da vesícula seminal em *P. nigrispinus* é compensada pelos ductos deferentes, que armazenam espermatozóides, independente do status de acasalamento. Em insetos, a vesícula seminal é geralmente uma dilatação do ducto deferente e funciona como estrutura para armazenamento e manutenção dos espermatozóides (Chapman 1998). Entretanto, as observações deste estudo mostram que a produção de espermatozóides por machos de *P. nigrispinus* é contínua e, por isto, permite a realização de sucessivas cópulas, apesar da ausência de uma vesícula seminal. Isto confirma estudos anteriores que não encontraram diferenças no sucesso do reprodutivo do macho desta espécie em até cinco cópulas sucessivas (Torres & Zanuncio 2001). Já a presença de espermatozóides no ducto deferente imediatamente após o término da cópula (0h) e, em períodos, de 12 ou 24h do término da cópula mostra que machos têm produção de espermatozóides para a sua imediata utilização. Em geral, o número de espermatozóides produzidos e transferidos na cópula excede o que as fêmeas necessitam para fertilizar seus ovócitos ou a capacidade de estoque na espermateca (Eady 1995). Esta produção adicional de espermatozóides poderia explicar a ocorrência de cópulas sucessivas nesta espécie, uma vez que

machos de *P. nigrispinus* podem realizar múltiplas cópulas (Torres & Zanuncio 2001). Também, a localização dos espermatozóides no ducto deferente após a cópula poderia reduzir o tempo necessário para a sua transferência para a fêmea quando do reacasamento. Contudo, foi observado que machos de *P. nigrispinus*, independente do status de cópula (virgem ou pré-acasalado), apresentaram espermatozóides no ducto deferente.

Para os diferentes intervalos de interrupção de cópula e status de acasalamento das fêmeas (virgem e acasalada) foi observado que não houve mudança no volume do lúmen da espermateca. Em *Lygaeus simulans* Deckert (Hem.: Lygaeidae) a presença de íntima faz com que o lúmen do receptáculo seminal não possa ser expandido (Gschwentner & Tadler 2000). Legaspi *et al.* (1994) observaram que fêmeas virgens de *P. maculiventris* possuíam o ducto elástico, que na ocasião denominaram de espermateca, delgados e menores quando comparadas àquelas oriundas de fêmeas copuladas e de mesma idade, os quais eram maiores e completamente dilatados como meio para identificar fêmeas virgens e acasaladas provenientes de campo. Soares (2006) observou que fêmeas de *P. nigrispinus* apresentavam padrão semelhante de modificações na espermateca após o término da produção de ovos férteis e quando acasaladas. Entretanto, este autor relatou a dilatação do ducto que se liga à espermateca, sem fazer referência ao local de armazenamento de espermatozóides. Segundo García-González & Gomendio (2004) existe entre a espermateca e o ducto espermatecal de *Phyllomorpha laciniata* (Vill.) (Hem.: Coreidae) uma estrutura saculiforme com um canal esclerosado. A estrutura citada é a região do ducto da espermateca que tem a capacidade de expansão durante a cópula e que está colabada quando a fêmea é virgem.

Os resultados obtidos demonstram que o sucesso de inseminação de fêmeas de *P. nigrispinus* é dependente da duração do período de cópula. Neste estudo, a inseminação de fêmeas de *P. nigrispinus* foi observada a partir de 4h de cópula. Em outros percevejos, como *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) (Hem.: Lygaeidae), a transferência de espermatozóides ocorre diretamente para

a espermateca e é dependente do tempo. Isto porque o edeago executa uma série de movimentos e rotações antes do início da transferência de material seminal (Bonhag & Wick 1953). Para Tadler (1999) a transferência de espermatozóides em *L. simulans* é precedida pela inserção do edeago dentro do receptáculo seminal da fêmea. Micholitsch *et al.* (2000) estudando o sucesso de inseminação e fertilização em *L. simulans* verificaram que não ocorre inseminação na primeira hora de duração de cópula. Os autores afirmaram que são necessários 30 minutos para que o edeago localize a entrada do ducto da espermateca em contato com o oviduto, e no mínimo 30 minutos para que este penetre no ducto, atravesse a válvula e alcance a espermateca. Assim, a ausência de espermatozóides na espermateca de fêmeas com cópula interrompida aos 30, 60 e 120 minutos pode estar relacionada, como em *L. simulans*, ao posicionamento do edeago dentro da genitália da fêmea de *P. nigrispinus*. Contudo, esta localização do edeago de *P. nigrispinus* dentro da genitália da fêmea necessita estudo comprobatório.

