

POLIGAMIA E O DESEMPENHO REPRODUTIVO DE *Tenuisvalvae notata* (MULSANT)

(COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)

por

AMANDA CARLOS TÚLER

(Sob Orientação da Professora Christian Sherley Araújo da Silva Torres - UFRPE)

RESUMO

O controle biológico utilizando insetos predadores tem sido uma estratégia alternativa no controle de pragas. Entre os insetos predadores, a joaninha *Tenuisvalvae notata* (Mulsant) possui destaque devido a sua especialidade em Pseudococcidae. Esta joaninha é uma espécie poligâmica e os múltiplos acasalamentos podem resultar em custos e benefícios para o seu desempenho reprodutivo e sobrevivência. Nesse trabalho, foi estudado o papel da poligamia sobre o desempenho reprodutivo de *T. notata*, através da escolha do parceiro, sucesso reprodutivo das fêmeas, sobrevivência de adultos, virilidade masculina, desenvolvimento dos descendentes, e a morfologia da espermateca. Os resultados mostram que houve preferência de cópula com parceiros já conhecidos. Fêmeas jovens alcançaram maior número de descendentes e longevidade quando copularam apenas uma vez em comparação as fêmeas mais velhas e/ou poligâmicas. Não foram observados efeitos na fecundidade, fertilidade e desenvolvimento da descendência entre os tratamentos. Entretanto, a fecundidade e a fertilidade diminuíram ao longo do período de oviposição para todos os tratamentos avaliados. A morfologia da espermateca de fêmeas virgens e acasaladas é semelhante, bem como os teores de carboidratos e de proteínas. A espermateca é simples, com formato riniforme, bem esclerotizada e constituída apenas do receptáculo e duto espermático. Não foram encontrados espermatozoides na espermateca de fêmeas copuladas

apenas uma vez, mas detectados em espermatecas de fêmeas com múltiplas cópulas. Dessa forma, sugere-se que apesar de ser poligâmica e possuir espermateca para armazenamento de material seminal, *T. notata* pode ser monogâmica se for dada uma chance, e que a poligamia é mantida para repor os espermatozoides ao longo do tempo e garantir a variabilidade genética da descendência.

**PALAVRAS-CHAVE:** Controle biológico, coccinellídeo, múltiplas cópulas, espermateca.

POLIGAMY AND ON THE REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF *Tenuisvalvae notata*

(MULSANT) (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)

por

AMANDA CARLOS TÚLER

(Sob Orientação da Professora Christian Sherley Araújo da Silva Torres – UFRPE)

ABSTRACT

Biological control using predatory insects has been an alternative for pest control. Amongst insect predators, the ladybird beetle *Tenuisvalvae notata* (Mulsant) stands out by being specialist in Pseudococcidae. This ladybird beetle is polygamous and multiple matings may imply some costs and benefits for its reproductive performance and survival. In this study, we investigated the effects of polygamy on the reproductive performance of *T. notata*, through partner choice, adult female reproductive success, adult survival, male virility, offspring development, and the morphology of the spermatheca. Results show that there was a preference of couples in copulating with known partners. Younger females had higher fecundity and longer longevity when mated only once in comparison to older females and/or those mated multiple times. There were no effects on fecundity, fertility and offspring development between the treatments. In contrast, fecundity and fertility decreased along the oviposition period for all evaluated treatments. The morphology of the spermatheca of virgin and mated females is similar, as well as amount of carbohydrates and proteins. The spermatheca is simple, rhiniform, well sclerotized and consists only of the receptacle and spermatic duct. There were no spermatozoids stored in the spermatheca of females mated only once, but spermatozoids were found in the spermatheca of females mated multiple times. Therefore, we suggest that even though *T. notata* is

polygamous and has a spermatheca to store of seminal material, it can be monogamous if given the chance, and polygamy is maintained to replace the spermatozoa over time and to guarantee offspring genetic variability.

**KEY WORDS:** Biological control, coccinellid, multiple mating, spermatheca.

POLIGAMIA E O DESEMPENHO REPRODUTIVO DE *Tenuisvalvae notata* (MULSANT)

(COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)

por

AMANDA CARLOS TÚLER

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 – 2017

POLIGAMIA E O DESEMPENHO REPRODUTIVO DE *Tenuisvalvae notata* (MULSANT)

(COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)

por

AMANDA CARLOS TÚLER

Comitê de Orientação:

Christian Sherley Araújo da Silva Torres – UFRPE

Agna Rita dos Santos Rodrigues – IFGoiano

POLIGAMIA E O DESEMPENHO REPRODUTIVO DE *Tenuisvalvae notata* (MULSANT)

(COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)

por

AMANDA CARLOS TÚLER

Orientador: \_\_\_\_\_  
Christian Sherley Araújo da Silva Torres – UFRPE

Examinadores: \_\_\_\_\_  
Jorge Braz Torres – UFRPE

\_\_\_\_\_  
Glaucilane dos Santos Cruz – PNPd/CAPES

*Aos meus pais João Carlos Neto e Lúcia Maria Túler, por todo o carinho, amor e empenho.  
Apesar das dificuldades, sempre estiveram além do seu tempo por fazer dos seus filhos,  
buscadores de novos caminhos.*

**DEDICO**



## AGRADECIMENTOS

Cursar o mestrado foi uma grande oportunidade para mim, portanto agradeço a UFRPE e ao PPGEA, pela oportunidade de aprofundar meus conhecimentos científicos e a CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora pela certeza de sua presença, fidelidade e refúgio bem como todas as oportunidades que me foram concedidas.

Aos meus pais João Carlos Neto e Lúcia Maria Túler pelo amor incondicional e apoio e aos meus irmãos, Luis, Leandro, Denise, Daniela, Amélia, Mariane e Renata pelo carinho, apoio e paciência. Aos meus sobrinhos Victor, Gabriel, Esther, Emanuel, Heitor, Júlia e Rafael. Aos meus avós João Carlos Filho e Amélia Dodó Túler pelo exemplo de vida e dedicação a família e ao trabalho.

Agradeço a equipe do laboratório de comportamento de insetos. Professora Christian S.A.S. Torres pela orientação e ensinamentos prestados. A Elisabete Albuquerque, Cynara Moura, Vitor Cezar Pacheco, Daniel Passos Assis, Rossana Batista, Alisson Lima, Engel Carmo, Rafael Rosa, Clara e nosso agregado Rhian Moraes, por fazer meus dias mais calmos e preenchidos de companheirismo e partilha. Foi um grande prazer fazer parte da vida de cada um.

Agradeço enormemente a toda a equipe da professora Valéria Wanderley Teixeira e do professor Álvaro Aguiar Coelho que tanto me auxiliaram para a realização desse trabalho. Em especial a Nane dos Santos, Carolina Guedes e Caroline Guimarães.

Agradeço a equipe do laboratório do professor Jorge Braz Torres, nosso “laboratório irmão”. A equipe do laboratório do professor Reginaldo Barros e do professor Manoel Guedes pelo apoio e momentos de descontração.

Aos grandes amigos conquistados e alguns reforçados nesse período de grande aprendizado. Elisabete Albuquerque, Cynara Moura, Vitor Pacheco, Daniel Passos, Rhian Moraes, Elaine Cristina, Mauricéa Fidelis, Alessandra Guedes, Jonhosson Guilherme, Nayara Cristina, Andrezo Santos, Aline Lira, Cristiane Silva, René Luna, Lucas Arruda, Gulilherme Rolim, Paulo Duarte, Felipe Colares, Paulo Roberto, Rogério Lira, Tamara Leal, Tamara Carvalho, Erica Calvet, Antônio Paz, Vaneska Barbosa, Girleide Vieira, Jefferson Silva, Paolo Augusto, Alice Sutana, Hilton Nobre, Nane, Liliane, Natália, Ruan, Sebastian, Nicolas, Carol Guedes, entre outros. Em especial gostaria de agradecer as minhas amigas Francieli Marcelino dos Santos e Luziani Rezende Bestete pelo apoio, companheirismo e carinho a mim dedicado. Obrigada por existirem.

Agradeço ao meu grande amigo e companheiro Wilson Rodrigues Valbon, pelo amor, carinho, dedicação apesar de toda a distância e dificuldades enfrentadas.

## SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS .....	ix
CAPÍTULOS	
1 INTRODUÇÃO .....	1
Controle Biológico de Insetos .....	1
Coleoptera Coccinellidae .....	2
Joaninha predadora <i>Tenuisvalvae notata</i> .....	3
Aparelho reprodutor de insetos .....	4
Reprodução em insetos.....	6
Sistemas de acasalamento em insetos .....	8
Custos e benefícios da poligamia .....	12
“Trade-off” reprodução x sobrevivência.....	14
Considerações finais.....	16
LITERATURA CITADA.....	17
2 INFLUÊNCIA DA IDADE E HISTÓRIA DE ACASALAMENTO SOBRE O DESEMPENHO REPRODUTIVO DE <i>Tenuisvalvae notata</i> (MULSANT) (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE) .....	24
RESUMO .....	25
ABSTRACT .....	26
INTRODUÇÃO .....	27
MATERIAL E MÉTODOS .....	29

RESULTADOS.....	34
DISCUSSÃO.....	37
AGRADECIMENTOS.....	43
LITERATURA CITADA.....	43
3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA ESPERMATECA DE FÊMEAS VIRGENS E COPULADAS DE <i>Tenuisvalvae notata</i> (MULSANT) (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE).....	55
RESUMO .....	56
ABSTRACT .....	57
INTRODUÇÃO .....	58
MATERIAL E MÉTODOS .....	60
RESULTADOS.....	64
DISCUSSÃO.....	66
AGRADECIMENTOS.....	71
LITERATURA CITADA.....	71
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	77

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

### **Controle Biológico de Insetos**

O controle biológico é um dos principais componentes do manejo integrado de pragas e consiste na utilização de inimigos naturais, tais como entomófagos (predadores e parasitoides) e entomopatógenos para manter o equilíbrio populacional de pragas nos agroecossistemas (Debach 1968).

Dentre os inimigos naturais, os insetos entomófagos são agentes de grande importância na manutenção do equilíbrio populacional de insetos praga (Tanwar *et al.* 2007, Gautam *et al.* 2010, Ram & Saini 2010). Entretanto, geralmente ocorrem em número insuficiente para promover controle efetivo das populações de praga (Parra *et al.* 2002), necessitando de liberações inundativas/inoculativas e conservação desses inimigos naturais.

Dentre os inimigos naturais, os predadores exercem papel fundamental na defesa das plantas contra herbívoros por artrópodes (Whitcomb 1981). A utilização de insetos predadores para suprimir a população de insetos herbívoros é amplamente reconhecida, em especial de cochonilhas (Murdoch & Oaten 1975, Hagen *et al.* 1976, Mensah 2002).

### **Coleoptera: Coccinellidae**

Compreendem os insetos popularmente conhecidos como joaninhas, amplamente empregados no controle biológico de insetos de corpo pequeno e pouco quitinizados, tais como cochonilhas, pulgões, moscas-brancas, psilídeos, tripes e ácaros (Obrycki *et al.* 2009, Hodek & Honek 2009). Dentre as espécies de joaninhas predadoras, *Cryptolaemus montrouzieri* (Mulsant),

espécie nativa da Austrália, tem sido importada por diversos países para o controle da cochonilha-dos-citrus, *Planococcus citri* (Risso) (Moore & Hattingh 2004, Porcar *et al.* 2010) e, *Harmonia axyridis* (Pallas) no controle de *Diaphorina citri* (Kuwayama) (Michaud 2004).

O hábito coccidófago (predadoras de cochonilhas) é considerado como o mais primitivo (Vantaux *et al.* 2012), sendo as joaninhas mais especializadas do que os Coccinellidae afidófagos. Geralmente, suas presas são restritas a espécies de um único gênero ou vários gêneros próximos como ocorre em *Rodolia limbata* (Blackburn), especializado em espécies de Margarodidae. A maioria dos Coccinellidae coccidófagos alimenta-se de uma ou duas famílias (Kusnetsov 1997). O hábito coccidófago corresponde cerca de 36% das espécies de Coccinellidae predadores nas regiões Tropicais e Subtropicais, enquanto que aproximadamente outros 20% predam preferencialmente pulgões (Hodek & Honek 2009) atuando no controle de insetos-praga em muitas culturas economicamente importantes (Michaud *et al.* 2013, Barbosa *et al.* 2014, Mirhosseini *et al.* 2014, Colares *et al.* 2015).

Entretanto, o desconhecimento dos diferentes aspectos envolvidos nos processos de produção e reprodução (biologia, ecologia, taxonomia, dentre outros), e de liberação e posterior manejo desses inimigos naturais em campo (Carvalho & Souza 2002), têm limitado o uso de coccinelídeos para o controle biológico, necessitando assim, de estudos que complementem a sua aplicação no controle.

### **Joaninha predadora *Tenuisvalvae notata***

A joaninha *Tenuisvalvae notata* (Mulsant), pertence à subfamília Scymninae e tribo Hyperaspidini. Os adultos são de coloração marfim a amarelo apresentando manchas circulares de coloração marrom escuro a preto. Alguns exemplares podem apresentar uma mancha laranja ou vermelho em cada élitro e apresentam tamanho de 2,9 a 3,4 mm. As fêmeas geralmente são

maiores que os machos, e apresentam duas manchas pretas em forma de triângulo localizadas na parte superior da cabeça, entre os olhos, e têm a porção final do abdome com formato afunilado. Já os machos apresentam uma mancha branca em forma de triângulo na porção marginal do mesoesterno e com a porção final do abdome mais arredondado (Mulsant 1850). O período de larva a adulto tem duração em média de 30 dias (Barbosa *et al.* 2014a), mas os adultos apresentam longevidade de mais de 84 semanas em temperatura de 20 °C e 60 semanas em temperatura de 25 °C quando alimentada com a cochonilha *Phenacoccus manihoti* (Matile-Ferrero) (Dreyer *et al.* 1997).

De acordo com os resultados apresentados por Santos *et al.* (2017), *T. notata* apresenta poligamia, podendo acasalar múltiplas vezes durante o dia e ao longo da vida adulta, com média de duas cópulas diárias. O número de cópulas aumenta a partir de cinco dias de idade, quando os machos alcançam a maturidade sexual. As fêmeas estão aptas a copular com 24 horas de idade e tem no período entre 11 horas da manhã a 16 horas da tarde, como período de maior frequência de acasalamentos. Os coccinelídeos apresentam 16 ovariolos com número de postura aproximadamente a metade do número de ovariolos. Estes são do tipo meroístico telotrófico (células nutrízes somente na parte apical do germário) (Chapman 2013). As fêmeas depositam seus ovos em pequenos grupos ou isolados, próximo às suas presas como ocorre em diversas espécies de coccinelídeos coccidófagos (Almeida & Ribeiro-Costa 2009).

Esta espécie é nativa da América do Sul, distribuindo-se pela Bolívia, Colômbia, Paraguai e Brasil. No Brasil, ocorre nos estados do Amapá, Bahia, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Rondônia e São Paulo (Dreyer *et al.* 1997, Peronti *et al.* 2016). Mais recentemente, adultos de *T. notata* foram encontrados no Semiárido de Pernambuco em plantas de algodoeiro, infestadas com as cochonilhas *Ferrisia dasyrillii* (Cockerell), e *Phenacoccus solenopsis* (Tinsley) e em plantas de palma forrageira infestadas com a falsa cochonilha do carmim, *Dactylopius opuntiae* (Cockerell)

(Barbosa *et al.* 2014a). Este predador tem sido encontrado também em plantas de *Hibiscus rosa-sinensis* (Linnaeus) predando a cochonilha rosada do hibisco, *Maconellicoccus hirsutus* (Green) (Peronti *et al.* 2016). Nos planaltos colombianos, essa espécie preda preferencialmente *Phenacoccus herreni* (Cox & Williams), enquanto no sul do Brasil e Paraguai ela tem como presa preferencial *Phenacoccus manihoti* (Matile-Ferrero) (Lohr *et al.* 1990, Sullivan *et al.* 1991).

*Tenuisvalvae notata* apresenta alta voracidade, alimentando-se de cochonilhas tanto na fase larval quanto adulta, e apresenta reprodução diária quando não privada de alimentação. As fêmeas chegam a predar em média, 157,9 ninfas neonatas, ou 3,6 ninfas de terceiro instar ou 2,2 fêmeas adultas da cochonilha *F. dasyrillii* por dia (Barbosa *et al.* 2014a).

Além das características já apresentadas desta espécie, esse coccinelídeo em condições de escassez de alimento, suprime a reprodução e prioriza a sobrevivência, contribuindo para sua manutenção em áreas com baixos níveis de infestação, caracterizada pela fase inicial de colonização da praga (Barbosa *et al.* 2014b). Vale ressaltar que este comportamento pode ser considerado uma importante característica utilizada na seleção de agentes de controle biológico.

### **Aparelho reprodutor de insetos**

O aparelho reprodutor de insetos desempenha diversas funções na reprodutividade da espécie. As fêmeas são as mais estudadas, uma vez que, podem controlar a produção de ovos, recepção e armazenamento dos espermatozoides, a fecundação dos ovos bem como os eventos envolvidos no processo de oviposição. De forma geral, o aparelho reprodutor feminino é formado por um par de ovários unidos por um ligamento suspensor, que em geral está anexado à parede corporal ou ao diafragma dorsal. Cada ovário é formado por ovaríolos e um oviduto lateral, sendo que estes se unem e formam um oviduto comum e a vagina, que se abre no exterior via gonóporo ou vulva (Chapman 2013).



Além dessas estruturas, a espermateca ou receptáculo seminal, tem despertado muito interesse em estudos sobre a biologia reprodutiva de insetos, e pode ser considerada como o principal responsável pelo grande sucesso reprodutivo dos insetos (Pascini & Martins 2016). Em geral, a espermateca é constituída de um receptáculo, ducto e a glândula espermática, entretanto, nem todas as estruturas podem ocorrer na mesma espécie. Em uma revisão realizada por Marzo (2008), de 148 espécies de coleópteras examinadas, apenas 52% das espécies incluíam todas estas peças. Em casos extremos há a ocorrência de espécies sem espermateca como na joaninha *Stethorus pusillus* (Herbst) (Putman 1955). Quanto a sua forma, geralmente é esférica e apresenta dilatação com o preenchimento deste, com material seminal. Além disso, parece haver uma correlação positiva entre o volume da espermateca e o número de gametas que pode armazenar já descrito em abelhas (Martins & Serrão 2002).