Os resultados obtidos com *P. nigrispinus* mostram ausência de espermatozóides na espermateca até 120 minutos de cópula, embora o ducto da espermateca estivesse dilatado indicando seu preenchimento com substância homogênea desde os 30 minutos de cópula. Isto indica que os machos podem inicialmente transferir os compostos produzidos pelas glândulas acessórias para o ducto e, em seguida, transferir os espermatozóides para a espermateca semelhantemente ao observado para *Menida scotti* (Puton) (Hem.: Pentatomidae) (Koshiyama *et al.* 1996). Machos de *Nezara viridula* L., *Nezara antennata* Scott e *M. scotti* (Hem.: Pentatomidae) transferem para as fêmeas compostos ricos em carboidratos e proteínas, produzidos pelas glândulas acessórias derivadas da ectoderme e/ou bulbo ejaculatório (Kon *et al.* 1993, Koshiyama *et al.* 1993). Para Kon *et al.* (1993) os machos de *Nezara* spp. transferem estes compostos que levam à dilatação observada no ducto da espermateca como obtido para *P. nigrispinus*. Koshiyama *et al.* (1996) observaram que machos de *M. scotti* inicialmente transferem

compostos produzidos pela glândula acessória e, posteriormente, aqueles produzidos pelo bulbo ejaculatório. Fêmeas de *P. nigrispinus* mostraram diminuição na dilatação do ducto após 72h do termino da cópula. Em outros pentatomídeos, como machos de *N. viridula* e *N. antennata*, Kon *et al.* (1993) observaram que a diminuição na dilatação do ducto ocorreu após 120h da cópula. A redução do volume do ducto, segundo Koshiyama *et al.* (1996) está associado à utilização do material transferido para a vitelogênese e, sem apresentar função na manutenção dos espermatozóides.

A presença de duas camadas de células na parede da espermateca de *P. nigrispinus* é semelhante ao encontrado em outros insetos (Bonhag & Wick 1953, Martins & Serrão 2002). O padrão acidófilo observado nos grânulos das células secretoras e lúmen da espermateca de fêmeas virgens permitem considerar que este epitélio é adequado para produzir e secretar substâncias. Para Lay *et al.* (1999), as células da espermateca de *Locusta migratoria migratorioides* (Reiche & Airmaire) (Ort.: Acrididae) produzem e secretam substâncias nesse reservatório. Bonhag & Wick (1953) relataram que em *O. fasciatus*, as células epiteliais da espermateca provavelmente produzem meio adequado para a manutenção dos espermatozóides. Isto porque tais substâncias podem apresentar natureza glicoproteica, sendo utilizadas como fonte de energia, ou mucopolissacarídica, apresentando atividade quimiotática (Happ & Happ 1970, Grodner & Steffens 1978). Dessa forma, os machos de *P. nigrispinus* poderiam transferir compostos que são utilizados na vitelogênese e manutenção de processos vitais, enquanto as fêmeas produziriam substâncias que mantêm viáveis os espermatozóides, semelhante ao observado em outros insetos.

Pelos resultados pode-se concluir que nos machos de *P. nigrispinus* os espermatozóides são continuamente produzidos e ficam dispersos no lúmen do ducto deferente independente do status de acasalamento do macho. Em fêmeas, o volume da espermateca não sofre alteração com o aumento da duração do período de cópula. Contudo, ocorre mudança de formato do ducto da

espermoteca possivelmente devido à transferência de secreção de compostos produzidos pelo macho. Múltiplas cópulas em *P. nigripisnus* são requeridas tanto para suprir a necessidade de espermatozóides maximizando o sucesso reprodutivo, como de substâncias acessórias transferidas pelos machos durante a cópula. Da mesma forma, a realização de longas cópulas indica que os machos apresentam dependência temporal para a transferência de espermatozóides em quantidade apropriada às fêmeas, pois em *P. nigripisnus* o sucesso de fertilização de fêmeas é dependente da duração da cópula (Capítulo 2).

Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa concedida ao primeiro autor e a CAPES através do Programa PROCAD No. 83054. À Carolina Gonçalves dos Santos, Riviane Rodrigues da Hora, Marlene Lucía Aguilar Benavides e Dihego Oliveira Azevedo do Laboratório de Biologia Molecular e Celular da UFV pelo auxílio durante a realização deste estudo; Teresinha Zanuncio por ceder parte do material para o estudo e, em especial, a Álvaro Aguiar Coelho Teixeira (UFRPE) pelo auxílio na formatação e dimensionamento das fotos bem como na discussão dos resultados; à Antônio Carlos Florêncio de Souza (MAPA) pelo ajuda na captura de imagens da espermoteca e ducto elástico espermatecal a fresco.

Literatura Citada

- Alcock, J. 1994.** Postinsemination associations between males and females in insects: the male-guarding hypothesis. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 1-21.
- Andersson, J., A.K. Borg-Karlson & C. Wiklund 2000.** Sexual cooperation and conflict in butterflies: a male-transferred anti-aphrodisiac reduces harassment of recently mated females. *Proc. R. Soc. Biol. Sci. B* 267: 1271-1275.

- Bonhag, P.F. & J.R. Wick. 1953.** The functional anatomy of the male and female reproductive systems of the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Dallas) (Heteroptera: Lygaeidae). J. Morphol. 93: 177-283.
- Carvalho, R.D.S., E.F. Vilela, M. Borges & J.C. Zanuncio. 1994.** Ritmo do comportamento de acasalamento e atividade sexual de *Podisus connexivus* Bergroth (Heteroptera: Pentatomidae: Asopinae). An. Soc. Entomol. Bras. 23: 197-202.
- Chapman, R.F. 1998.** The insects: structure and function. 4th ed., Cambridge, Cambridge University Press, 770p.
- Coggeshall, R.E. 1992.** A consideration of neural counting methods. Trends Neurosci. 15: 9-13.
- Dickinson, J.L. 1986.** Prolonged mating in the milkweed leaf beetle *Labidomera clivicollis clivicollis* (Coleoptera: Chrysomelidae): a test of the “sperm-loading” hypothesis. Behav. Ecol. Sociobiol. 18: 331-338.
- Eady, P.E. 1995.** Why do male *Callosobruchus maculatus* beetles inseminate so many sperm? Behav. Ecol. Sociobiol. 36: 25-32.
- Eberhard, W.G. 1994.** Evidence for widespread courtship during copulation in 131 species of insects and spiders, and implications for cryptic female choice. Evolution 48: 711-733.
- García-González, F. & M. Gomendio. 2004.** Adjustment of copula duration and ejaculate size according to the risk of sperm competition in the golden egg bug (*Phyllomorpha laciniata*). Behav. Ecol. 15: 23-30.
- Grodner, M.L. & W. Steffens. 1978.** Evidence of a chemotactic substance in the spermathecal gland of the boll weevil. Trans. Am. Microsc. Soc. 97: 116-120.
- Gschwentner, R. & A. Tadler. 2000.** Functional anatomy of the spermatheca and its duct in the seed bug *Lygaeus simulans* (Heteroptera: Lygaeidae). Eur. J. Entomol. 97: 305-312.

- Happ, G.M. & C.M. Happ. 1970.** Fine structure and histochemistry of the spermathecal gland in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Tissue Cell* 2: 443-466.
- Harari, A.R., P.J. Landolt, C.W. O'brien & H.J. Brockmann. 2003.** Prolonged mate guarding and sperm competition in the weevil *Diaprepes abbreviatus* (L.) *Behav. Ecol.* 14: 89-96.
- Herndon, L.A. & M.F. Wolfner. 1995.** A Drosophila seminal fluid protein, Acp26Aa, stimulates egg laying in females for 1 day after mating. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 10114-10118.
- Kingan, T., M.B. Wanda, A.K. Raina, J. Shabanowitz & D.F. Hunt. 1995.** The loss of female sex pheromone after mating in the corn earworm moth *Helicoverpa zea*: identification of a male pheromonostatic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 5082-5086.
- Kon, M., A. Oe & H. Numata. 1993.** Intra- and interspecific copulations in the two congeneric green stink bugs, *Nezara antennata* and *N. viridula* (Heteroptera, Pentatomidae), with reference to postcopulatory changes in the spermatheca. *J. Ethol.* 11: 83-89.
- Koshiyama, Y., H. Tsumuki, K. Fujisaki & F. Nakasuji. 1996.** Nutritional contribution to females of ¹⁴C-labeled male secretions transferred during mating in *Menida scotti* (Heteroptera: Pentatomidae). *Res. Popul. Ecol.* 38: 51-56.
- Koshiyama, Y., H. Tsumuki, M. Muraji, K. Fujisaki & F. Nakasuji. 1993.** Transfer of male secretions to females through copulation in *Menida scotti* (Heteroptera: Pentatomidae) *Appl. Entomol. Zool.* 28: 325-332.
- Lay, M., D. Zissler & R. Hartmann. 1999.** Ultrastructural and functional aspects of the spermatheca of the African Migratory Locust *Locusta migratoria migratorioides* (Reiche & Fairmaire) (Orthoptera: Acrididae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* 28: 349-361.
- Legaspi, J.C., V. Russell & B.C. Legaspi Jr. 1994.** Microscopic examination of the spermatheca as an indicator of mating success in *Podisus maculiventris* (Say). *Southwest. Entomol.* 19: 189-190.