Assim, além de armazenar os espermatozoides, a espermateca tem a função de nutrir os espermatozoides através da glândula espermática (pelas secreções de proteínas) (Pascini *et al.* 2012) e controlar a liberação através do bombeamento do material seminal pelo ducto espermático para a região do oviduto onde vai ocorrer a fertilização dos óvulos (Chapman 2013). É ainda dentro da espermateca, que os espermatozoides são protegidos contra danos mecânicos e oxidação através do contato com a hemolinfa (Collins *et al.* 2004). Também, a nutrição dos espermatozoides se dá pela deposição do líquido espermático efetuado pelos machos durante a cópula, constituído de minerais, água e íons, bem como que aloinóis (Michaud *et al.* 2013), e metabólicos secundários precursores de prostaglandinas (Worthington *et al.* 2015). Sem esses mecanismos de nutrição e de proteção do conteúdo espermático, os espermatozoides podem sofrer graves danos tornando-se inviabilizados ou em caso extremo, pode-se levar a morte (Lay *et al.* 1999).

## **Reprodução em insetos**

O modo pelo qual os insetos se reproduzem é determinado por dois aspectos importantes: onde ocorre o desenvolvimento embrionário e se os ovos são fecundados (Matthews *et al.* 2009). Relativo ao desenvolvimento embrionário, aqueles que se desenvolvem fora do corpo da mãe, são classificados como ovíparos. Os ovos podem ser colocados isoladamente ou em massa, apresentando formas variadas. Quando o desenvolvimento embrionário ocorre dentro do corpo da mãe, a qual deposita larva ou ninfa em vez de ovos, é chamado de viviparidade e abrange quatro subtipos: Viviparidade adenotrófica, onde após a eclosão, as larvas são retidas no corpo da mãe, desenvolvem-se no oviduto comum e são nutridos através de secreções glandulares de órgãos especializados, sendo depositadas como larvas maduras, como ocorrem em moscas do gênero *Glossina* (Meier *et al.* 1999); viviparidade no hemocele ocorre quando os ovos são liberados no interior do corpo da mãe, as larvas recém-eclodidas absorvem nutrientes da hemolinfa (Strepsiptera) (Hagan 1951); viviparidade pseudoplacentária quando o embrião desenvolve-se em folículos ovarianos terminais, parte alongada da vagina, nutrindo-se de estruturas semelhantes a placentas como ocorre em Caliphoridae; ovoviviparidade, nesse caso os ovos depositados contêm embriões em adiantado estágio de desenvolvimento, podendo ocorrer larvas recém-eclodidas, a exemplo das moscas Tachinidae (Wood 1987).

Quanto à fecundação dos ovos, o modo mais comum de reprodução nos insetos se dá a partir de indivíduos machos e fêmeas, chamada reprodução sexuada. Esse tipo de reprodução que leva ao comportamento de acasalamento inclui todos os eventos pré e pós-copulatórios, como reconhecimento e recepção, corte, seleção do companheiro (Omkar e Pervez 2000). O aumento do sucesso reprodutivo dos insetos com reprodução sexuada é parcialmente devido à capacidade das fêmeas para armazenar o esperma em suas espermatecas. Este comportamento assegura a fertilização dos ovos durante todo o seu período reprodutivo

podendo dessa forma garantir a independência reprodutiva da necessidade de acasalar várias vezes (Pascini & Martins 2016).

Contudo, outros modos não são incomuns. O desenvolvimento a partir de ovos não fecundados é denominado partenogênese, que em algumas espécies pode ser obrigatório, mas em muitas ordens é facultativo (Gullan & Craston 2007). A fêmea pode produzir partenogeneticamente apenas ovos fêmeas (partenogênese telítoca) como ocorrem em pulgões em regiões tropicais (Simon *et al.* 2002), apenas ovos machos (partenogênese arrenótoca) onde o exemplo clássico é a produção de machos zangões em abelhas melíferas (Gerber & Klostermeyer 1970), ou ovos de ambos os sexos (partenogênese anfítoca ou deuterótoca) que ocorre em pulgões de regiões de clima temperado quando expostas ao fotoperíodo longo (Simon *et al.* 2002). As fêmeas partenogenéticas adultas podem carregar embriões em diferentes estádios de desenvolvimento, podendo coincidir até três gerações em uma única fêmea (Gallote *et al.* 2010). Nas espécies de pulgões pertencentes à Aphididae, as fêmeas partenogenéticas também são vivíparas. Além disso, os pulgões podem produzir ovos diapausicos, resistentes à geada que passam o inverno e que as fêmeas eclodem na primavera. Estas fêmeas são assexuadas e são responsáveis por produzir fêmeas assexuadas que continuam a se reproduzir assexuadamente durante todo o verão (Blackman 1987).

A ocorrência de ovários funcionais em insetos imaturos, quando não corre a fecundação e nesse caso os óvulos desenvolvem-se partenogeneticamente, é chamada de pedogênese (Gullan & Craston 2007). Quando há ocorrência de ovários funcionais em insetos imaturos, mas ocorre o acasalamento e deposição de ovos, é denominado neotenia. O exemplo clássico ocorre nas cochonilhas em que as fêmeas são ápteras e com aparência equivalente ao estágio ninfal, enquanto os machos são alados demonstrando grande dimorfismo sexual (Gullan & Kosztarab 1997, Gullan & Craston 2007).

Um caso um tanto incomum de reprodução sexuada, ocorre em várias espécies de cochonilhas *Icerya* (Hemiptera: Margarodidae) quando ocorre a autofecundação, chamada de hermafroditismo. Nesse caso há a produção de gametas masculinos antes dos gametas femininos no corpo de um único indivíduo garantindo a autofecundação sem a necessidade de dois indivíduos de sexos distintos (Gullan & Kosztarab 1997, Gullan & Craston 2007).

A reprodução assexuada chamada de poliembrião envolve a produção de dois ou mais embriões a partir de um ovo pela subdivisão (fissão). Ela é predominantemente em insetos parasitas ocorrendo principalmente em Encyrtidae (Gullan & Craston 2007).

### **Sistemas de acasalamento em insetos**

Os diferentes sistemas de acasalamentos em insetos (monogâmico, poliândrico ou poligâmico) são baseados no número de cópulas de cada sexo em um dado período e/ou pelo comportamento de obtenção do parceiro sexual (Thornhill & Alcock 1983).

A monogamia ocorre quando há fidelidade entre os parceiros sexuais, ou seja, macho e fêmea acasalam exclusivamente um com o outro como ocorre em vespas do gênero *Melittobia* (Matthews *et al.* 2009). Quando não há fidelidade entre os parceiros, esses são considerados promíscuos. A poligamia é caracterizada pela promiscuidade de ambos os sexos, e assim, machos e fêmeas acasalam com vários indivíduos. Neste caso, a poligamia está dividida em poliginia e poliandria. A poliginia se dá quando um macho acasala com fêmeas distintas como ocorre em *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae). Nesse caso a receptividade das fêmeas é alterada após o acasalamento (Craig 1967). A poliandria ocorre quando uma fêmea acasala com machos distintos como em formigas sociais (Kronauer *et al.* 2007). Em geral, é suposto que as fêmeas acasalam somente a uma frequência que assegure uma taxa de fertilização satisfatória.

Evolutivamente falando, alguns fatores contribuem para que espécies sejam poligâmicas, dentre eles a garantia de fertilização, acesso a variabilidade genética na progênie evitando a hibridização na prole e o estímulo para produção de ovos, em resposta a presença de espermatozoides viáveis (Tregenza & Wedell 1998, Arnqvist & Nilsson 2000). Mas também, em obter benefícios secundários como nutrientes transferidos junto ao material seminal durante a cópula (Thornhill & Alcock 1983) e presentes nupcias (Shutt *et al.* 2010). Em contraste, outras espécies, tendem a acasalar múltiplas vezes com o mesmo parceiro (Brown *et al.* 2006, Liu *et al.* 2010), já que o gasto de tempo e energia associados ao processo de corte são dispendiosos tanto para macho quanto para fêmeas (Daly 1978).

Em geral, como a função primária do acasalamento é a transferência de material genético para as fêmeas, os machos geralmente aumentam sua aptidão acasalando com o maior número de fêmeas possível para maximizar a paternidade (Torres-Vila 2013) e de forma indireta, a melhoria do desenvolvimento da prole pela garantia de benefícios para as fêmeas (Arnqvist & Nilsson 2000, Bayoumy & Michaud 2014), incluindo a sobrevivência, taxa de desenvolvimento, e o tamanho final dos adultos (Omkar & Mishra 2010). Assim, a história de vida dos machos parece influenciar a receptividade e os benefícios adquiridos pelo desenvolvimento da prole. Por sua vez, as fêmeas geralmente maximizam o sucesso reprodutivo por meio de cruzamentos seletivos com machos de maior qualidade (Bateman 1948), tendo na poligamia por meio de cruzamentos com vários machos, maiores chances de encontrar um macho de qualidade genética superior (Sardell *et al.* 2012). Em ambos os casos, espera-se como consequência, um maior número de ovos viáveis produzidos (Arnqvist & Nilsson 2000).

Em geral, o comportamento dos machos é quase sempre direcionado para localizar fêmeas, respondendo principalmente às oportunidades de acasalamento. Em contraste, as fêmeas respondem principalmente às presas (Hemphill *et al.* 1996). Através dos modos observados no

comportamento de busca, é possível observar a diferença na forma como machos e fêmeas tendem a maximizar sua aptidão.

A poligamia é comum entre os insetos, em especial em Coccinellidae (Omkar & Mishra 2010), sugerindo que uma ou poucas cópulas, não são suficientes para que as fêmeas obtenham quantidades adequadas de esperma e gonadotrofinas, para manter uma alta produção de ovos viáveis durante toda a sua vida, garantindo seu máximo sucesso na produção de descendentes (Arnqvist & Nilsson 2000). Entretanto, Awad *et al.* (2013) sugeriu que fêmeas da joaninha *H. axyridis* coletadas no inverno antes da hibernação, continha uma quantidade suficiente de espermatozoides para fertilizar seus ovos por pelo menos três meses e nesse caso, não precisariam de acesso dos machos para uma nova cópula. Entretanto, Majerus (2009) observou que fêmeas de *Adalia bipunctata* (Linnaeus) continha cerca de dez vezes mais fluido espermático do que o necessário para a fertilização de ovos durante todo seu período reprodutivo. O mesmo comportamento foi observado na espécie *Coelophora saucia* (Mulsant) onde, embora três acasalamentos fossem suficientes para maximizar a fertilidade dos ovos, as fêmeas consentiam um número superior de acasalamentos (Omkar & Mishra 2010).

É sugerido que acasalamentos múltiplos são passíveis de ocorrer apenas quando os benefícios superam os custos para ambos os sexos (Thornhill & Alcock 1983), sendo considerada uma estratégia usada para manter não somente a alta fertilidade (Bayoumy & Michaud 2014), mas também ganho em material genético (Thornhill & Alcock 1983), assegurando a produção de uma progênie geneticamente diversificada e mais segura contra a perda de condicionamento físico, que iria resultar a partir de um único acasalamento com um macho de baixa qualidade ou estéril (Fox & Rauter 2003).

Outros eventos como estímulos do macho, preenchimento dos órgãos de armazenamento de esperma, aquisição de espermatóforos, presentes nupcias e fluidos seminais associados a

mecanismos fisiológicos também podem atuar sobre a receptividade das fêmeas (Shutt *et al.* 2010).

A própria história de vida dos machos pode aumentar ou diminuir a receptividade ou escolha das fêmeas no momento do acasalamento. Em *C. montrouzieri*, as fêmeas preferem acasalar com machos previamente acasalados (Jiaqin *et al.* 2014) e Colares *et al.* (2015) observou que fêmeas de *Eriopis connexa* (Germar) acasaladas com vários machos virgens iniciam mais rápido a oviposição. Esse efeito da aptidão paterna sobre a descendência de coccinellídeos pode ser funcionalmente ligado à estimulação de fecundidade, e pode variar com o estado de acasalamento dos machos (Michaud *et al.* 2013, Colares *et al.* 2015).

Após múltiplas cópulas, Michaud *et al.* (2013) demonstraram que alomônios produzidos pelos machos para inibir uma próxima cópula de fêmeas, foram diminuídos por cruzamentos repetidos em *Coccinella transversalis* (Fabricius) e *Coccinella septempunctata* (Linnaeus). Os efeitos de redução ocorreram na fecundidade das fêmeas, viabilidade de ovos, e os efeitos paternos na longevidade dos machos após múltiplas cópulas. Assim, como o investimento do macho em produzir material seminal é alto, machos virgens podem ser capazes de estimular a reprodução de fêmeas mais forte do que os machos anteriormente acasalados.

A idade dos machos na primeira cópula também pode influenciar o desempenho reprodutivo de fêmeas. Por exemplo, Omkar & Mishra (2010) e Mirhosseini *et al.* (2014), mostraram que a fecundidade e a fertilidade dos ovos em *Coelophora saucia* (Mulsant) e *Cheilomenes sexmaculata* (Fabricius), foram maximizadas quando as fêmeas acasalaram com machos de 30 dias de idade na primeira cópula, respectivamente. Isso porque somente após a emergência, são produzidas nas glândulas acessórias dos machos, proteínas de fluido seminal (Walters & Harrison 2008), substâncias que aumentam a fecundidade e atuam como estimulantes de oviposição (Simmons

2011) e até mesmo pode acelerar a taxa de desenvolvimento dos ovários nas fêmeas (Shahid *et al.* 2016), bem como a maturação dos ovários nas fêmeas (Obata 1988).

Esses efeitos adquiridos durante o processo de cópula podem afetar o comportamento reprodutivo de machos e fêmeas na sua receptividade, influenciando diretamente a ocorrência e o padrão de poligamia da espécie (Arnqvist & Nilson 2000), e o número de parceiros aceitos por fêmeas e machos (Thornhill & Alcock 1983) alterando assim o sistema de acasalamento.

Assim, a história de vida dos machos têm fortes efeitos sobre o desenvolvimento paterno da progênie, indicando uma perda dos fatores responsáveis da atividade sexual de machos.

### **Custos e benefícios da poligamia**

Acasalamentos múltiplos tendem a ocorrer quando os benefícios superam os custos para ambos os sexos (Thornhill & Alcock, 1983). Assim, a aptidão de machos e fêmeas poliândricos tem sido muitas vezes comparado com o de machos e fêmeas acasalados isoladamente (Thornhill & Alcock 1983, Torres & Zanuncio 2001, Omarkar 2012, Bayoumy & Michaud 2014, McDonald & Pizzari 2016). Em ambos os casos, monogamia e poligamia, têm-se custos e benefícios associados a características genéticas das populações de insetos, junto com fatores ambientais que interagem para moldar a evolução do sistema de acasalamento das espécies (Parker & Birkhad 2013, Burdfield-Steel *et al.* 2015).

A poligamia pode gerar alguns benefícios para os indivíduos, tais como machos e fêmeas melhoram a sua aptidão, evitando a endogamia acasalando com parceiros distintos (Dunn *et al.* 2005). Os benefícios de múltiplas cópulas com machos distintos têm sido apresentados baseados principalmente no ganho de material genético e no ganho em material nutricional. O ganho em material genético ocorre através da manipulação da paternidade dos descendentes, aumentando a diversidade entre progênies e diminuindo a incompatibilidade de genótipos (Michaud *et al.* 2013).



A presença de esperma de diferentes machos pode ainda intensificar a competição do esperma dentro do sistema reprodutivo da fêmea, aumentando o sucesso de fertilização e assim, a qualidade da descendência (Bayoumy & Michaud 2014).

Os benefícios materiais ou nutricionais são adquiridos principalmente via fluido seminal, espermatóforos ou presentes nupciais oferecidos pelos machos às fêmeas durante a corte ou cópula propriamente dita. Por exemplo, os espermatóforos oferecidos para fêmeas da espécie de grilo, *Isophya Kraussi* (Brunner) (Orthoptera: Phaneropteridae), fornecem toda a energia para as fêmeas por um a dois dias. Como uma fêmea pode se acasalar a cada dois a três dias, ela pode obter todo seu alimento através de acasalamentos (Voigt *et al.* 2005).

Os recursos podem estar relacionados ao território disponibilizado pelos machos para fêmeas, como ocorre na libélula *Calopteryx maculata* (Beauvois) (Odonata: Calopterygidae). Nesse caso, dois ou mais machos vão disputar um recurso (território) e a escolha da fêmea é pelo macho que ganha à disputa. Esta se baseia em perseguições e exibições das asas. As fêmeas tendem a acasalar com machos mais “valiosos”, que disponibilizam melhor recurso para sua alimentação e oviposição (vegetação aquática emergente) e alimentação da prole (Waage 1988). Esses benefícios adquiridos através da poliandria em tais estudos são medidos principalmente pelo aumento da fecundidade e fertilidade dos ovos, o desenvolvimento progênie mais rápido e melhor sobrevivência (Michaud *et al.* 2013, Jiaqin *et al.* 2014, Colares *et al.* 2015).

Embora múltiplas cópulas possam resultar em benefícios reprodutivos, estas também podem gerar desvantagens para machos e fêmeas. Como desvantagens incluem-se a perda de tempo ou energia, redução da longevidade, bem como um aumento dos riscos de doenças (Majerus & Majerus 2012), predação e lesão (Dunn *et al.* 2005).

Nos machos, os custos podem ocorrer em diferentes momentos: durante a produção de gametas, na procura de fêmeas, produção e/ou fornecimento de espermatóforos e presentes

nupciais durante o cortejo, competição com outros machos e risco de injúrias, infanticídio, incerteza paternal, tempo guardando as fêmeas e em alguns casos no cuidado com a prole (Scharf *et al.* 2013).

O excessivo número de cópulas dos machos pode não ser interessante para as fêmeas, uma vez que machos previamente acasalados com outras fêmeas podem sofrer um decréscimo na quantidade de material seminal transferido, talvez por que não haja tempo hábil para reposição dos espermatozoides. Segundo Perry & Tsé (2013), os machos da joaninha *Adalia bipunctata* (Linnaeus) raramente são capazes de transferir espermátóforos em sucessivos acasalamentos. Além disso, os machos ingerem mais alimento após a transferência do espermátóforo, indicando que a transferência de espermátóforos esgota reservas nutricionais do sexo masculino e altera o seu comportamento pós-acasalamento. Em *C. septempunctata* e *C. transversal*, a diminuição dos efeitos sobre a fecundidade e fertilidade das fêmeas, foi atribuída não somente ao esgotamento do fluido seminal, mas também, ao decréscimo de sua qualidade com acasalamentos repetidos sequencialmente (Michaud *et al.* 2013).