- Martins, G.F. & J.E. Serrão. 2002.** A comparative study of the spermatheca in bees (Hymenoptera; Apoidea). *Sociobiology* 40: 711-720.
- Micholitsch, T., P. Krügel & G. Pass. 2000.** Insemination and fertilization in the seed bug *Lygaeus simulans* (Heteroptera: Lygaeidae). *Eur. J. Entomol.* 97: 13-18.
- Osanai, M. & P.S. Chen. 1993.** A comparative study on the arginine degradation cascade for sperm maturation of *Bombyx mori* and *Drosophila melanogaster*. *Amino Acids* 5: 341-350.
- SAS Institute, 1999-2001.** SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. Cary, SAS Institute Inc.
- Soares, M.A. 2006.** Capacidade reprodutiva de *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae) com diferentes frequências de acasalamento e troca de parceiros em plantas de soja. Dissertação de Mestrado, Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 102p.
- Tadler, A. 1999.** Selection of a conspicuous male genitalic trait in the seedbug *Lygaeus simulans*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266: 1773-1777.
- Torres, J.B. & J.C. Zanuncio. 2001.** Effects of sequential mating by males on reproductive output of the stinkbug predator, *Podisus nigrispinus*. *BioControl* 46: 469-480.
- Torres, J.B., J.C. Zanuncio & M.A. Moura. 2006.** The predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*: biology, ecology and augmentative releases for lepidoperan larval control in *Eucalyptus* in Brazil. *Persp. Agric. Vet. Sci.* 15: 1-16.
- Tram, U. & M.F. Wolfner. 1999.** Male seminal fluid proteins are essential for sperm storage in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 153: 837-844.