Tendo em vista estes custos significativos incorridos por machos e fêmeas poligâmicos, a compreensão de como a seleção natural tem mantido um nível elevado da promiscuidade nestas espécies continua sendo um grande enigma no processo de reprodução. Assim, é importante estudar os aspectos relacionados com o número de acasalamentos entre indivíduos de uma espécie a fim de avaliar os custos e benefícios envolvidos.

### **“Trade-off” reprodução x sobrevivência**

O “trade-off”, ou balanço entre a sobrevivência e reprodução tem sido reconhecida como uma característica marcante em insetos, e está bem estabelecido que a reprodução reduz a expectativa de vida em muitas espécies (Stearns 1992). Em espécies promíscuas, múltiplos

acasalamentos podem tornar-se bastante custosos para machos e fêmeas, pois, múltiplas cópulas também podem resultar em uma menor longevidade do adulto, gerando assim um “trade-off” entre sobrevivência e reprodução (Thornhill & Alcock 1983).

Em fêmeas, a redução no tempo de vida pode ser causada pelos vários custos ecológicos ou fisiológicos do acasalamento, tais como os decorrentes do aumento da taxa de produção de ovos ou de toxicidade de substâncias acessórias da ejaculação, e ocorre principalmente em insectos sem alimentação nupcial (Arnqvist & Nilson 2000). Nos machos, a redução no tempo de vida se dá principalmente pelo gasto de energia no momento da corte e cópula propriamente dita como ocorre na mosca *Anastrepha suspensa* (Loew) (Diptera: Tephritidae). Ao produzir produtos químicos, e sinais acústicos e visuais para corte, foi possível observar uma redução significativa na longevidade dos machos (Pereira *et al.* 2010).

Perry & Tsé (2013) observaram que um único acasalamento reduz em até 53% a longevidade de machos de *A. bipunctata*. Isto pode ser atribuído ao aumento da utilização de recursos energéticos no acasalamento. Machos de *A. bipunctata*, por exemplo, podem transferir até 4% da massa corporal em ejaculado no momento da cópula ou pela demanda energética da cópula, que nessa espécie leva mais de duas horas de duração (Perry & Rowe 2010).

Além disso, lesões ocorridas no combate e competição para ganhar acesso às fêmeas, podem ocorrer e em casos extremos, a disputa pela fêmea pode levar a morte imediata de um dos machos competidores, como ocorre com espécies de *Melittobia* (Matthews *et al.* 2009). As fêmeas podem também conduzir a mortalidade dos machos no momento da cópula. Na espécie de grilo *Cyphoderris strepitans* (Gwynne) (Orthoptera: Prophalangopsidae), as fêmeas durante a cópula, se alimentam das asas posteriores e da hemolinfa que sobressai das feridas dos machos (Eggert & Sakaluk 1994) e em mantídeos, as fêmeas decapitam os machos no momento da cópula para alimentar-se da cabeça como aquisição de recursos nutricionais (Matthews *et al.* 2009).

Além dos custos incorridos com o processo de reprodução, outros fatores podem influenciar a longevidade de adultos reprodutores que podem refletir na reprodução destes, como por exemplo, a espécie de grilo *Teleogryllus commodus* (Walker) (Orthoptera: Gryllidae), a poliandria não influenciou o sucesso reprodutivo em número e fertilidade dos ovos. Entretanto, fêmeas poliândricas aumentam o desempenho reprodutivo precoce, devido à redução na longevidade (Hunt *et al.* 2006).

Condições ambientais também podem influenciar a reprodução precoce, como ocorre em *C. maculata* e *H. convergens* que habitam um ambiente fortemente sazonal. Nos períodos de inverno, a taxa de oviposição é precoce, para garantir alimento, e em número reduzido, para produção de descendentes mais robustos, garantindo assim, alimento para completar o desenvolvimento e oportunidades reprodutivas para a prole (Michaud *et al.* 2013).

Além disso, em condições adversas e com a pressão de copular com machos “desfavoráveis”, as fêmeas de *H. axyridis*, podem reter seus ovos por um maior período de tempo, garantindo maior longevidade para uma nova oportunidade de cópula, permitindo que as fêmeas substituíssem os espermatozoides para fecundação dos ovos de um macho mais “vantajoso” (Wang *et al.* 2009).

No geral, entre os Coccinellidae, a manipulação reprodutiva da fêmea pelos machos é frequentemente associada com os efeitos sobre o desempenho paterno da prole, incluindo a sobrevivência, taxa de desenvolvimento, e o tamanho final dos adultos (Omkar & Mishra 2010). Dessa forma, ao determinar os efeitos da poligamia em *T. notata*, poderá ser possível manipular o número máximo de casais e de cópulas a ser permitida em criações massais de laboratório, a fim de maximizar a produção deste inseto ao mesmo tempo em que se mantenham suas características ótimas de sobrevivência, reprodução e de predação após a liberação para o controle de cochonilhas em áreas infestadas. Nesse contexto, a espermateca é um órgão-alvo para estudos em

reprodução em insetos, uma vez que suas funções podem levar a um aumento da viabilidade espermática, e até mesmo a fecundidade, podendo ou não alterar o comportamento sexual das fêmeas.

### Literatura Citada

- Almeida, L.M. & C.S. Ribeiro-Costa. 2009.** Coleópteros predadores (Coccinellidae), p. 931-968. In A.R. Panizzi & J.R.P. Parra (eds.), Bioecologia e nutrição de insetos. Brasília, Embrapa, 1164p.
- Arnqvist, G. & T. Nilsson. 2000.** The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Anim. Behav.* 60: 145-164.
- Awad, M., P. Kalushkov, T. Nedvědová & O. Nedvěd. 2013.** Fecundity and fertility of ladybird beetle *Harmonia axyridis* after a prolonged cold storage. *Biol. Control* 58: 657-666.
- Barbosa, P.R.R., M.D. Oliveira, J.A. Giorgi, C.S.A. Silva-Torres & J.B. Torres. 2014a.** Predatory behavior and life history of *Tenuisvalvae notata* (Coleoptera: Coccinellidae) under variable prey availability conditions. *Fla. Entomol.* 97: 1026-1034.
- Barbosa, P.R.R., M.D. Oliveira, J.A. Giorgi, J.E.M. Oliveira & J.B. Torres. 2014b.** Suitability of two prey species for development, reproduction, and survival of *Tenuisvalvae notata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 107: 1102-1109.
- Bateman, A.J. 1948.** Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Heredity* 2: 349-368.
- Bayoumy, M.H. & J.P. Michaud. 2014.** Female fertility in *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) is maximized by polyandry, but reduced by continued male presence. *Eur. J. Entomol.* 4: 513-520.
- Blackman, R.L. 1987.** Reproduction, cytogenetics and development, p. 163-195. In A. Minks & K.P. Harrewijn (eds.), *Aphids: their biology, natural enemies and control*. Amsterdam, Elsevier, 441p.
- Brown, A.E., E.W. Riddick, J.R. Aldrich & W.E. Holmes. 2006.** Identification of (2)-beta-caryophyllene as a gender-specific terpene produced by the multicolored Asian lady beetle. *J. Chem. Ecol.* 32: 2489-2499.
- Burdfield-Steel, E.R., S. Auty & D.M. Shukera. 2015.** Do the benefits of polyandry scale with outbreeding? *Behav. Ecol.* 26: 1423-1431.

- Carvalho, C.F. & B. Souza. 2002.** Potencial de insetos predadores no controle biológico aplicado, p. 191-208. In J.R.P. Parra, P.S. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira & J.M.S. Bento (eds.), Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. São Paulo, Manole. 609p.
- Chapman, R.F., 2013.** The Insects: Structure and Function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Colares, F., J.P. Michaud, J.B. Torres, C.S.A. Silva-Torres. 2015.** Polyandry and male mating history affect the reproductive performance of *Eriopsis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 108: 736-742.
- Collins, A.M., V. Williams & J.D. Evans. 2004.** Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. Insect Mol. Biol. 13: 141-146.
- Craig, G.B. 1967.** Mosquitoes: female monogamy induced by male accessory gland substances. Science 156: 1499-501.
- Daly, M. 1978.** The cost of mating. Am. Nat. 112: 771-774.
- Debach, P. 1968.** Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas. México, Editora Continental, 927p.
- Dreyer, B.S., P. Neuenschwander, J. Baumgärtner & S. Dorn. 1997.** Trophic influences on survival, development and reproduction of *Hyperaspis notata* (Col., Coccinellidae). J. Appl. Entomol. 121: 249-256.
- Dunn, D.W., J.P. Sumner & D. Goulson. 2005.** The benefits of multiple mating to female seaweed flies, *Coelopa frigida* (Diptera: Coelpidae). Behav. Ecol. Sociobiol. 58: 128-135.
- Eggert, A.K. & S.K. Sakaluk. 1994.** Sexual cannibalism and its relation to male mating success in sagebrush crickets, *Cyphoderris strepitans* (Orthoptera: Haglidae). Anim. Behav. 47: 1171-1177.
- Fox, C.W. & C.M. Rauter. 2003.** Bet-hedging and the evolution of multiple mating. Evol. Ecol. Res. 5: 273-286.
- Gallot, A., C. Rispe, N. Leterme, J.P. Gauthier, S. Jaubert-Possamai & D. Tagu. 2010.** Cuticular proteins and seasonal photoperiodism in aphids. Insect. Biochem. Mol. Biol. 40: 235- 240.
- Gautam, S., A.K. Singh & R.D. Gautam. 2010.** Olfactory responses of green lacewing, *Chrysoperla* sp. (*carneagroup*) and *Malladades jardinsi* on mealybug, *Phenacoccus solenopsis* (Homoptera: Pseudococcidae) fed on cotton. Acta Entomol. 53: 497-507.
- Gerber, H.S. & E.C. Klostermeyer. 1970.** Sex control by bees: a voluntary act of egg fertilization during oviposition. Science 167: 82-84.

- Gullan, P.J. & M. Kosztarab. 1997.** Adaptations in scale insects. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 1-643.
- Gullan, P.J. & P.S. Craston. 2007.** Os insetos: um resumo de entomologia. São Paulo, Roca, 440p.
- Hagan, H.R. 1951.** Embryology of viviparous insects. New York, Ronald Press, 472p.
- Hagen, K.S., S. Bombosch & J.A. McMurtry. 1976.** The biology and impact of predators, p. 93–142. In C.B. Huffaker, & P.S. Messenger (eds.), *Theory and practice of biological control*. New York, Academic Press, 788p.
- Hemptinne, J.L., A.F.G. Dixon & J. Lognay. 1996.** Searching behaviour and mate recognition by males of the two-spot ladybird beetle, *Adalia bipunctata*. *Ecol. Entomol.* 21: 165-170.
- Hodek, I. & A. Honek. 2009.** Scale insects, mealybugs, whiteflies and psyllids (Hemiptera, Sternorrhyncha) as prey of ladybirds. *Biol. Control* 51: 232-243.
- Hunt, J., M.D. Jennions, N. Spyrou & R. Brooks. 2006.** Artificial selection on male longevity influences age-dependent reproductive effort in the Black field cricket *Teleogryllus commodus*. *Am. Nat.* 168: 72-86.
- Jiaqin, X., Z. Yuhong, W. Hongsheng, L. Ping, D. Congshuang, & P. Hong. 2014.** Effects of mating patterns on reproductive performance and offspring fitness in *Cryptolaemus montrouzieri*. *Entomol. Exp. Appl.* 153: 20-23.
- Kronauer, D.J., R.A. Johnson & J.J. Boomsma. 2007.** The evolution of multiple mating in army ants. *Evolution* 61: 413-422.
- Kusnetsov, V.N. 1997.** Lady beetles of the Russian Far East. Gainesville, Center of Systematic Entomology, 248p.
- Lay, M., D. Zissler & R. Hartmann. 1999.** Ultrastructural and functional aspects of the spermatheca of the African migratory locust *Locusta migratoria migratorioides* (Reiche and Fairmaire) (Orthoptera: Acrididae). *Int. J. Insect. Morphol. Embryol.* 28: 349-361.
- Liu, X.P., H.M. He, X.J. Kuang & F.S. Xue. 2010.** A comparison of female fitness between monogamy and polyandry in the cabbage beetle, *Colaphellus bowringi*. *Anim. Behav.* 79: 1391-1395.
- Lohr, B., A.M. Varela & B. Santos. 1990.** Explorations for natural enemies of the cassava mealybug *Phenacoccus manihoti* (Homoptera: Pseudococcidae), in South America for the biological control of this pest introduced in Africa. *Bull. Entomol. Res.* 80: 417-425.
- Majerus, M.E.N. 2009.** Ladybugs, p 547-551. In V.H. Resh & R.T. Cardé (eds.), *Encyclopedia of insects*. Waltham, Academic Press, 1132p.

- Majerus, T.M.O. & M.E.N. Majerus. 2012.** Male-killing in the Coccinellidae: testing the predictions. *Evol. Ecol.* 26: 207-225.
- Martins, G.F. & J.E. Serrão. 2002.** A comparative study of the spermatheca in bees (Hymenoptera: Apoidea). *Sociobiology* 40: 711-720.
- Marzo, L. 2008.** Biodiversita della spermateca nei Coleotteri. *Atti Accad. Nazi.* 56: 69-96.
- Matthews, R.W., J.M. Gonzalez, J.R. Matthews & L.D. Deyrup. 2009.** Biology of the Parasitoid *Melittobia* (Hymenoptera: Eulophidae). *Annu. Rev. Entomol.* 54: 251-266.
- McDonald, G.C. & T. Pizzari. 2016.** Why patterns of assortative mating are key to study sexual selection and how to measure them. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 70: 209-220.
- Meier, R., M. Kotrba & P. Ferrar. 1999.** Ovoviviparity and viviparity in the Diptera. *Biol. Rev.* 74: 199-258.
- Mensah, R.K. 2002.** Development of an integrated pest management programme for cotton. Part 1: Establishing and utilizing natural enemies. *Int. J. Pest Manage.* 48: 87-94.
- Michaud, J.P. 2004.** Natural mortality of Asian citrus psyllid (Homoptera: Psyllidae) in central Florida. *Biol. Control* 29: 260-269.
- Michaud, J.P., M. Bista, G. Mishra, O. Singh. 2013.** Sexual activity diminishes male virility in two Coccinellidae species: Consequences for female fertility and progeny development. *Bull. Entomol. Res.* 103: 570-577.
- Mirhosseini, M.A., J.P. Michaud, M.A. Jalali & M. Ziaaddini. 2014.** Paternal effects correlate with female reproductivestimulation in the polyandrous ladybird *Cheilomenes sexmaculata*. *Bull. Entomol. Res.* 104: 480-485.
- Moore, S.D. & V. Hattingh. 2004.** Augmentation of natural enemies for control of citrus pests in South Africa: a guide for growers. *South African Fruit* 3: 51-53.
- Mulsant, E. 1850.** Species des coleopteres trimeres securipalpes. *Ann. Sci. Physi. Nat. d' Agric. d'Indus.* 2, 1-1104.
- Murdoch, W.W. & A. Oaten. 1975.** Predation and population stability. *Adv. Ecol. Res.* 9: 1-131.
- Obata, S. 1988.** Mating refusal and its significance in females of the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. *Physiol. Entomol.* 13: 193-199.
- Obrycki, J.J., J.D. Harwood, T.J. Kring, R.J. O'Neil. 2009.** Aphidophagy by Coccinellidae: application of biological control in agroecosystems. *Biol. Control* 51: 244-254.



- Omkar, S.K. 2012.** Costs and benefits of reproduction in a predaceous ladybird: Effect of multiple matings on reproduction and offspring development. *J. Asia Pac. Entomol.* 15: 219-224.
- Omkar, S.K. & G. Mishra. 2010.** Multiple matings affect the reproductive performance of the aphidophagous ladybird beetle, *Coelophora saucia* (Coleoptera: Coccinellidae). *Eur. J. Entomol.* 107: 177-182.
- Omkar, S.K. & A. Pervez. 2000.** Predaceous coccinellids in India: Predator-prey catalogue. *Orient. Insects.* 38: 27-61.
- Parker, G.A. & T.R. Birkhead. 2013.** Polyandry: the history of a revolution. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 368: 01-13.
- Parra, J.R.P., P.S.M. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira & J.M.S. Bento. 2002.** Controle biológico: terminologia, p. 1-16. In J.R.P Parra, P.S.M. Botelho, B.S. Corrêa-Ferreira & J.M.S. Bento (eds.), *Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores*. São Paulo, Manole. 609p.
- Pascini, T. V. & G. F. Martins. 2016.** The insect spermatheca: an overview. *Zoology* 1-17.
- Pascini, T.V., J.M. Ramalho-Ortigao & G.F. Martins. 2012.** The fine structure of the spermatheca in *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 106: 857-867.
- Pereira, R., J. Sivinski, P. Teal & J. Brockmann. 2010.** Enhancing male sexual success in a lekking fly (*Anastrepha suspense* Diptera: Tephritidae) through a juvenile hormone analog has no effect on adult mortality. *J. Insect. Physiol.* 56: 1552-1557.
- Peronti, A.L.B.G., N.M. Martinelli, J.G. Alexandrino, A.L. Marsaro Júnior, A.M. Pentead-Dias & L.M. Almeida. 2016.** Natural enemies associated with *Maconellicoccus hirsutus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in the state of São Paulo, Brazil. *Fla. Entomol.* 99: 21-25.
- Perry, J.C. & L. Rowe. 2010.** Condition-dependent ejaculate size and composition in a ladybird beetle. *Proc. Biol. Sci.* 277: 3639-3647.
- Perry, J.C. & C.T. Tse. 2013.** Extreme costs of mating for male two-spot ladybird beetles. *Plos One* 8: 1-5.
- Porcar, M., I. García-Robles, L. Domínguez-Escribá & A. Latorre. 2010.** Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry3Aa endotoxins on predatory Coleoptera tested through artificial diet-incorporation bioassays. *Bull. Entomol. Res.* 100: 297-302.
- Putman, W.L. 1955.** Bionomics of *Stethorus punctillum* Weise (Coleoptera: Coccinellidae) in Ontario. *Can. Entomol.* 87: 09-33.