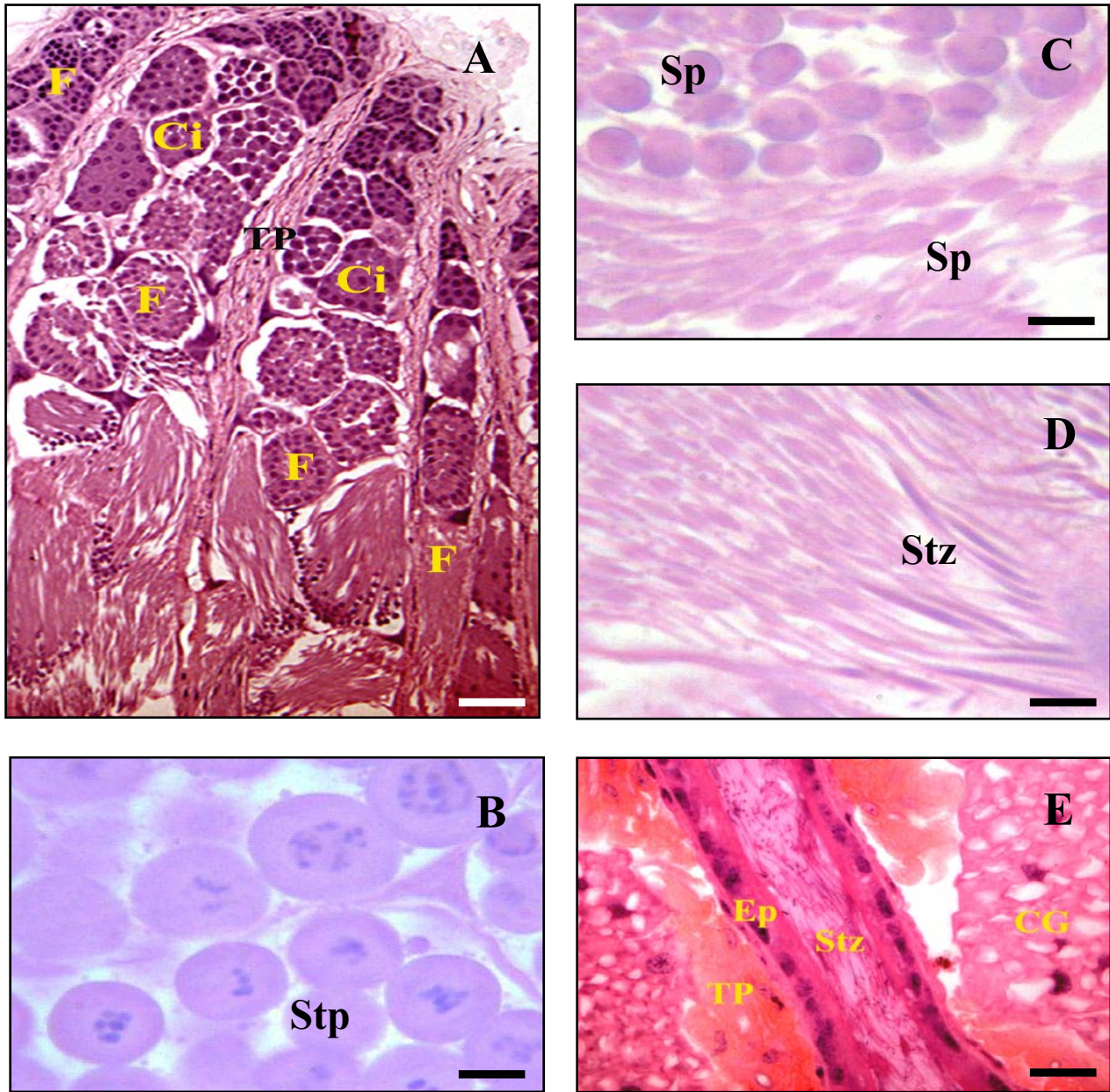


Figura 1. (A) Testículo de *Podisus nigrispinus* mostrando os folículos testiculares e formação de cistos. Barra 100 μm . (B) Espermatócitos em divisão celular. Barra 10 μm . (C) Espermatídes arredondadas e ovais em diferenciação. Barra 10 μm . (D) Feixes de espermatozóides. Barra 10 μm . (E) Lúmen do ducto deferente apresentando espermatozóides. Barra 25 μm . CG – corpo gorduroso, Ci – cistos, Ep – epitélio, F – folículo testicular, Sp – espermatídes, Stp – espermatócitos, Stz – espermatozóides, TP – túnica própria.