- Ram, P. & R.K. Saini. 2010.** Biological control of *solenopsis* mealybug, *Phenacoccus solenopsis* Tinsley on cotton: a typical example of fortuitous biological control. *J. Biol. Control* 24: 104-109.
- Sardell, R. J., P. Arcese, L. F. Keller & J. M. Reid. 2012.** Are there indirect fitness benefits of female extra-pair reproduction? Lifetime reproductive success of within-pair and extra-pair offspring. *Am. Nat.* 179: 779-793.
- Scharf, I., F. Peter & O. Martin. 2013.** Reproductive trade-offs and direct costs for males in arthropods. *Evol. Biol.* 40: 169-184.
- Shahid, M., A. Siddiqui, S.K. Omkar & G. Mishra. 2016.** Mating alters the rate of development of ovarioles in the ladybird, *Propylea dissecta* (Coleoptera: Coccinellidae). *Eur. J. Entomol.* 113: 44-50.
- Shuut, B., L. Stables, F. Aboagye-Antwi, J. Moran & F. Tripet. 2010.** Male accessory gland proteins induce female monogamy in anopheline mosquitoes. *Med. Vet. Entomol.* 24: 91-94.
- Simon, J.C., C. Rispe & P. Sunnucks. 2002.** Ecology and evolution of sex in aphids. *Trends Ecol. Evol.* 17: 34-39.
- Simmons, L.W. 2011.** Inbreeding depression in the competitive fertilization success of male crickets. *J. Evol. Biol.* 24: 415-421.
- Stearns, S.C. 1992.** The evolution of life histories. Oxford, Oxford University Press, 264p.
- Sullivan, D.J., J.A. Castillo & A.C. Bellotti. 1991.** Comparative biology of six species of coccinellid beetles (Coleoptera: Coccinellidae) predaceous on the mealybug, *Phenacoccus herreni* (Homoptera: Pseudococcidae), a pest on cassava in Colombia, South America. *Environ. Entomol.* 20: 685-689.
- Tanwar, R.K., P. Jeykumar & D. Monga. 2007.** Mealy bugs and their management. *Technical Bull.* 19: 16.
- Thornhill, R. & J. Alcock. 1983.** The evolution of insect mating systems. Massachusetts, Harvard University Press, 325p.
- Torres, J.B. & J.C. Zanuncio. 2001.** Effects of sequential mating by males on reproductive output of the stinkbug predator, *Podisus nigrispinus*. *Biol. Control* 46: 469-480.
- Torres-Vila, L.M. 2013.** Polyandry-fecundity relationship in insects: methodological and conceptual problems. *Evol. Biol.* 26: 325-334.
- Tregenza, T. & N. Wedell. 1998.** Benefits of multiple mates in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Evolution* 52: 1726-1730.

- Vantaux, A., O. Roux, A. Magro, & J. Orivel. 2012.** Evolutionary perspectives on myrmecophily in ladybirds. *Psyche* 7: 19-22.
- Voigt, C.C., R. Michener & T.H. Kunz. 2005.** The energetics of trading nuptial gifts for copulations in katydids. *Physiol. Biochem. Zool.* 78: 417-23.
- Waage, J.K. 1988.** Confusion over residency and the escalation of damselfly territorial disputes. *Anim. Behav.* 36: 586-595.
- Walters, J.R. & R.G. Harrison. 2008.** EST analysis of male accessory glands from *Heliconius butterflies* with divergent mating systems. *BMC Genomics* 9: 592-604.
- Wang, S., J.P. Michaud, R. Zhang, F. Zhang & S. Liu. 2009.** Seasonal cycles of assortative mating and reproductive behaviour in polymorphic populations of *Harmonia axyridis* in China. *Ecol. Entomol.* 34: 483-494.
- Whitcomb, W.H. 1981.** The use of predators in insect control, p. 105-123. In D. Pimentel (eds.), *Handbook of pest management in agriculture*. Boca Raton, CRC Press, 597p.
- Wood, D.M. 1987.** Tachinidae. *Manual of Nearctic Diptera*. Can. Monogr. 28: 1193–1269.
- Worthington, A.M., R.A. Jurenka & C.D. Kelly. 2015.** Mating for male-derived prostaglandin: a functional explanation for the increased fecundity of mated female crickets? *J. Exp. Biol.* 218: 2720-2727.

## CAPÍTULO 2

### INFLUÊNCIA DA IDADE E HISTÓRIA DE ACASALAMENTO SOBRE O DESEMPENHO REPRODUTIVO DE *Tenuisvalvae notata* (MULSANT) (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)<sup>1</sup>

AMANDA C. TÚLER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Fitossanidade – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

---

Túler, A.C. Influência da idade e história de acasalamento sobre o desempenho reprodutivo de *Tenuisvalvae notata* (Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae). A ser submetido.

RESUMO - Entre os Coccinellidae, a manipulação reprodutiva da fêmea pelos machos é frequentemente associada com os efeitos sobre o desempenho paterno da prole. A joaninha predadora *Tenuisvalvae notata* (Mulsant) apresenta sistema de acasalamento poligâmico e estes múltiplos acasalamentos podem implicar em custos e benefícios para a espécie, principalmente refletida pelo seu desempenho reprodutivo e sobrevivência uma vez que os fatores alomonais nos ejaculados dos machos são conhecidos por estimularem a fecundidade e a fertilidade das fêmeas. Neste estudo, avaliamos os efeitos de múltiplos acasalamentos e envelhecimento no desempenho reprodutivo de *T. notata*, quanto à escolha do parceiro, sucesso reprodutivo das fêmeas, sobrevivência de adultos, virilidade masculina e o desenvolvimento da prole. Uma série de experimentos foi conduzida, nos quais submetemos fêmeas jovens (5-10 dias de idade) e mais velhas (95-100 dias de idade) a um único acasalamento, ou acasalamentos múltiplos com machos iguais ou diferentes de vários estados de acasalamento (virgem ou previamente copulados). Entre os resultados encontrados, houve uma preferência dos casais em copular com parceiros já conhecidos. Além disso, fêmeas jovens tiveram maior fecundidade e longevidade quando copularam apenas uma vez em comparação com aqueles copulados múltiplas vezes. Não foram observados efeitos na fecundidade, fertilidade e desenvolvimento da descendência em relação ao número de acasalamentos do casal ou ao estado de acasalamento do macho, no entanto, a fecundidade e a fertilidade diminuíram ao longo do período de oviposição para todos os tratamentos avaliados.

PALAVRAS-CHAVE: Joaninha, poligamia, múltiplas cópulas, fitness

INFLUENCE OF AGE AND MATING HISTORY ON THE REPRODUCTIVE  
PERFORMANCE OF *Tenuisvalvae notata* (MULSANT) (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)

ABSTRACT - Among the Coccinellidae, female reproductive manipulation by males is frequently associated with paternal effects on offspring performance. The ladybeetle *Tenuisvalvae notata* (Mulsant) is promiscuous and multiples matings may confer costs and benefits to this species, especially on its fitness and survival, since allomonal factors in male ejaculates are known to stimulate female fecundity and fertility. In this study, we evaluated the effects of multiple matings and aging on the reproductive performance of *T. notata*, regarding partner choice, female reproductive success, adult survival, male virility and development of the offspring. We conducted a series of experiments, in which we subjected young (5-10 days old) and older females (95-100 days old) to either a single mate, or multiple matings with the same or different males of various mating status (virgin or previously mated). Among the results found, there was a preference of couples to mate with previously known partners. Additionally, younger females had higher fecundity and longer longevity when mated only once in comparison to those mated multiple times. No effects on fecundity, fertility and offspring development were observed between the treatments regarding couple's number of matings or male mating status, however, fecundity and fertility decreased throughout the oviposition period for all evaluated treatments.

KEY WORDS: Ladybird, polygamy, multiple mating, fitness

## Introdução

A evolução dos sistemas de acasalamentos em artrópodes tem despertado o interesse dos cientistas, desde a teoria de seleção sexual de Darwin, e a poligamia é um dos pontos mais polêmico e controverso (Thornhill & Alcock 1983, Arnqvist & Nilsson 2000). Contrariamente à monogamia, onde ocorre fidelidade entre os parceiros sexuais, na poligamia os parceiros são promíscuos e ocorre a cópula entre vários machos e fêmeas (Thornhill & Alcock 1983). A poligamia é comum entre os insetos, em especial em Coccinellidae (Majerus 1994, Haddrill *et al.* 2008, Omkar & Mishra 2010). De fato, em joaninhas a poligamia tem sido estudada desde a década de 70, e foi demonstrada pela primeira vez em *Adalia bipunctata* (Linnaeus) (Semyanov 1970). Desde então, foram estudados os possíveis efeitos da poligamia no desempenho reprodutivo de insetos, como fecundidade e fertilidade, aumento da longevidade (Colares *et al.* 2015) e um desenvolvimento mais rápido da progênie (Mirhosseini *et al.* 2014).

Baseado na teoria de que acasalamentos múltiplos são passíveis de ocorrer apenas quando os benefícios superam os custos para ambos os sexos (Thornhill & Alcock 1983), as respostas encontradas sobre o efeito da poliandria (uma fêmea copulada com múltiplos machos) não tem sido muito claras. Isso porque os custos associados à poligamia são altos e podem envolver risco de lesão ou aquisição de patógenos. Portanto, uma melhor compreensão de como a seleção natural tem moldado e mantido um alto nível de promiscuidade nos sistemas reprodutivos de insetos, ainda, é um enigma. É bem reconhecido que os ejaculados de insetos machos têm efeitos sobre as fêmeas, que podem incluir aceleração da taxa de oviposição, aumento da fecundidade e fertilidade e efeitos paternos (Gillott 2003, Avila *et al.* 2011, Chapman 2013). Neste contexto, alguns autores sugerem que o investimento dos machos em produtos espermáticos é muito alto, machos virgens e mais jovens podem ser capazes de aumentar o desempenho reprodutivo das fêmeas, quando comparados a machos mais velhos e previamente acasalados (Michaud *et al.* 2013, Jiaqin *et al.*

2014, Colares *et al.* 2015, McDonald & Pizzari 2016, Mirhosseini *et al.* 2014). Assim, as fêmeas poderiam estar propensas a reconhecer e escolher machos jovens e virgens para melhorar seu desempenho reprodutivo. Portanto, informações a cerca da reprodução em insetos poderiam ajudar-nos a ter uma melhor compreensão de seus sistemas de acasalamento e melhorar a criação de laboratório destes agentes biológicos. Além disso, estudos sobre o comportamento sexual dos besouros podem ajudar a identificar algum tipo de peculiaridade, como a presença de semioquímicos como feromônios, que podem melhorar no futuro a sua agregação em áreas de liberação (Aldrich *et al.* 1999, Chauhan *et al.* 2007, Aldrich & Zhang 2016, Fassotte *et al.* 2016).

Recentemente, a joaninha predadora *Tenuisvalvae notata* (Mulsant), foi encontrada no Semiárido de Pernambuco em plantas de algodoeiro, infestadas com as cochonilhas *Ferrisia dasyrillii* (Cockerell), e *Phenacoccus solenopsis* (Tinsley). Este predador também tem sido observado em plantas de palma forrageira infestadas com a falsa cochonilha do carmim, *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) (Barbosa *et al.* 2014a) e em plantas de *Hibiscus rosa-sinensis* (Linnaeus) predando a cochonilha rosada do hibisco, *Maconellicoccus hirsutus* (Green) (Peronti *et al.* 2016). Além disso, esta espécie de joaninha foi citada como um potencial predador de cochonilhas Pseudococcidae, alimentando-se de cochonilhas tanto na fase larval quanto adulta (Barbosa *et al.* 2014a).

Esta espécie é capaz de sobreviver até 60 semanas após a emergência a 25 °C e tem uma alta taxa de reprodução quando recebendo abundância de presa (Dreyer *et al.* 1997). Tal como com outras espécies de coccinélídeos, *T. notata* é uma espécie poligâmica, que pode ser um fator determinante na sua aptidão, uma vez que a fêmea acasalada uma única vez pode sofrer uma redução na aptidão ou ter diferenças na sobrevivência em comparação com aquelas que têm acesso a acasalamentos múltiplos, isto é, experimentando um “trade-off” entre reprodução e sobrevivência sob tais condições (Barbosa *et al.* 2014b, Bayoumy & Michaud 2014) em especial



ao longo da vida adulta que pode chegar a mais de 200 dias (Dreyer *et al.* 1997, Barbosa *et al.* 2014a).

Portanto, se considerarmos que os custos do fluido seminal são altos para os machos, especialmente para os machos mais velhos, a hipótese de que acasalamentos repetidos com o mesmo macho iriam esgotar sua virilidade, resultando em benefícios reprodutivos reduzidos para as fêmeas e, possivelmente, diminuindo os efeitos paternos na descendência. Assim, os objetivos deste estudo foram avaliar os efeitos do envelhecimento e de acasalamentos múltiplos entre machos e fêmeas de *T. notata*, sobre o comportamento sexual do adulto em relação à escolha do parceiro, sucesso reprodutivo das fêmeas, sobrevivência de adultos, virilidade masculina e o desenvolvimento da prole. Além disso, a hipótese de que, 1) como os adultos de *T. notata* são poligâmicos, não está claro a preferência de parceiros entre os casais, 2) o condicionamento físico das fêmeas seria beneficiado por múltiplos acasalamentos, especialmente com os machos jovens virgens, e 3) a capacidade dos machos de influenciar o sucesso reprodutivo das fêmeas e o desenvolvimento da prole, reduziria com acasalamentos múltiplos.

### **Material e Métodos**

**Presas.** A colônia da cochonilha *F. dasyrillii* é mantida no Laboratório de Comportamento de Insetos do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Estes espécimes foram alimentados com abóboras da variedade “Jacarezinho”, obtidas regularmente no mercado local e mantidas de acordo com a metodologia descrita por Sanches & Carvalho (2010).

Previamente à infestação com as cochonilhas, as abóboras foram lavadas com água e detergente neutro, e secas com papel toalha. Em seguida, as abóboras foram colocadas em bandejas plásticas de 29,0 x 41,5 x 7,3 cm (comprimento x altura x largura), revestidas com

toalhas de papel e infestadas na região do pecíolo com fêmeas reprodutoras. À medida que a abóbora se torna totalmente encoberta pelas cochonilhas, esta servirá de reservatório para a infestação de outras abóboras sadias. Nas condições de manutenção desta criação: temperatura de 25 °C, umidade relativa de  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12h: 12h (L: D), o período decorrido da infestação à completa colonização da abóbora com cochonilhas adultas é de aproximadamente 30 dias, quando então as cochonilhas são utilizadas na criação da joaninha predadora.

**Predador.** Adultos de *T. notata* foram coletados em setembro de 2010 em plantas de algodoeiro infestadas por *P. solenopsis* e *F. dasyrillii* no município de Surubim, PE (07°49'59" S, 35°45'17" O). No laboratório, *T. notata* foi mantido sob as mesmas condições ambientais que a colônia da presa. Para manutenção da colônia, os adultos de *T. notata* foram confinados em caixas de acrílico de 40 x 25 x 20 cm (comprimento x altura x largura), contendo aberturas laterais de 10 cm de diâmetro, cobertas com uma malha de nylon de 2 mm para permitir a ventilação das gaiolas. Cada gaiola foi forrada com papel toalha e recebeu uma abóbora infestada com a cochonilha *F. dasyrillii* em diferentes estádios de desenvolvimento, servindo como alimento para as joaninhas de acordo com Barbosa *et al.* (2014a).

Para garantir que utilizamos machos virgens em nossos bioensaios, quando necessário, as pupas de *T. notata* foram individualizadas em placas de acrílico (3,5 cm de diâmetro) e observadas diariamente para emergência de adultos. Depois disso, os adultos foram sexados com base em diferenças morfológicas, nas quais as fêmeas são maiores e apresentam duas manchas pretas na parte superior da cabeça, entre os olhos e tem a porção final do adome com formato afunilado. Já os machos possuem uma mancha branca na porção marginal do mesoesterno e abdome mais arredondado (Mulsant 1850, Barbosa *et al.* 2014a).

**Escolha do Parceiro Sexual em *Tenuisvalvae notata*.** Este experimento foi conduzido para testar a capacidade de adultos de *T. notata*, de reconhecer e escolher entre parceiros sexuais, com base

em seu *status* de acasalamento de encontros anteriores. Inicialmente, um macho e uma fêmea virgen e sexualmente maduros (> 5 dias de idade), foi colocado em placas de acrílico (3,5 cm de diâmetro) e permaneceu até que houvesse a primeira cópula dentro de 12 horas de fotofase. Casais que não copularam durante este período, foram excluídos do experimento, e casais que acasalaram, foram individualizados logo após a cópula em placas de acrílico de mesmo diâmetro e receberam alimento em abundância. Realizou-se um total de 60 repetições (casais). No dia seguinte ao primeiro acasalamento, os adultos foram marcados nos élitros com tinta atóxica, de forma que machos e fêmeas já acasalados pudessem ser diferenciados de adultos virgens. Então, a preferência pelo parceiro sexual, seja macho ou fêmea, foi testada. Portanto, para cada fêmea copulada (n = 30), foram oferecidos dois machos simultaneamente sendo: i) um macho novo virgem e um macho previamente conhecido (que ela tinha acasalado no dia anterior). Além disso, para cada macho copulado (n = 30), foram oferecidas simultaneamente duas fêmeas sendo: i) uma fêmea nova virgem e uma fêmea anteriormente conhecida. O período de observação de cópulas foi de 12 horas, iniciando às 07:00h e terminando às 19:00h.

**Efeito da Idade do Adulto no Número de Cópulas e Desempenho Reprodutivo de *Tenuisvalvae notata*.** Este experimento foi desenvolvido para testar os efeitos da idade do adulto e da frequência de acasalamento na aptidão e sobrevivência de *T. notata*. Assim, os casais foram formados de acordo com os seguintes tratamentos: i) machos e fêmeas virgens (5-10 dias de idade), permitidos copular apenas uma vez; ii) machos e fêmeas virgens (5-10 dias de idade), permitidos copular múltiplas vezes; iii) machos e fêmeas virgens (95-100 dias de idade), permitidos copular apenas uma vez; e iv) machos e fêmeas virgens (95-100 dias de idade), permitidos copular múltiplas vezes. Os casais foram acondicionados em placas de acrílico (3,5 cm de diâmetro) e as cópulas foram observadas por um período contínuo de 12 horas, iniciando às 7:00h até as 19:00h, uma vez que estes insetos são ativos durante a fotofase (Silva-Torres *et al.*

2014). Cada tratamento continha 20 repetições (casais). Foi determinado o tempo decorrido até a primeira cópula em todos os tratamentos e o número médio de cópulas durante o período de observação de 12 horas. Após o acasalamento de acordo com seus respectivos tratamentos, machos e as fêmeas foram individualizados em placas de acrílico do mesmo diâmetro e alimentados em abundância. O número de ovos depositados diariamente por cada fêmea e a viabilidade desses ovos, foi determinado ao longo de 60 dias consecutivos, bem como a sobrevivência até a morte de todos os adultos após o acasalamento.

**Poligamia e Reprodução de *Tenuisvalvae notata*.** Os testes a seguir foram delineados para investigar as contribuições relativas da frequência de acasalamento das fêmeas, da novidade do macho, e do *status* de acasalamento do macho (atividade sexual), sobre o ganho reprodutivo das fêmeas e virilidade dos machos, conforme determinado pela aptidão das fêmeas e desenvolvimento da prole. Os adultos usados neste teste tinham entre 5 a 10 dias de idade.

**Teste 1-** Quatro diferentes tratamentos de cópula (n=10 fêmeas por tratamento) foram estabelecidos: i) Cada fêmea virgem foi permitida acasalar apenas uma vez, com um macho virgem de mesma idade no primeiro dia do experimento; ii) Cada fêmea foi permitida acasalar apenas uma vez por dia, com o mesmo macho por 10 acasalamentos consecutivos, com intervalo de cinco dias entre acasalamentos; iii) Cada fêmea foi permitida acasalar por dez acasalamentos consecutivos em intervalos de cinco dias entre acasalamentos, mas neste caso foi oferecido um macho virgem a cada acasalamento; e iv) Cada fêmea foi permitida acasalar por dez acasalamentos consecutivos, em intervalos de cinco dias entre acasalamentos, com um macho previamente copulado e diferente a cada cópula (machos deste tratamento foram mantidos isolados após cada cópula com uma fêmea diferente, sem relação para cada acasalamento).

Os casais foram acondicionados em placas de acrílico (3,5 cm de diâmetro) e observados até o término da cópula. Posteriormente, machos e fêmeas foram separados e as fêmeas

acompanhadas diariamente com alimentação em abundância por um período de até 60 dias após a última cópula. Foi observado o número de ovos por dia e a fertilidade destes ovos por fêmea em cada tratamento.

**Teste 2-** Com base em nossas experiências anteriores, podemos determinar o número médio de cópulas por dia em casais de *T. notata*. Assim, levamos isso em conta para permitir que fêmeas virgens acasalassem com machos de diferentes histórias de acasalamento, como segue: i) machos virgens; ii) machos acasalados uma vez; iii) machos acasalados duas vezes; e iv) machos acasalados três vezes. Foi conduzido um número mínimo de 10 repetições (casais) por tratamento. A duração da cópula foi anotada e, posteriormente a cada cópula (separação dos casais), a fêmea foi substituída por outra fêmea virgem para obter o número mínimo de cópulas para os machos dos respectivos tratamentos. Fêmeas acasaladas foram separadas e individualizadas em placas de acrílico (3,5 cm de diâmetro), monitoradas diariamente e com alimentação em abundância por um período de 60 dias após a cópula. O número de ovos depositados por cada fêmea diariamente, e a fertilidade dos ovos foram determinadas. Para avaliar os efeitos paternos no desenvolvimento da descendência, 10 ovos de cada tratamento foram individualizadas e monitoradas diariamente com alimentação em abundância até a pupação. A sobrevivência do período imaturo e a duração do desenvolvimento foram registradas para as fases de ovo, larva e pupa. Após a emergência, os adultos foram mortos por congelamento a -10 °C, sexados com auxílio de um estereomicroscópio (OPTON–NTB 3A), secos em estufa a 50° C durante 48 horas e pesados em balança analítica de precisão (MARCONI AL 500C; 0,0001g).

**Análises Estatísticas.** As escolhas dos parceiros sexuais de machos e fêmeas foram analisadas através do teste de Wilcoxon,  $\alpha = 0,05\%$  (PROC NPAR1WAY, SAS Institute 2001). Enquanto o tempo decorrido para a cópula, no primeiro e segundo acasalamento, foi comparado através do teste de T de Student,  $\alpha = 0,05\%$  (PROC T TEST, SAS Institute 2001). O número médio de

cópulas e os parâmetros de desenvolvimento dos descendentes foram transformados em raiz quadrada ( $x + 0,5$ ) para atender às premissas de normalidade e homogeneidade de variância (ANOVA) e as médias foram separadas usando o teste de Tukey HSD,  $\alpha = 0,05\%$ . O intervalo de cópulas realizado durante a fotofase, a oviposição e a fertilidade ao longo dos 60 dias de observação (oviposição e fertilidade média, definido em intervalos de 10 dias), para cada tratamento, foram analisados por ANOVA, considerando intervalos como medidas repetidas no tempo (PROC GLM, SAS Institute 2001). As curvas de sobrevivência dos adultos submetidos a diferentes acasalamentos foram determinadas pelo estimador de Kaplan-Meier (Klein & Moeschberger 2003) e comparadas pelo teste de Log-Rank (Proc LIFTEST, SAS Institute 2001).

## Resultados

**Escolha do Parceiro Sexual em *Tenuisvalvae notata*.** Tanto as fêmeas quanto os machos de *T. notata*, mostraram uma preferência para acasalar com um parceiro sexual previamente conhecido, que haviam copulado no dia anterior (Fêmea:  $Z= 2,55$ ;  $P= 0,0107$ ; Macho:  $Z= 3,06$ ;  $P= 0,0022$ ) (Fig. 1). Além disso, houve diferença significativa no tempo decorrido para o início da primeira e segunda cópula, para ambos os sexos (Tabela 1).

**Efeito da Idade do Adulto no Número de Cópulas e Desempenho Reprodutivo de *Tenuisvalvae notata*.** Não houve diferença no número médio de cópulas por dia entre casais jovens (05 -10 dias) e velhos (95 – 100 dias) ( $F_1= 1,14$ ,  $P= 0,29$ ) com média de 2,24 cópulas por dia, independente da idade dos casais. Da mesma forma, não houve diferença no intervalo de tempo entre cópulas ( $F_1= 0,06$ ;  $P= 0,82$ ) com média de 28,77 minutos entre uma cópula e outra. Entretanto, houve uma correlação positiva entre o intervalo de tempo e o número de cópulas, com intervalos de tempo crescentes entre cópulas ao longo do dia ( $F_7= 11,39$ ;  $P= 0,0024$ ) (Fig. 2).

Comparando-se o efeito da idade sobre o desempenho reprodutivo de *T. notata*, as fêmeas mais jovens (5-10 dias de idade) tiveram um aumento significativo na fecundidade nos primeiros 10 dias de oviposição em comparação com fêmeas mais velhas (95-100 dias de idade) (Wilks' lambda = 0,51;  $F_{GLnum/den = 5/15} = 3,86$ ;  $P = 0,003$ ) (Fig. 3A) bem como para fertilidade (Wilks' lambda = 0,68;  $F_{GLnum/den = 5/15} = 1,39$ ;  $P = 0,02$ ) nos primeiros 20 dias de oviposição (intervalo de tempo 01-10 dias ( $F_3 = 4,66$ ;  $P = 0,04$ ) e 11-20 dias ( $F_3 = 6,21$ ;  $P = 0,02$ ) (Fig. 3B). Além disso, comparando o número de cópulas por fêmea (um ou múltiplos), não houve efeito na fecundidade das fêmeas (Wilks' lambda = 0,24;  $F_{GLnum/den = 5/15} = 3,10$ ;  $P = 0,12$ ) (Fig. 3C) e fertilidade (Wilks' lambda = 0,35;  $F_{GLnum/den = 5/15} = 1,82$ ;  $P = 0,26$ ) (Fig. 3D).

Por outro lado, houve um efeito significativo da idade das fêmeas adultas e do número de cópulas na sua sobrevivência ( $\chi^2_3 = 100,69$ ;  $P < 0,001$ ) (Fig. 4A). As fêmeas jovens quando copularam apenas uma vez, viveram por cerca de 180 dias, enquanto as fêmeas jovens acasaladas várias vezes viveram apenas por 100 dias. O mesmo foi observado para as fêmeas mais velhas, em que, aquelas que se acasalaram uma vez viveram mais tempo do que aquelas acasaladas múltiplas vezes. Não houve efeito da idade e do número de acasalamentos na sobrevivência dos machos ( $\chi^2_3 = 5,28$ ;  $P = 0,15$ ) (Fig. 4B).

### **Poligamia e Reprodução de *Tenuisvalvae notata*.**

**Teste 1** – Houve diferença na fecundidade das fêmeas de acordo com as diferentes histórias de acasalamento dos machos (Wilks' lambda = 0,37;  $F_{GLnum/den = 15/63} = 1,83$ ;  $P = 0,04$ ). Entretanto, ocorreu apenas nos primeiros 10 dias de oviposição ( $F_3 = 4,88$ ,  $P = 0,007$ ). Este efeito não foi observado para a fertilidade, independentemente da história de acasalamento do macho (Wilks' lambda = 0,47;  $F_{GLnum/den = 15/63} = 1,31$ ;  $P = 0,22$ ). Por outro lado, tanto a fecundidade como a fertilidade diminuíram significativamente e de forma semelhante entre os tratamentos ao longo do período de oviposição (Fecundidade: Wilks' lambda = 0,25;  $F_{GLnum/den = 5/23} = 13,32$ ;  $P = 0,0001$ ;

Fertilidade: Wilks' lambda = 0,24;  $F_{GLnum/den = 5/23} = 14,0$ ;  $P = 0,0001$ ) (Fig. 5). Além disso, as fêmeas que copularam uma ou 10 vezes com o mesmo macho, tiveram uma fecundidade maior nos primeiros cinco dias de oviposição do que qualquer outra combinação macho-fêmea (Fig. 5A).

**Teste 2** – Não houve efeito significativo na fecundidade (Wilks' lambda = 0,58;  $F_{GLnum/den = 15/63} = 0,92$ ;  $P = 0,54$ ) e fertilidade (Wilks' lambda = 0,49;  $F_{GLnum/den = 15/63} = 1,24$ ;  $P = 0,26$ ) de fêmeas que copularam com machos de diferentes histórias de acasalamento. Similarmente ao teste 1, a fecundidade e a fertilidade diminuíram ao longo do período de oviposição (Fecundidade: Wilks' lambda = 0,17;  $F_{GLnum/den = 5/23} = 21,65$ ;  $P = 0,0001$ ; Fertilidade: Wilks' lambda = 1,18;  $F_{GLnum/den = 5/23} = 20,50$ ;  $P = 0,0001$ ) (Fig. 6).

Além disso, a história de acasalamento dos machos influenciou a maioria dos parâmetros de desenvolvimento da descendência (Tabela 2). O período de incubação dos ovos foi significativamente maior para aqueles provenientes de fêmeas acasaladas com machos de até três cópulas (2,86 dias), em comparação com ovos depositados por fêmeas acasaladas com machos virgens ou com uma ou duas cópulas prévias. O tempo de desenvolvimento larval foi maior para descendentes de machos com uma cópula (3,75 dias) ou duas cópulas (3,70 dias). Não houve efeito da história de acasalamento dos machos no desenvolvimento pupal e tempo médio de cópula ( $F_3 = 0,42$ ;  $P = 0,73$ ), que durou cerca de 68,82 segundos, bem como na razão sexual que se manteve 1:1 em todos os tratamentos. Em contraste, houve um efeito significativo da história de acasalamento dos machos sobre o peso dos descendentes ao emergir. As fêmeas descendentes foram mais pesadas quando se originaram de acasalamentos com machos virgens, enquanto que os machos descendentes foram mais pesados quando se originaram de acasalamentos com machos três vezes copulados (Tabela 2).



## Discussão

Inicialmente, é interessante observar que a escolha do parceiro sexual em *T. notata* apresenta certa preferência por parceiros previamente conhecidos, independente do sexo. De fato, não esperávamos nenhuma preferência, pois *T. notata* é polígama, e se houvesse algum tipo de preferência, seriam para parceiros virgens, por causa dos custos envolvidos na produção de fluido seminal, o que pode incluir não somente esperma, mas também algum componente que pode afetar a aptidão das fêmeas. Assim, cópulas repetidas com o mesmo parceiro, poderiam causar uma redução na fecundidade e/ou fertilidade dos ovos pelo esgotamento do esperma e menor variabilidade genética dos descendentes. Desta forma, os machos virgens encorajariam ou seriam mais atraentes para as fêmeas do que aqueles previamente acasalados. Seria esperado que machos virgens tivessem maior contribuição na fecundidade e a fertilidade dos ovos, ajudar um desenvolvimento mais rápido da progênie, aumentar a sobrevivência e a variabilidade genética da descendência em comparação com machos de joaninhas previamente acasalados (Perry & Rowe 2010, Michaud *et al.* 2013).

Nossos resultados sobre a escolha do parceiro sugerem que *T. notata*, embora seja uma espécie poligâmica como em outros coccinélideos, os adultos podem ser capazes de preferir parceiros sexuais e manter algum tipo de fidelidade em uma situação de livre escolha, um traço comum de espécies monogâmicas. É possível que algum tipo de semioquímico (feromônio de marcação ou hidrocarbonetos cuticulares) possa estar envolvido no reconhecimento entre parceiros sexuais, uma vez que os machos de *T. notata* ao término da cópula, executam um comportamento de giro sobre o dorso da fêmea, o que é bastante peculiar e sugere que algum tipo de marcação química é efetuado ao término da cópula. Outros estudos realizados para esta espécie verificaram a existência de marcadores químicos em rastros de machos de *T. notata* mostrando

um componente diferencial, um composto nitrogenado até agora não completamente elucidado (Santos *et al.* 2016).

Esse composto pode estar envolvido no reconhecimento entre os parceiros nesse processo de cópulas sucessivas. Em outras espécies de coccinelídeos, como *Coccinella septempunctata* (Linnaeus), *Coccinella transversalis* (Fabricius), *Cheilomenes sexmaculata* (Fabricius) e *Propylea dissecta* (Mulsant), ocorre uma diferença na quantidade de *n*-heptacosano e *n*-nonacosano, compostos hidrocarbonetos presentes nos élitros de machos e fêmeas, sugerindo que estes são utilizados para reconhecimento do sexo oposto nestas espécies (Pattanayak *et al.* 2014).

O sucesso reprodutivo das fêmeas poderia ser beneficiado por acasalamentos múltiplos, especialmente com machos jovens e virgens. Entretanto, encontramos que quando as fêmeas copularam apenas uma vez ou, com o mesmo macho em intervalos de cinco dias entre os acasalamentos, há um aumento na fecundidade pelo menos nos primeiros dias de oviposição em comparação com acasalamentos múltiplos com parceiros diferentes, virgens ou anteriormente acasalados.

Estes resultados sugerem que, para *T. notata*, os custos adicionais associados à procura de um novo parceiro podem ser caros e arriscados, uma vez que *T. notata* tem um comportamento sexual elaborado e são as fêmeas que conduzem os machos para cópula (Santos *et al.* 2016). Além disso, existem riscos associados a lesões e doenças transmitidas, que poderiam reduzir os benefícios potenciais associados à descoberta de um novo parceiro sexual (Dunn *et al.* 2005, Gay *et al.* 2010).

Quanto ao efeito da idade adulta sobre a aptidão de *T. notata*, era suposto que o envelhecimento até certo ponto, pelo menos para adultos com cerca de 100 dias de idade, não fosse um fator preponderante no seu comportamento sexual e reprodução, pois os adultos dessa espécie tem uma expressiva longevidade, podendo viver mais de 450 dias sob condições

alimentares e ambientais adequadas (Dreyer *et al.* 1997). Portanto, em colônias com gerações sobrepostas de adultos, os acasalamentos podem ocorrer entre insetos de diferentes idades ao longo da vida adulta.

De fato, os nossos resultados corroboram com essa hipótese, pois observamos que a idade dos casais, não interferiu na capacidade desses em iniciar e completar a cópula, nem no intervalo entre cópulas, demonstrando que em ambos os casos, machos e fêmeas mantiveram a mesma vontade intensidade de cópula independente da senescência, como também demonstrado para *P. dissecta* (Pervez *et al.* 2004). Por outro lado, a idade dos adultos teve um efeito significativo na fecundidade e na fertilidade nos primeiros dias de oviposição, sendo este efeito estabilizado no final do período de observação de 60 dias após o acasalamento.

Fêmeas consideradas jovens (5-10 dias de idade) depositaram maior proporção de ovos férteis do que fêmeas consideradas mais velhas (95-100 dias de idade), quando acasaladas com machos do mesmo grupo etário respectivamente. Isto porque a virilidade dos adultos declina com a idade devida à senescência celular natural (Omkar & Mishra 2010). Entretanto, Mirhosseini *et al.* (2014) alertaram que isso só pode ocorrer quando os machos são impedidos de acasalar, mantendo celibato antes do início do período reprodutivo. Fato observado nos nossos estudos, pois os machos foram mantidos virgens até atingirem a idade certa para o acasalamento. De fato, quando machos copularam múltiplas vezes ao longo do tempo esta diferença vai desaparecendo.

Quanto aos efeitos de múltiplas cópulas na sobrevivência das fêmeas, esperava-se que fêmeas poliândricas fossem mais longevas do que fêmeas copuladas apenas uma vez, devido à maior aquisição de benefícios nutricionais via fluido seminal obtido por múltiplas cópulas. Em algumas espécies de insetos podem traduzir-se em espermatóforos ou presentes nupciais, oferecido pelos machos durante a corte ou cópula propriamente dita (Michaud *et al.* 2013, Jiaqin *et al.* 2014, Colares *et al.* 2015). Entretanto, nossos resultados mostraram que para *T. notata* isso

não ocorre. Possivelmente, primeiro porque os machos *T. notata* não oferecem qualquer tipo de espermatóforo ou presente nupcial além de fluido seminal, e segundo porque as fêmeas podem ter uma capacidade limitada de armazenamento na espermateca, não permitindo que material extra, seja armazenado. Ao mesmo tempo, essa limitação morfológica impõe uma competição espermática, um fato que já está sob investigação. Resultados semelhantes foram encontrados para fêmeas de besouros *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae) que tiveram inferior sucesso reprodutivo e longevidade quando copuladas com até três machos, comparado a fêmeas monandricas (Hollander & Gwynne 2009), bem como fêmeas de moscas *Drosophila melanogaster* (Loew) (Diptera: Drosophilidae), acasaladas uma única vez, sobreviveram por mais tempo comparado a fêmeas poliandricas (Dowling *et al.* 2014).