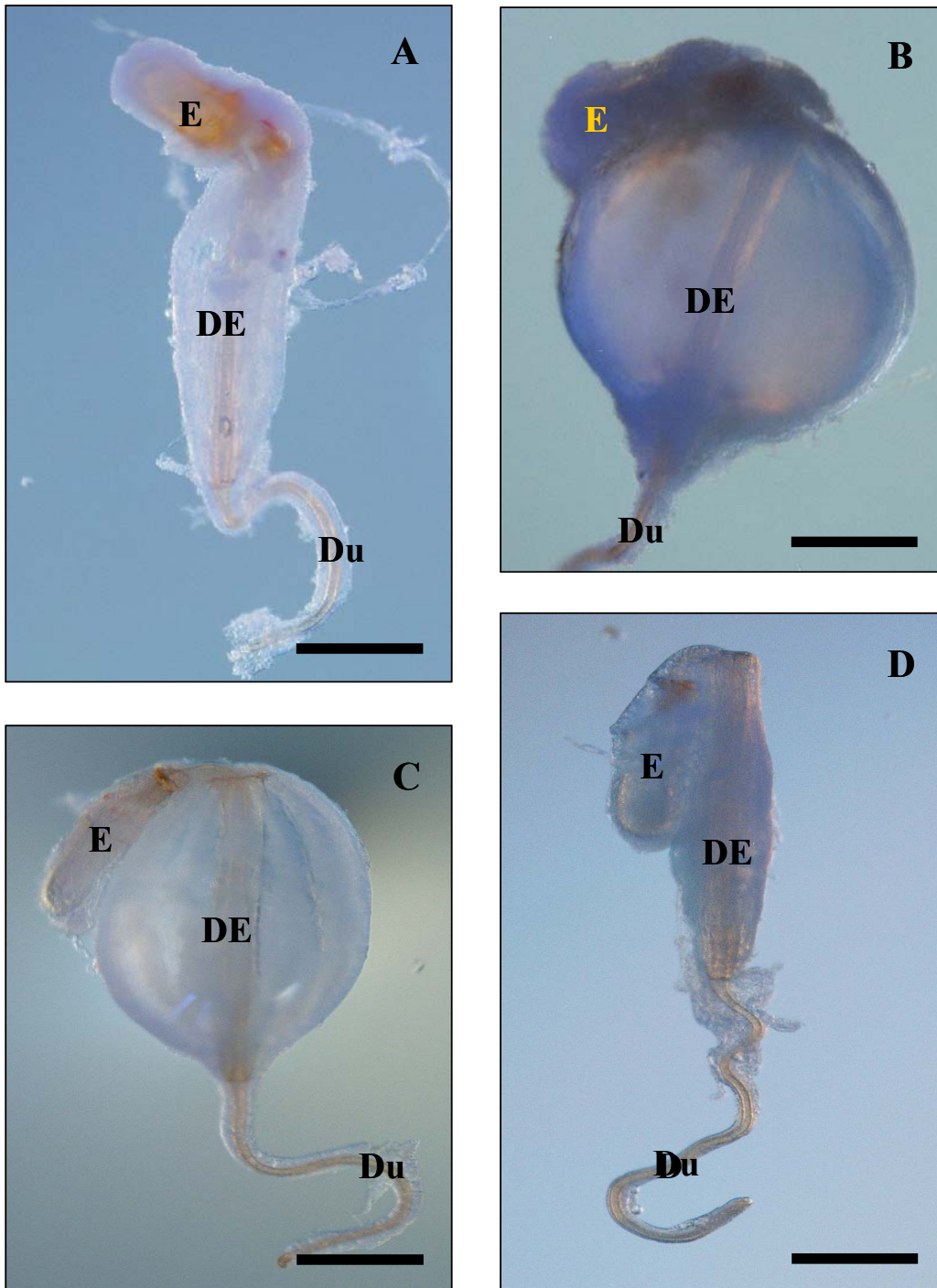


Figura 2. (A) Espermateca e ducto elástico espermatecal de fêmeas virgens de *Podisus nigrispinus*. (B) Dilatação do ducto elástico da espermateca de fêmeas com duração normal de cópula. (C) - Dilatação do ducto elástico da espermateca de fêmeas com 24h do término da cópula. (D) Ducto elástico da espermateca de fêmeas com 72h do término da cópula. DE – ducto elástico da espermateca, E – espermateca e Du – prolongamento do ducto elástico que se comunica com oviduto comum. Barra = 0,5 mm.