É conhecido que nos insetos há um “trade-off” entre reprodução e sobrevivência. Aqueles indivíduos que investem mais em reprodução geralmente tem uma redução na longevidade (Thornhill & Alcock 1983, Mirhosseini *et al.* 2014), pois há um alto custo energético para investir igualmente em ambas atividades. Além disso, espera-se que com um aumento no período de oviposição da espécie, como nos insetos sinovigênicos (ex. Parasitoides), a longevidade também seria maior, pois estes insetos não concentram sua reprodução nos primeiros dias após a emergência. Em *T. notata*, podemos observar que os adultos possuem longa fase adulta e as fêmeas após uma única cópula continuam depositando ovos férteis por um período de até 60 dias. Dessa forma, as fêmeas de *T. notata* devem investir também na sua longevidade para garantir a reprodução. Notavelmente, o custo relativo sobrevivência/reprodução, é refletido apenas nas fêmeas, pois a sobrevivência dos machos não sofreu influência por nenhum dos tratamentos, ao passo que a sobrevivência das fêmeas está intimamente relacionada ao número de cópulas realizadas.

Independente da idade das fêmeas, o número de cópulas foi o fator que mais afetou sua sobrevivência, o qual foi reduzido aproximadamente pela metade para aquelas que realizaram múltiplas cópulas e, ainda mais para as fêmeas mais velhas. Nas fêmeas, a redução no tempo de vida pode ser causada pelos vários custos ecológicos ou fisiológicos do acasalamento, tais como de toxicidade de substâncias presentes nos ejaculados, que ocorrem principalmente em insetos sem alimentação nupcial (Arnqvist & Nilson 2000), ou, o aumento da taxa metabólica e estresse oxidativo, ocasionados pelo gasto energético no momento da corte/cópula, que por sua vez, são responsáveis pelo rápido envelhecimento (Monaghan *et al.* 2008, Dowling *et al.* 2014).

Ao contrário do esperado, devido ao custo energético associado à poligamia, os machos de *T. notata* não apresentaram nenhum declínio na longevidade após múltiplas cópulas. Resultados semelhantes foram encontrados para outras espécies como *C. sexmaculata* (Omkar & Mishra 2010) e *P. dissecta* (Mishra & Omkar 2006). Esse resultado pode estar relacionado com a capacidade de reposição de material seminal entre cópulas, que precisa ser futuramente investigado, e também, porque a duração de cada cópula é muito curta, (média de 84 segundos) e as fêmeas são as que cortejam os machos (Santos *et al.* 2016). A atividade pré-cópula das fêmeas pode reduzir os custos energéticos associados ao comportamento sexual dos machos, e por isso, não se refletiria de forma significativa na redução da sobrevivência dos machos.

O *status* de acasalamento dos machos, não condicionou efeitos na fecundidade e/ou fertilidade dos ovos em todos os tratamentos. Assim, podemos sugerir que os machos transferem uma quantidade semelhante de esperma por cópula, mantendo-se uma, duas ou três cópulas, baseado no número médio de cópulas diário (2,83), mantendo o mesmo tempo de duração da cópula. Uma hipótese seria que as fêmeas por possuírem limitações quanto ao tamanho da espermateca, acumularia uma quantidade máxima de material seminal, independente do número de cópulas por dia e, assim, não seria observado um efeito significativo na sua reprodução com

um maior número de cópulas diárias e que deve ser mais bem detalhado. Outra hipótese está associada precedência espermática. Quando "o último macho é o primeiro a sair", assim, o último macho a copular, poderia de alguma forma retirar ou inviabilizar o material seminal depositado na espermateca durante a primeira cópula para assegurar a paternidade da descendência (Hotzy *et al.* 2012, Chaudhary *et al.* 2016).

Alternativamente, os machos incapazes de prevenir um próximo parceiro das fêmeas, estes podem usar alomônios para induzir a oviposição em um esforço para compensar a diluição de sua paternidade ao longo do tempo, (Colares *et al.* 2015). Assim, o desempenho reprodutivo das fêmeas de *T. notata* não seria alterado por múltiplas cópulas ou pela história de acasalamento dos machos.

Em relação ao desenvolvimento dos descendentes, os resultados foram de alguma forma contrastante entre os tratamentos e não consistentes. Esperávamos haver efeito negativo nos parâmetros de desenvolvimento para descendentes de machos acasalados múltiplas vezes em comparação com machos virgens. Em outros estudos envolvendo as joaninhas *C. montrouzieri* e *Eriops connexa* (Germar), não houve efeitos da história de acasalamento dos machos nos parâmetros de desenvolvimento da progênie (Kaufmann 1996, Colares *et al.* 2015). Como sugerido por outros autores, o desenvolvimento pós-fecundação pode ser influenciado por diversos fatores genéticos e hormonais, não diretamente ligados ao sistema de acasalamento destes (Gillott 2003, Avila *et al.* 2011, Mirhosseini *et al.* 2014, Colares *et al.* 2015).

Por fim, podemos sugerir que a espécie poligâmica *T. notata*, pode ser monogâmica se for dada uma chance, escolhendo acasalar com o mesmo parceiro previamente conhecido, porque a poligamia tem custos para a aptidão de fêmeas polígamas. A sobrevivência de fêmeas acasalando múltiplas vezes é drasticamente reduzida, e o ganho reprodutivo de casais monogâmicos não diferiu dos polígamos. Espera-se que a poligamia seja mantida nessa espécie porque eles são

naturalmente de longa duração e para aumentar ganho em material genético (Thornhill & Alcock 1983). Isto assegura a produção de uma progênie geneticamente diversificada e mais segura contra a perda de condicionamento físico que iria resultar a partir de um único acasalamento com um macho de baixa qualidade ou estéril (Fox & Rauter 2003).

### **Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de mestrado.

### **Literatura Citada**

- Aldrich, J.R., J.E. Oliver, T. Taghizadeh, J.T.B. Ferreira & D. Liewehr. 1999.** Pheromones and colonization: reassessment of the milkweed bug migration model (Heteroptera: Lygaeidae: Lygaeinae). *Chemoecology* 9: 63-71.
- Aldrich, J.R. & Q.H. Zhang. 2016.** Chemical ecology of neuroptera. *Annu. Rev. Entomol.* 61: 197-218.
- Arnqvist, G. & T. Nilsson. 2000:** The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Anim. Behav.* 60: 145-164.
- Avila, F.W., L.K. Sirot, B.A. LaFlamme, C.D. Rubinstein & M.F. Wolfner. 2011.** Insect seminal fluid proteins: identification and function. *Annu. Rev. Entomol.* 56: 21-40.
- Barbosa, P.R.R., M.D. Oliveira, J.A. Giorgi, C.S.A. Silva-Torres & J.B. Torres. 2014a.** Predatory behavior and life history of *Tenuisvalvae notata* (Coleoptera: Coccinellidae) under variable prey availability conditions. *Fla. Entomol.* 97: 1026-1034.
- Barbosa, P.R.R., M.D. Oliveira, J.A. Giorgi, J.E.M. Oliveira & J.B. Torres 2014b.** Suitability of two prey species for development, reproduction, and survival of *Tenuisvalvae notata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 107: 1102-1109.
- Bayoumy, M.H. & J.P. Michaud. 2014.** Female fertility in *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) is maximized by polyandry, but reduced by continued male presence. *Eur. J. Entomol.* 4: 513-520.
- Chaudhary, D.D., G. Mishra & S.K. Omkar. 2016.** Last male wins the egg fertilization fight: A case study in ladybird, *Menochilus sexmaculatus*. *Behav. Processes* 131: 01-8.

- Chapman, R.F., 2013.** The Insects: structure and function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Chauhan, K.R., V. Levi, Q.H. Zhang & J.R. Aldrich. 2007.** Female goldeneyed lacewings (Neuroptera: Chrysopidae: *Chrysopa oculata*) approach but seldom enter traps baited with the male-produced compound, iridodial. J. Econ. Entomol. 100: 1751-55.
- Colares, F., J.P. Michaud, J.B. Torres & C.S.A. Silva-Torres. 2015.** Polyandry and male mating history affect the reproductive performance of *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 108: 736-742.
- Dowling, D.K., B.R. Williams & F. Garcia-Gonzalez. 2014.** Maternal sexual interactions affect offspring survival and ageing. J. Evol. Biol. 27: 88-97.
- Dreyer, B.S., P. Neuenschwander, J. Baumgärtner & S. Dorn. 1997.** Trophic influences on survival, development and reproduction of *Hyperaspis notata* (Col., Coccinellidae). J. Appl. Entomol. 121: 249-256.
- Dunn, D.W., J.P. Sumner & D. Goulson. 2005.** The benefits of multiple mating to female seaweed flies, *Coelopa frigida* (Diptera: Coelpidae). Behav. Ecol. Sociobiol. 58: 128-135.
- Fassotte, B., F. Francis & F.J. Verheggen. 2016.** The scent of love: how important are semiochemicals in the sexual behavior of lady beetles? J. Pest Sci. 89: 347-358.
- Fox, C.W. & C.M. Rauter. 2003.** Bet-hedging and the evolution of multiple mating. Evol. Ecol. Res. 5: 273-286.
- Gay, L., D.J. Hosken, P. Eady, R. Vasudev & T. Tregenza. 2010.** The evolution of harm-effect of sexual conflicts and population size. Evolution 65: 725-737.
- Gillott, C. 2003.** Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. Annu. Rev. Entomol. 48: 163-84.
- Hadrill, P.R., D.M. Shuker, W. Amos, M.E.N. Majerus & S. Mayes. 2008.** Female multiple mating in wild and laboratory populations of the two-spot ladybird, *Adalia bipunctata*. Mol. Ecol. 17: 3189-3197.
- Hollander, M. & D.T. Gwynne. 2009:** Female fitness consequences of male harassment and copulation in seed beetles, *Callosobruchus maculatus*. Anim. Behav. 78: 1061-1070.
- Hotzy, C., M. Polak, J.L. Rönn & G. Arnqvist. 2012.** Phenotypic engineering unveils the function of genital morphology. Curr. Biol. 22: 2258-2261.
- Jiaqin, X., Z. Yuhong, W. Hongsheng, L. Ping, D. Congshuang, & P. Hong. 2014.** Effects of mating patterns on reproductive performance and offspring fitness in *Cryptolaemus montrouzieri*. Entomol. Exp. Appl. 153: 20-23.



- Kaufman, T. 1996.** Dynamics of sperm transfer, mixing, and fertilization in *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae) in Kenya. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 89: 238-242.
- Majerus, M.E.N. 1994.** Female promiscuity maintains high fertility in ladybirds (Col., Coccinellidae). *Entomol. Mon. Mag.* 130: 205-209.
- McDonald, G.C. & T. Pizzari. 2016.** Why patterns of assortative mating are key to study sexual selection and how to measure them. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 70: 209-220.
- Michaud, J.P., M. Bista, G. Mishra & O. Singh. 2013.** Sexual activity diminishes male virility in two *Coccinella* species: Consequences for female fertility and progeny development. *Bull. Entomol. Res.* 103: 570-577.
- Mirhosseini, M.A., J.P. Michaud, M.A. Jalali & M. Ziaaddini. 2014.** Paternal effects correlate with female reproductivestimulation in the polyandrous ladybird *Cheilomenes sexmaculata*. *Bull. Entomol. Res.* 104: 480-485.
- Mishra, G. & S.K. Omkar. 2006.** Ageing trajectory and longevity trade-off in aphidophagous ladybird, *Propylea dissecta* (Coleoptera: Coccinellidae). *Eur. J. Entomol.* 103: 33-40.
- Monaghan, P., A. Charmantier, D.H. Nussey & R.E. Ricklefs. 2008.** The evolutionary ecology of senescence. *Funct. Ecol.* 22: 371-378.
- Mulsant, E. (1850).** Species des Coleopteres trimeres securipalpes. *Ann. Sci. Phys. Nat. Lyon* 2: 1-1104.
- Omkar, S.K. Sing & G. Mishra. 2010.** Multiple matings affect the reproductive performance of the aphidophagous ladybird beetle, *Coelophora saucia* (Coleoptera: Coccinellidae). *Eur. J. Entomol.* 107: 177-182.
- Pattanayak R., G. Mishra, Omkar, C.S. Chanotiya, P.K. Rout & C.S. Mohanty. 2014.** Does the volatile hydrocarbon profile differ between the sexes: a case study on five aphidophagous ladybirds. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* 87: 105-125.
- Peronti, A.L.B.G., N.M. Martinelli, J.G. Alexandrino, A.L. Marsaro Júnior, A.M. Pentead-Dias & L.M. Almeida. 2016.** Natural enemies associated with *Maconellicoccus hirsutus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in the state of São Paulo, Brazil. *Fla. Entomol.* 99: 21-25.
- Perry, J.C. & L. Rowe. 2010.** Condition-dependent ejaculate size and composition in a ladybird beetle. *Proc. R. Soc. B.* 277: 3639-3647.
- Pervez A., Omkar & A. S. Richmond. 2004.** The influence of age on reproductive 1615 performance of the predatory ladybird beetle, *Propylea dissecta*. *J. Insect Sci.* 4: 01-08.

- Sanches, N.F. & R.S. Carvalho. 2010.** Procedimentos para manejo da criação e multiplicação do predador exótico *Cryptolaemus montrouzieri*. Cruz das Almas, EMBRAPA, 5p. (Circular Técnica 99).
- Silva-Torres, C.S.A., P.R.R. Barbosa, E.A. Santos & J.B. Torres. 2014.** Comportamento sexual da joaninha predadora *Tenuisvalvae notata* (Coleoptera: Coccinellidae). XXV Congresso Brasileiro de Entomologia, Goiânia-GO.
- SAS Institute. 2001.** SAS users guide, Version 8 for Windows. SAS Institute, Cary, NC.
- Semyanov, V.P. 1970.** Biological properties of *Adalia bipunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae) in conditions of Leningrad region. Zashch. Rast. Vredit. Bolez. 127: 105-112.
- Thornhill, R. & J. Alcock. 1983.** The evolution of insect mating systems. Massachusetts, Harvard University Press, 325p.

Tabela 1. Tempo médio de latência (+EP) para a ocorrência da primeira e segunda cópula em *Tenuisvalvae notata*.

Tratamentos <sup>1</sup>	Primeira cópula	Segunda cópula	Estatística
Escolha das fêmeas	4754,67 ± 1023,80	3779,33 ± 800,60	T <sub>gl=59</sub> = 6,59; P <0,0001
Escolha dos Machos	2951,50 ± 655,60	2334,87 ± 498,50	T <sub>gl=59</sub> = 6,44; P <0,0001

<sup>1</sup>Médias analisadas na linha (T Student,  $\alpha = 0,05\%$ ).

Tabela 2. Média (+EP) para os parâmetros de desenvolvimento da descendência de *Tenuisvalvae notata* de acordo com diferentes histórias de acasalamento do macho.

Parâmetros <sup>1</sup>	História de acasalamento do ♂			
	Virgem	1 cópula	2 cópulas	3 cópulas
Ovo (dias)	2,80 (± 0,10) ab	2,75 (± 0,07) b	2,78 (± 0,10) b	2,86 (± 0,12) a
Larva (dias)	3,48 (± 0,52) b	3,75 (± 0,49) a	3,70 (± 0,36) a	3,58 (± 0,34) b
Pupa (dias)	3,59 (± 0,34) a	3,51 (± 0,49) a	3,52 (± 0,37) a	3,54 (± 0,44) a
Peso ♂ (mg)	0,89 (± 0,06) c	1,45 (± 0,04) ab	1,26 (± 0,24) b	1,54 (± 0,01) a
Peso ♀ (mg)	1,80 (± 0,01) a	1,66 (± 0,01) b	1,66 (± 0,06) b	1,69 (± 0,01) b
Tempo de cópula (s)	71,95 (± 18,20) a	68,03 (± 15,50) a	58,46 (± 8,52) a	51,26 (± 4,42) a

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem entre si (Tukey, HSD,  $\alpha = 0,05\%$ ).

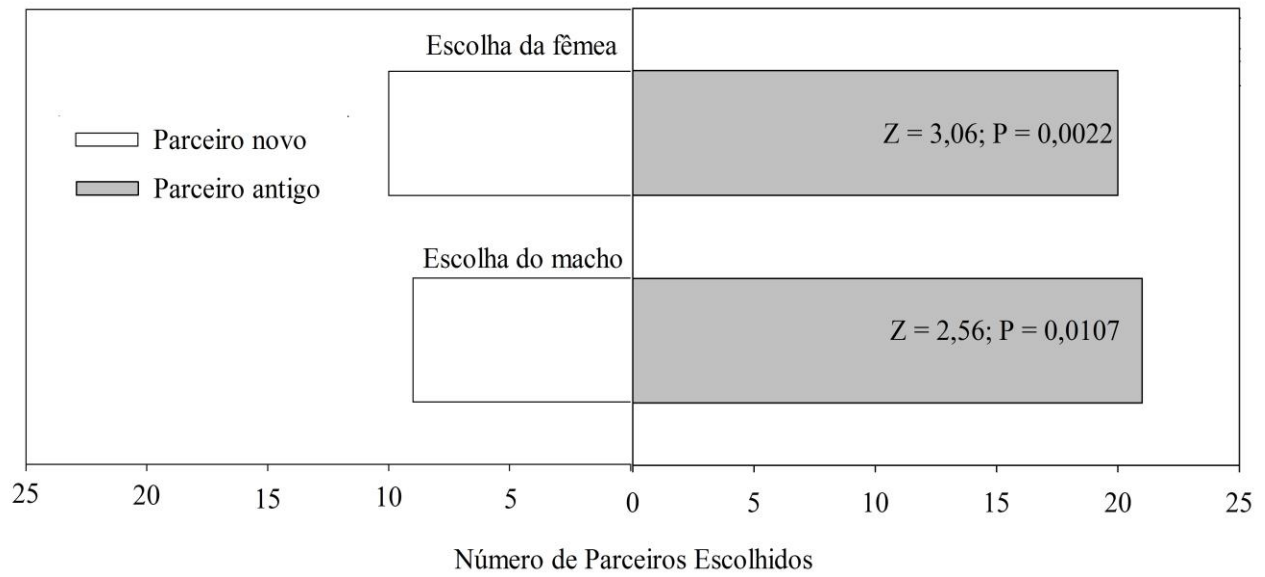


Figura 1. Preferência entre parceiros sexuais em joaninhas *Tenuisvalvae notata* no momento da segunda cópula após 24 horas do primeiro acasalamento.

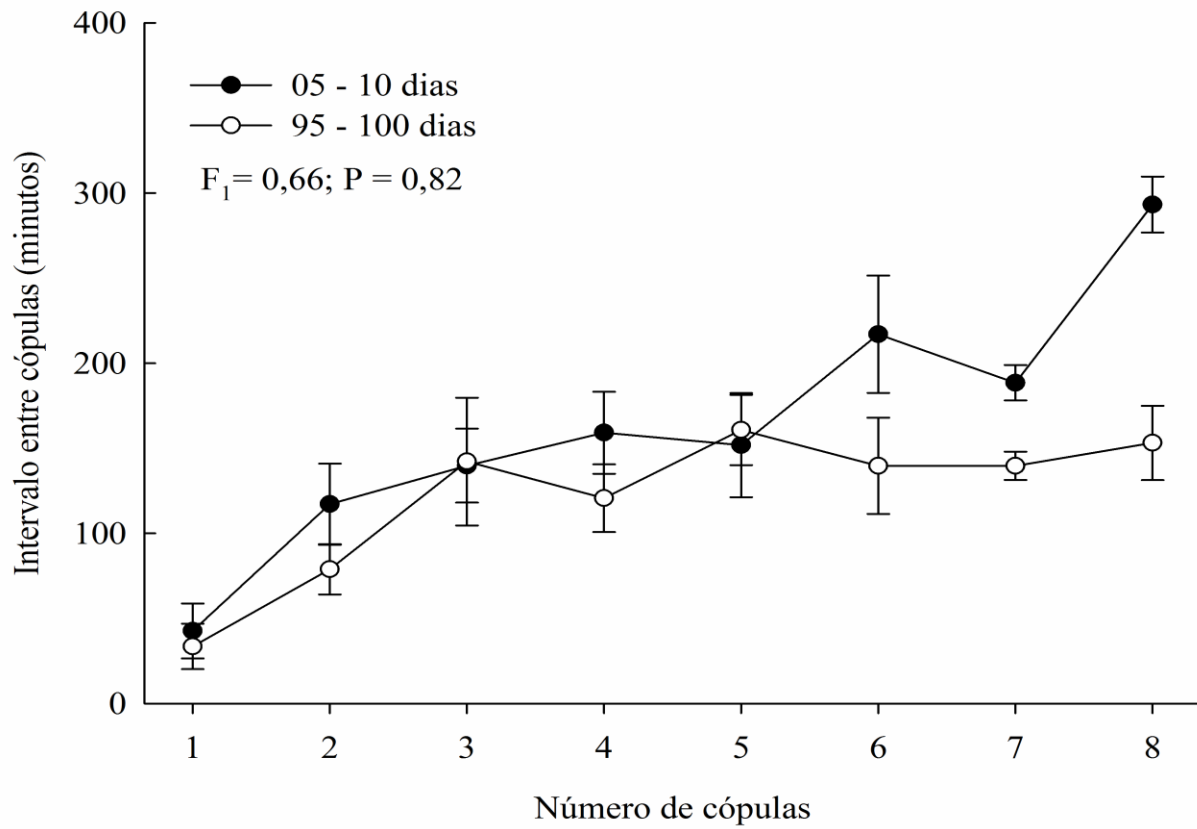


Figura 2. Média ( $\pm$  EP) do intervalo entre cópulas (minutos) de casais jovens (05 – 10 dias) e casais considerados velhos (95 – 100 dias) da joaninha *Tenuisvalvae notata* ao longo de 12 horas da fotofase.

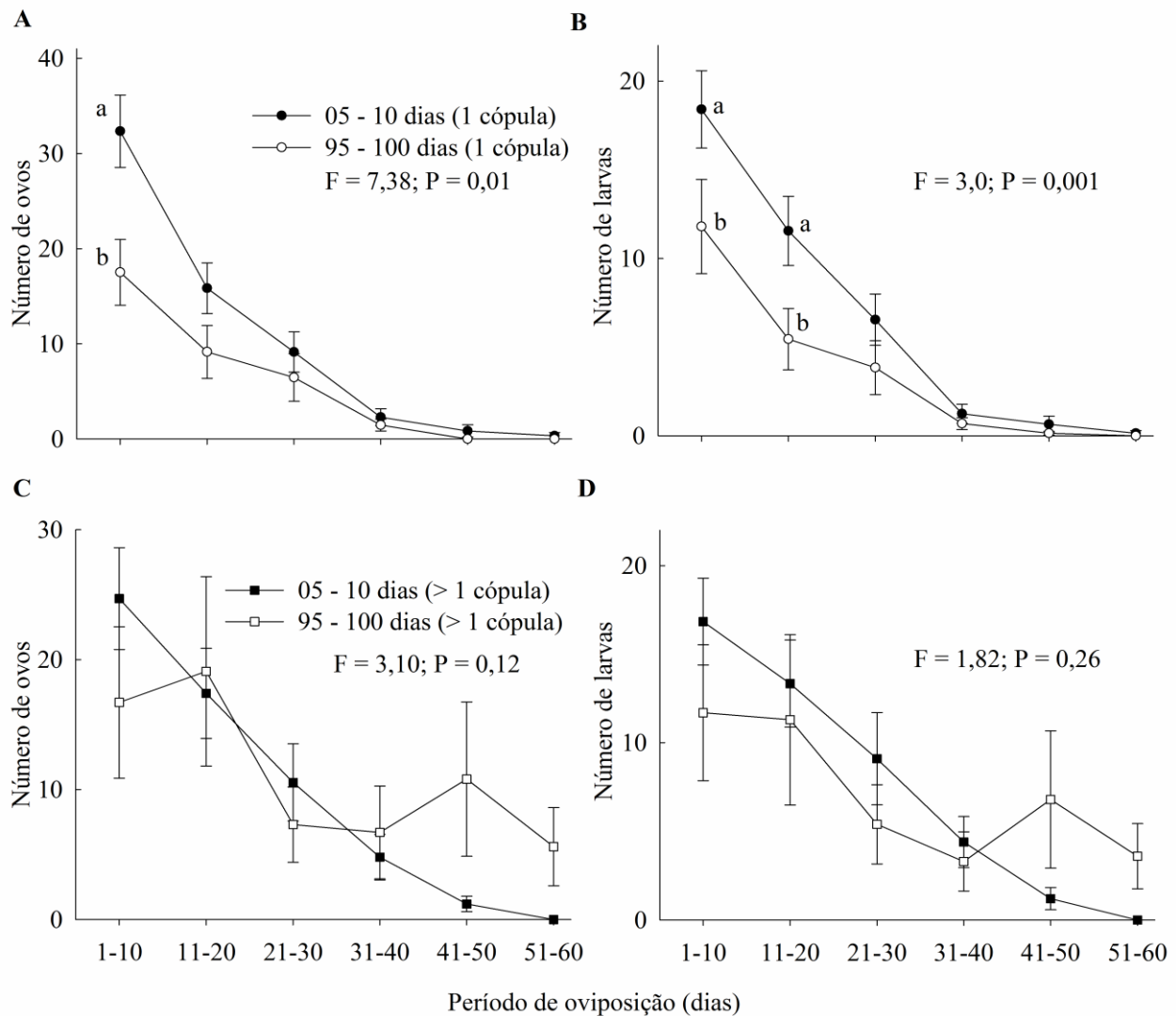


Figura 3. Média (+EP) de fecundidade (A, C) e fertilidade (B, D) de casais jovens e casais considerados velhos da joaninha *Tenuisvalvae notata* submetidos a um ou vários acasalamentos num único dia. Resultados para 60 dias consecutivos após o acasalamento em intervalos de cinco dias quando comparado o efeito da idade sobre o desempenho reprodutivo Médias seguidas de letras diferem entre si em cada intervalo de tempo (Tukey, HSD,  $\alpha = 0,05\%$ ).

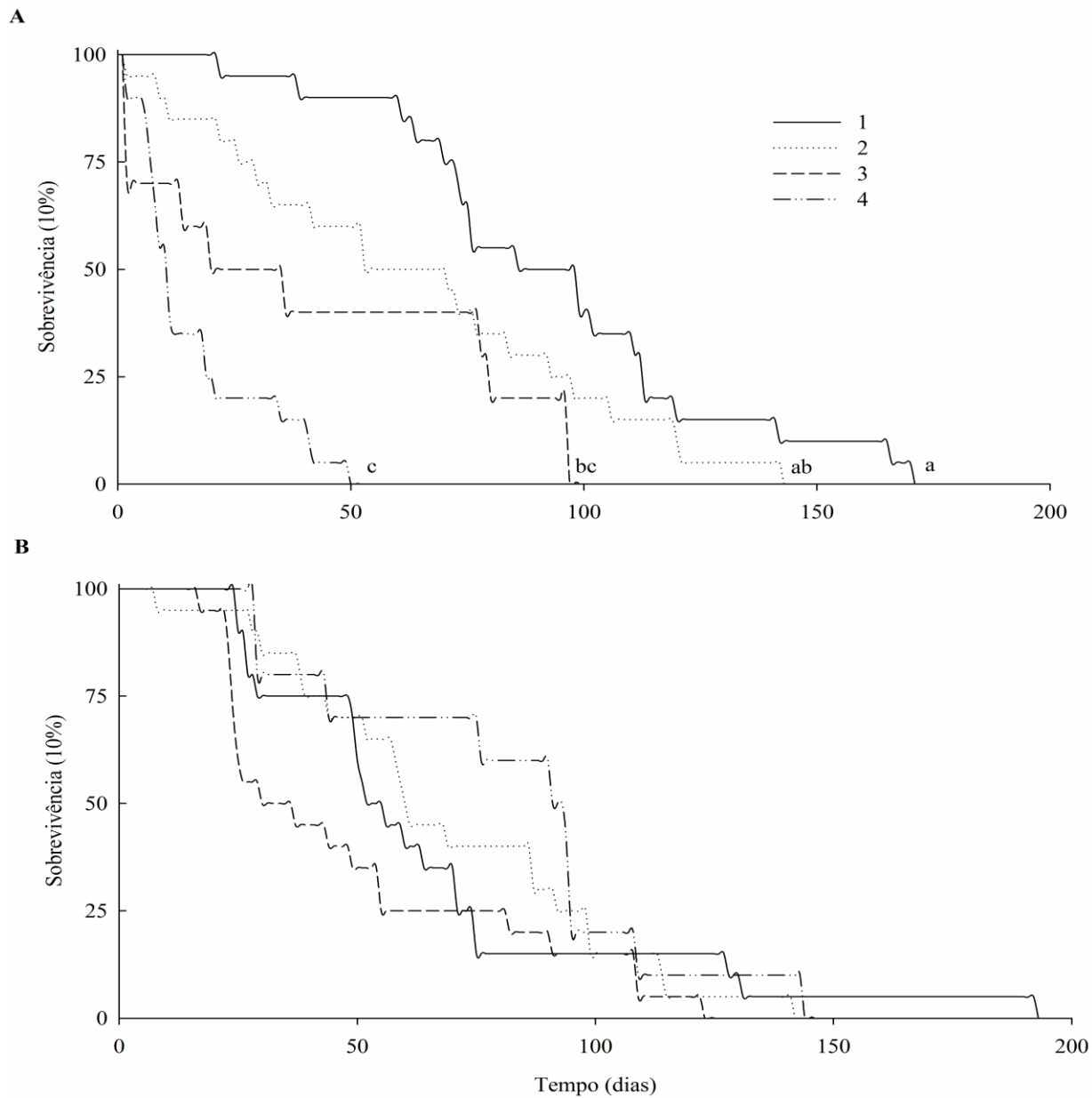


Figura 4. Curvas de sobrevivência de *Tenuisvalvae notata* fêmeas (A) ( $\chi^2_3 = 100,69$ ,  $P < 0,001$ ) e machos (B) ( $\chi^2_3 = 5,28$ ,  $P = 0,15$ ) submetidos a diferentes tratamentos: 1) jovens (5-10 dias de idade) copuladas uma vez (linha sólida); 2) velhas (95-100 dias de idade) copuladas uma vez (linha pontilhada); 3) jovens (5-10 dias de idade) copuladas múltiplas vezes (linha tracejada); 4) velhas (95-100 dias de idade) copuladas múltiplas vezes (linha pontilhada e tracejada). Curvas calculadas pelo estimador Kaplan–Meier e comparadas pelo teste de Log-Rank.



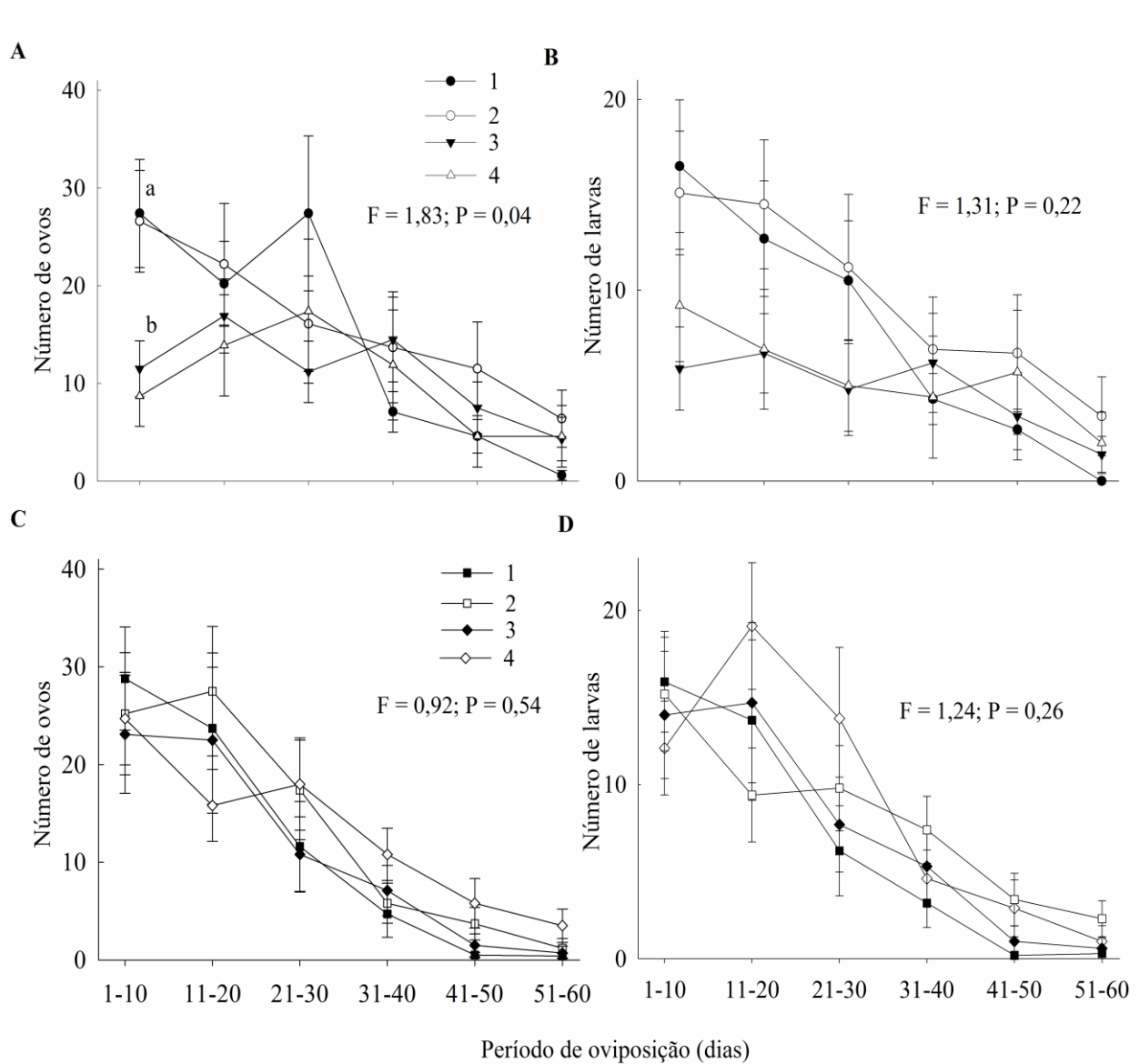


Figura 5. Média (+EP) de fecundidade e fertilidade (média  $\pm$  SE) de fêmeas de *Tenuisvalvae notata*. Número de ovos (A) e número de larvas (B) submetidas a diferentes tratamentos: 1) fêmeas copuladas uma vez com machos virgens (círculo fechado); 2) fêmeas copuladas 10 vezes com mesmo macho (círculo aberto); 3) fêmeas copuladas 10 vezes com machos alternados (triângulo fechado); 4) fêmeas copuladas 10 vezes com machos virgens e diferentes (triângulo aberto). Número de ovos (C) e número de larvas (D) submetidas a diferentes tratamentos: fêmeas copuladas com machos virgens (quadrado fechado); 2) fêmeas copuladas com machos

previamente copulados uma vez (quadrado aberto); 3) fêmeas copuladas com machos previamente copulados duas vezes (losango fechado); 4) fêmeas copuladas com machos previamente copulados três vezes (losango aberto). Resultados para 60 dias consecutivos após a cópula em intervalos de 10 dias. Médias seguidas de letras diferem entre si em cada intervalo de tempo (Tukey, HSD,  $\alpha = 0,05\%$ ).

### CAPÍTULO 3

#### ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA ESPERMATECA DE FÊMEAS VIRGENS E COPULADAS DE *Tenuisvalvae notata* (MULSANT) (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)<sup>1</sup>

AMANDA C. TÚLER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Agronomia, Fitossanidade – Entomologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

---

<sup>1</sup>Túler, A.C. Aspectos morfológicos da espermateca de fêmeas virgens e copuladas de *Tenuisvalvae notata* (Mulsant) (Coleoptera: Coccinellidae). A ser submetido.