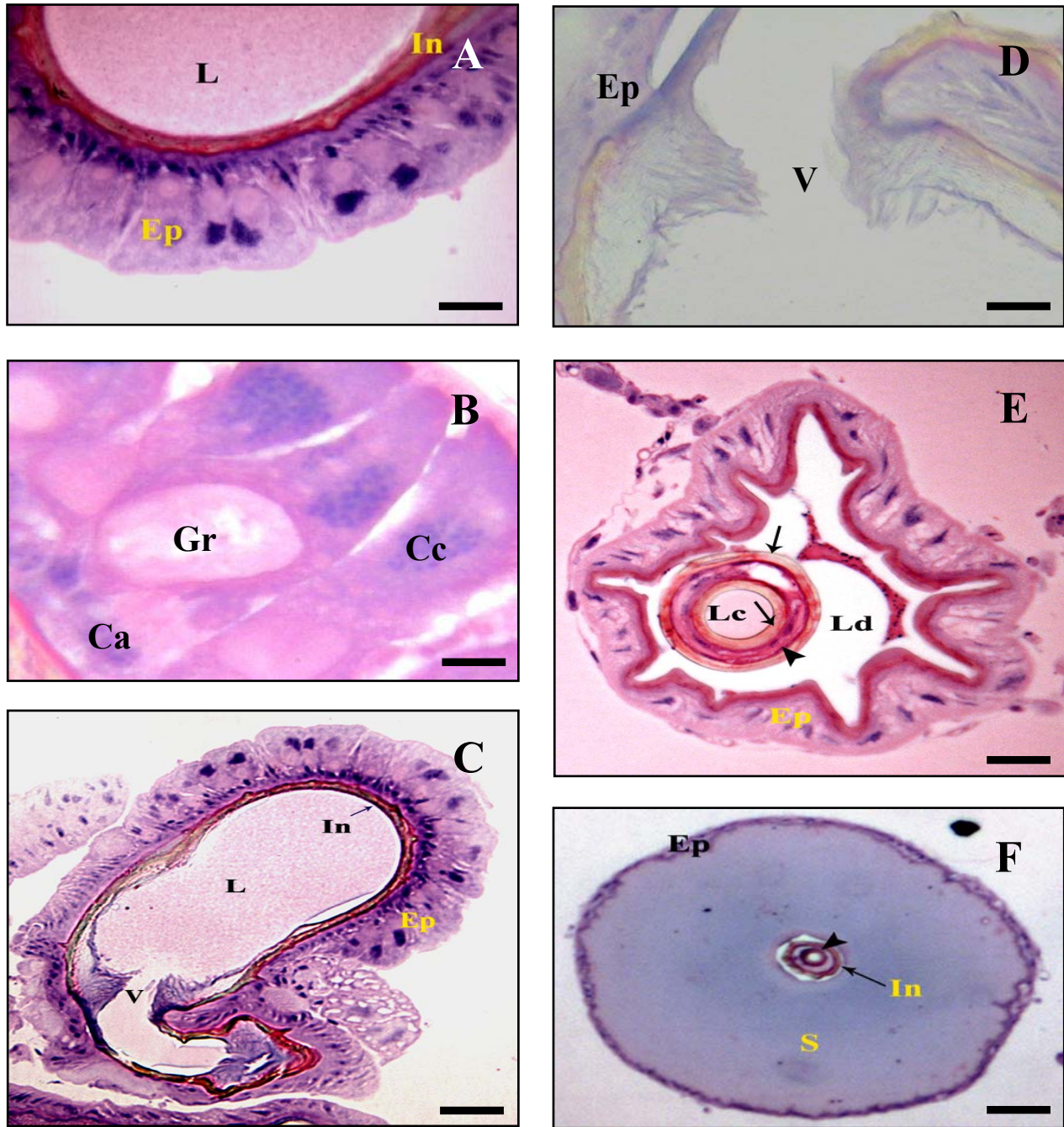


Figura 3. (A) Lúmen da espermateca em fêmeas virgens de *Podisus nigrispinus*. Barra 25 μ m. (B) Detalhe do epitélio da espermateca de fêmeas com duração normal de cópula. Barra 10 μ m. (C) Área de transição da espermateca e ducto elástico, com a presença da válvula de fêmeas virgens. Barra 100 μ m. (D) Válvula entre a espermateca e o ducto elástico espermatecal de fêmeas virgens. Barra 25 μ m. (E) Dobras da parede externa do ducto elástico da espermateca de fêmeas virgens. Barra 50 μ m. (F) Dilatação do ducto elástico da espermateca de fêmeas com duração normal de cópula. Barra 250 μ m. Ca – células achatadas, Cc – células colunares, Ep – epitélio, Gr – grânulos citoplasmáticos, In – íntima, L – lúmen da espermateca, Lc – lúmen do canal do ducto da espermateca, Ld - lúmen do ducto elástico da espermateca, S – secreção, Stz – espermatozoides, V – válvula da espermateca, Seta – cutícula do canal do ducto elástico da espermateca, Cabeça de seta – epitélio do canal do ducto elástico da espermateca.

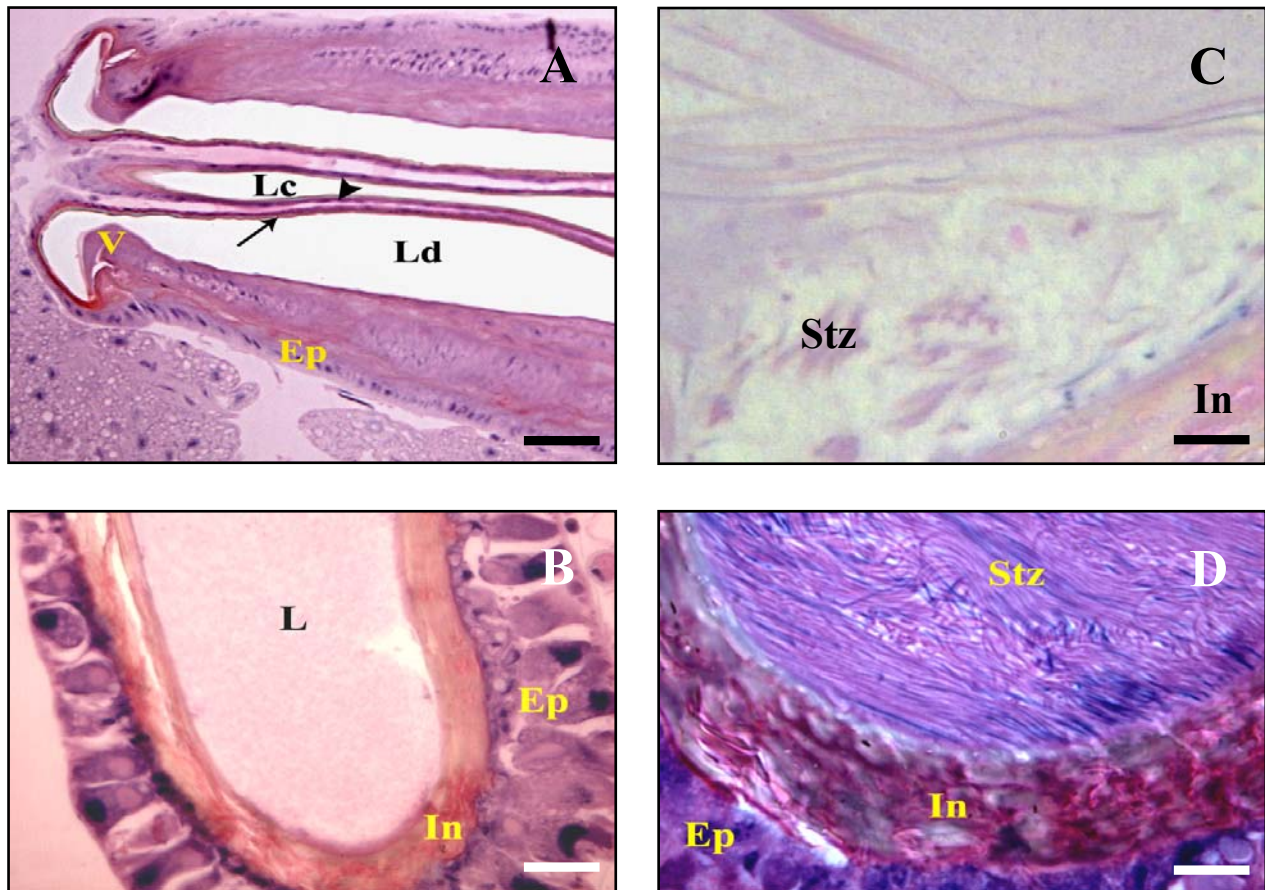


Figura 4. (A) Corte longitudinal do ducto elástico e do canal esclerosado interno de fêmea virgem de *Podisus nigrispinus*. Barra 100 μm . (B) Espermateca de fêmeas com cópula interrompida aos 120 minutos. Barra 25 μm . (C) Espermateca de fêmeas com cópula interrompida aos 240 minutos. Barra 10 μm . (D) Espermateca de fêmeas com duração normal de cópula, sem interrupção. Barra 10 μm . Ep – epitélio, In – íntima, L – lúmen da espermateca, Lc – lúmen do canal do ducto elástico da espermateca, Ld - lúmen do ducto elástico da espermateca, Stz – espermatozóides, V – válvula do ducto elástico da espermateca, Seta – íntima do canal do ducto elástico da espermateca, Cabeça de seta – epitélio do canal do ducto elástico da espermateca.