RESUMO – A joaninha predadora *Tenuisvalvae notata* (Mulsant) é uma espécie poligâmica e a morfologia da espermateca juntamente com a sua capacidade de armazenamento de fluido seminal podem influenciar o seu desempenho reprodutivo. Dessa forma, este trabalho avaliou a morfologia da espermateca de fêmeas virgens e copuladas de *T. notata*, utilizando a microscopia de luz e de varredura. Os resultados mostram que a espermateca de *T. notata* possui formato riniforme e é constituída apenas do receptáculo e duto espermático, sendo semelhante nas fêmeas virgens e acasaladas. Observou-se a ausência de secreção nas espermatecas de fêmeas virgens, e nas fêmeas copuladas apenas uma vez não foi possível observar a presença de espermatozoides. Por outro lado, nas fêmeas copuladas múltiplas vezes, foi possível observar os espermatozoides no lúmen da espermateca circundando o material secretado. É possível que a poligamia em *T. notata* esteja relacionada aos custos gerados para manutenção dos espermatozoides viáveis por um longo período de tempo na espermateca, e nesse caso, a fêmea teria preferência de copular mais vezes ao longo da vida adulta do que armazenar espermatozoides por um maior período de tempo.

PALAVRAS-CHAVE: Joaninha, receptáculo seminal, ultraestrutura

MORPHOLOGICAL ASPECTS OF THE SPERMATECA OF VIRGIN AND MATED  
FEMALES *Tenuisvalvae notata* (MULSANT) (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)

ABSTRACT - The predatory ladybird beetle *Tenuisvalvae notata* is a polygamous species and the morphology as well as the storage capacity of seminal fluid in the spermatheca may affect its reproductive performance. Thus, this study evaluated the morphology of the spermatheca of virgin and mated *T. notata* females using light and scanning microscopy. Results show that the spermatheca of *T. notata* is rhiniform and consists only of the receptacle and spermatic duct, being similar in virgin and mated females. There was no secretion in the spermathecae of virgin females, and in females mated only once it was not possible to observe the presence of spermatozoa. In contrast, in females mated multiple times, it is possible to observe the spermatozoa in the lumen of the spermatheca surrounding the secreted material. It is possible that the polygamy in *T. notata* is related to the costs of maintenance of viable spermatozoa for a long period of time in the spermatheca, in which case the female would prefer to copulate more times during its adult life than to store spermatozoa by a longer period of time.

KEY WORDS: Ladybug, seminal receptacle, ultrastructure

## Introdução

O sucesso dos insetos é influenciado por diversos aspectos, entre eles a alta capacidade reprodutiva e os diferentes sistemas de acasalamento. Nesse contexto, o aumento do desempenho reprodutivo dos insetos deve-se, pelo menos parcialmente, à capacidade das fêmeas em armazenar o fluido seminal em estruturas chamadas espermatecas, assegurando a fertilização dos ovos durante todo o seu período reprodutivo (Pascini & Martins 2016). Além de gametas, o conteúdo da espermateca é, constituído principalmente de minerais, água e íons, bem como alomônios (Michaud *et al.* 2013), metabólicos secundários precursores de prostaglandinas (Worthington *et al.* 2015) e de proteínas (Pascini *et al.* 2012). Evolutivamente falando, alguns fatores contribuem para o uso da espermateca como órgão de armazenamento, dentre eles, a garantia de fertilização futura dos ovos mesmo na ausência do parceiro sexual, mas também como fonte de nutrientes, os quais são transferidos pelo macho junto ao material seminal durante a cópula (Thornhill & Alcock 1983).

A morfologia da espermateca serve de base para classificação de espécies de insetos (Suzuki *et al.* 1996, Borowiec *et al.* 2009). Entretanto, ela também é alvo de estudos relacionados a reprodução, uma vez que suas funções podem levar a um aumento da viabilidade espermática, fecundidade e fertilidade, e sua morfologia e capacidade de armazenamento podem alterar o comportamento sexual das fêmeas. Em moscas *Drosophila melanogaster* (Loew) (Diptera: Drosophilidae), as proteínas do fluido seminal armazenados na espermateca podem aumentar a produção de ovos nas fêmeas (Soller *et al.* 1999) bem como prostaglandilas presentes nos ejaculados de *Teleogryllus commodus* (Walker) (Orthoptera: Gryllidae) e *Acheta domesticus* (Linnaeus) (Orthoptera: Gryllidae), que podem induzir a oviposição mesmo em fêmeas virgens. Acredita-se, ainda, que as condições adequadas do líquido espermático podem ser cruciais para a proteção, manutenção e viabilidade dos espermatozoides armazenados nessa estrutura (Collins *et*

al. 2004) pois, além de armazenar os espermatozoides, a espermateca tem a função de nutri-los através da glândula espermática ou secreções do epitélio que a reveste (Chapman 2013), e os espermatozoides são protegidos contra danos mecânicos e oxidação (Collins *et al.* 2004). Entretanto, a morte dos espermatozoides armazenados na espermateca é um processo fisiológico normal denominado apoptose, o qual é responsável pela remoção de células indesejadas ou danificadas (Huang *et al.* 2013). Nesse caso, a apoptose pode ser intensificada pela baixa disponibilidade de nutrientes liberados pela fêmea na espermateca ou material seminal liberado pelos machos no momento da cópula.

Os estudos sobre reprodução em inimigos naturais têm sido conduzidos com o intuito de contribuir na aplicação do controle de pragas. Isto através da maximização de criações massais em insetários, mantendo suas características ótimas de sobrevivência, reprodução e de predação após a liberação para o controle. Dentre os inimigos naturais mais conhecidos temos as joaninhas predadoras (Coleoptera: Coccinellidae) as quais consomem cochonilhas, pulgões, moscas-brancas, psilídeos, tripés, ácaros entre outros (Hodek & Honek 2009, Obrycki *et al.* 2009). A maioria dos coccinélídeos são polígamos, podendo acasalar múltiplas vezes durante o dia e ao longo da vida adulta (Omkar & Mishra 2010), o que pode estar relacionado com a sua capacidade de armazenamento de material seminal durante as cópulas e refletir no seu desempenho reprodutivo.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi descrever pela primeira vez a morfologia da espermateca da joaninha predadora *Tenuisvalave notata* (Mulsant), usando microscopia de luz e varredura. Esta espécie de coccinélídeo tem sido encontrada predando espécies de cochonilhas farinhentas, e apresenta-se como potencial inimigo natural para controle de espécies-praga no Brasil, já que se encontra difundida em diversos estados do país (Barbosa *et al.* 2014, Peronti *et al.* 2016). A partir da hipótese de que as fêmeas de *T. notata* são limitadas quanto ao tamanho da

espermateca, e acumulam uma quantidade máxima de material seminal neste órgão, independente do número de cópulas efetuadas por dia. Assim, foi avaliado se ocorre a senescência de células espermáticas após múltiplas cópulas pelo teste de apoptose por imunofluorescência, e a natureza de substâncias nutricionais presentes no lúmen da espermateca.

### **Material e Métodos**

**Presas.** A colônia da cochonilha *F. dasyrillii* é mantida no Laboratório de Comportamento de Insetos do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Estes espécimes foram alimentados com abóboras da variedade “Jacarezinho”, obtidas regularmente no mercado local e mantidas de acordo com a metodologia descrita por Sanches & Carvalho (2010).

Previamente à infestação com as cochonilhas, as abóboras foram lavadas com água e detergente neutro, e secas com papel toalha. Em seguida, as abóboras foram colocadas em bandejas plásticas de 29,0 x 41,5 x 7,3 cm (comprimento x altura x largura), revestidas com toalhas de papel e infestadas na região do pecíolo com fêmeas reprodutoras. À medida que a abóbora se torna totalmente encoberta pelas cochonilhas, esta servirá de reservatório para a infestação de outras abóboras sadias. Nas condições de manutenção desta criação: temperatura de 25 °C, umidade relativa de  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 12: 12 (L: E), o período decorrido da infestação à completa colonização da abóbora com cochonilhas adultas é de aproximadamente 30 dias, quando então as cochonilhas são utilizadas na criação da joaninha predadora.

**Predador.** No laboratório, *T. notata* foi mantido sob as mesmas condições ambientais que a colônia de presas. Para a manutenção da joaninha, os adultos de *T. notata* foram confinados em caixas de acrílico de 40 x 25 x 20 cm (comprimento x altura x largura), contendo aberturas laterais de 10 cm de diâmetro, cobertas com uma malha de nylon de 2 mm para permitir a



ventilação das gaiolas. Cada gaiola foi forrada com papel toalha e recebeu uma abóbora infestada com a cochonilha *F. dasyrillii* em diferentes estádios de desenvolvimento, servindo como alimento para as joaninhas de acordo com Barbosa *et al.* (2014).

Para garantir que utilizamos machos virgens em nossos bioensaios, quando necessário, as pupas de *T. notata* foram individualizadas em placas de acrílico (3,5 cm de diâmetro) e observadas diariamente para emergência de adultos. Depois disso, os adultos foram sexados com base em diferenças morfológicas, nas quais as fêmeas são maiores e apresentam duas manchas pretas na parte superior da cabeça, entre os olhos e tem a porção final do adome com formato afunilado. Já os machos possuem uma mancha branca na porção marginal do mesoesterno e abdome mais arredondado (Mulsant 1850, Barbosa *et al.* 2014).

**Análise em Microscopia de Luz.** Inicialmente, os seguintes tratamentos foram formados: fêmeas virgens, fêmeas copuladas uma vez, duas vezes e três vezes. As cópulas ocorreram em um período de observação de 12 horas, das 7:00 às 19:00 horas, sendo que cada cópula ocorreu com um macho diferente e de mesma idade da fêmea (5-10 dias). Após a cópula, os casais foram imediatamente separados e as fêmeas usadas para as análises.

Para análises da estrutura a fresco, as fêmeas foram imobilizadas a baixa temperatura (4 °C) e, posteriormente, dissecadas sob estereomicroscópio (MOTIC SMZ - 168). Para tal, as fêmeas foram alfinetadas na região do abdome e as espermatecas extraídas com auxílio de uma pinça metálica entomológica puxando a genitália, a qual foi mantida por 24 h em solução de KOH (10%) para clarificação do material. Em seguida, cada espermateca foi fixada em lâminas escavadas, e as imagens foram obtidas com auxílio de um fotomicroscópio (NIKON AZ 100, software ProgRes CapturePro 2.8.8).

Para análise histológica, foram analisadas cinco espermatecas de *T. notata* para cada tratamento anteriormente citado. Novamente, as fêmeas foram imobilizadas a baixa temperatura

(4 °C) e, posteriormente, dissecadas sob estereomicroscópio (MOTIC SMZ - 168). Nesse caso, as fêmeas foram alfinetadas na região do abdome e foram retiradas as asas e apêndices, mantendo-se apenas o abdome. As amostras foram transferidas (5/trat) para tubos Ependorf e foram fixados em formol (10%) por 24 horas. Posteriormente, foram desidratados em banhos crescentes de álcool etílico (70 - 100%) por 20 minutos cada, diafanizados em xilol e, em seguida, impregnados e incluídos em blocos de parafina. Os blocos foram cortados em um micrótomo tipo Minot (LEICA RM 2035) na espessura de 5 µm, colocados em banho-maria e coletados com lâminas. Posteriormente, as lâminas contendo os cortes foram submetidas às técnicas de coloração em Hematoxilina-eosina (H.E.) para análise histológica do órgão. Todas as lâminas foram examinadas com fotomicroscópio Leica e digitalizadas pelo software LAS Leica Image.

**Análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (M.E.V.).** Foram coletados quinze espermatecas de adultos de *T. notata* de fêmeas virgens e quinze espermatecas de fêmeas acasaladas três vezes, baseado no número médio de cópulas realizado por dia. Para isso, as fêmeas foram imobilizadas a baixa temperatura (4 °C) e posteriormente dissecadas sob estereomicroscópio (MOTIC SMZ - 168). Para tal, as fêmeas foram alfinetadas na região do abdome e as espermatecas extraídas diretamente em solução de formol tamponado (10%) com auxílio de uma pinça metálica entomológica puxando a genitália, e posteriormente fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% e mantidas por 24 h em temperatura de 2-8 °C. Posteriormente, foram realizadas três lavagens em solução tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2). Em seguida, foram as amostras pós-fixadas em solução de 1% de tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) por duas horas, na ausência de luz, sob temperatura ambiente. As amostras foram lavadas em solução de tampão fosfato padrão (PBS) por três vezes, e então, desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30-100%) por 30 minutos cada. Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem pelo método do ponto crítico, usando CO<sub>2</sub> líquido, montadas em suporte (stubs) e

submetidas à metalização com cobertura de ouro coloidal durante um minuto (Pimenta & Souza 1986). Por fim, as imagens das espermatecas foram obtidas em microscópio eletrônico (JEOL-5600LV, software Image J V1.47p).

**Apoptose por Imunofluorescência da Espermateca.** Com o intuito de avaliar se ocorre mortalidade dos espermatozoides após a cópula, foi realizado teste de TUNEL utilizando-se kit comercial (ApopTag Red In Situ Apoptosis Detection Kit – S7165 – Millipore Corporation). Para isso, foram analisadas cinco espermatecas de adultos de *T. notata* de cada tratamento sendo eles: fêmeas virgens; fêmeas copuladas uma vez; duas vezes e três vezes com machos diferentes. Após a cópula as fêmeas de cada tratamento foram imobilizadas a baixa temperatura (4 °C) e as espermatecas extraídas com anteriormente descrito. Em seguida, as amostras foram fixadas em formol tamponado (10%) por 24 horas e, posteriormente, desidratadas em banhos crescentes de álcool etílico (70 - 100%) por 20 minutos cada, diafanizadas em xilol e em seguida impregnadas e incluídos em blocos de parafina. Os blocos foram cortados em um micrótomo tipo Minot (LEICA RM 2035) na espessura de 5 µm, colocados em banho-maria e coletados com lâminas silanizadas. Os cortes foram inicialmente desparafinados e hidratados e, em seguida, incubados em Tampão fosfato-salino – PBS (pH 7,4; 0,1M) à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a recuperação antigênica utilizando-se a Proteinase K (20 mg/mL). Os cortes foram então lavados em PBS e receberam o tampão de equilíbrio para posterior incubação com a enzima TdT a 37 °C por 1 hora em câmara úmida. As lâminas foram lavadas em PBS (pH 7,4 a 0,1M) e incubadas com a anti-digoxigenina conjugada à Rodamina por 30 minutos em câmara úmida. Em seguida foram enxaguadas em PBS e montadas utilizando o meio de montagem antifading associado ao corante azul fluorescente diamidino-2-fenilindol (DAPI), para marcação dos núcleos das células. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência com varredura a laser (Carl Zeiss LSM 700, software Zen) utilizando-se os filtros de 415 nm (azul) e 735 nm (vermelho).

**Análise Histoquímica.** Para análises de quantificação de proteínas e carboidratos totais no lúmen da espermateca, as fêmeas dos tratamentos, sendo eles: fêmeas copuladas uma vez e fêmeas copuladas três vezes foram imobilizadas a baixa temperatura (4 °C) e as espermatecas extraídas com anteriormente descrito. Em seguida, as amostras foram fixadas em formol tamponado (10%) por 24 horas e, posteriormente, desidratados em banhos crescentes de álcool etílico (70 - 100%) por 10 minutos cada, embebidos em álcool+historesina (1:1) por 24 horas e finalmente incluídos em historesina pura (Leica) por mais 24 horas. Foram seccionados cortes com 3µm de espessura obtidos em micrótomo (LEICA RM 2035), colocados em banho-maria e coletados com lâminas. As lâminas contendo os cortes foram submetidas às técnicas de coloração para as análises histoquímicas, com o Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.) (detecção de polissacarídeos neutros) (Junqueira & Junqueira 1983) e Xylidine Ponceau (detecção de proteínas totais) (Pearse 1960). Todas as lâminas foram examinadas com fotomicroscópio Leica (software LAS Leica Image). A quantificação de polissacarídeos e proteínas foi realizada utilizando-se quatro seções da espermateca de cada tratamento, através do programa editor de imagens GIMP 2.8 (GNU Image Manipulation Program, UNIX platforms). O programa converte imagens digitais para uma escala de cinza, o que permite a mensuração dos valores médios de pixels referentes à marcação selecionada no tecido (Solomon 2009) e as médias comparadas através do teste de T de Student,  $\alpha = 0,05\%$  (PROC T TEST, SAS Institute 2001).

## **Resultados**

**Análise Morfológica de Espermatecas de *Tenuisvalvae notata*.** Em *T. notata*, a espermateca é constituída apenas do receptáculo seminal e ducto espermático. Não foi observada a glândula espermática nesta espécie. A espermateca localiza-se próximo à região vaginal do inseto associado à bursa copulatrix através do ducto espermático que permite a passagem de gametas

masculinos da bursa copulatrix para a espermateca após o acasalamento, ou na direção oposta para a fertilização do ovo (Fig. 1A). A espermateca apresenta-se de aspecto arredondado ou riniforme, mais alargada na região distal e afilada na região que se liga ao ducto (Fig. 1).

**Análise Histológica de Espermatecas de *Tenuisvalvae notata*.** A partir da análise das espermatecas coradas com H.E., foi possível observar um epitélio pseudo-estratificado, e uma íntima, delimitando a luz do órgão (Fig. 2). Observou-se ainda a presença de tecido muscular abaixo do epitélio (Fig. 2A-C) percorrendo-a externamente. Não observamos a presença de qualquer secreção ou espermatozoides em espermatecas de fêmeas virgens (Fig. 2A). Já nas fêmeas copuladas mais de uma vez, observou-se a presença de secreção e espermatozoides no lúmen da espermateca circundando o material secretado (Fig. 2B-D). A partir da coloração obtida (H.E.), é possível inferir a natureza dos compostos presentes no lúmen da espermateca observamos assim a presença de carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos no lúmen da espermateca sendo estes relacionados com a presença da secreção e dos espermatozoides, respectivamente.

**Apoptose por Imunofluorescência da Espermateca.** Não foi observado apoptose no conteúdo espermático de fêmeas de *T. notata*, em nenhum dos tratamentos avaliados a partir do método de TUNEL utilizando-se kit comercial (ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kit – S7165 – Millipore Corporation).

**Análise Histoquímica.** As espermatecas de fêmeas acasaladas uma vez e espermatecas de fêmeas acasaladas três vezes, demonstraram reação positiva para teores de carboidratos (P.A.S.), e para os teores de proteínas totais (Xylidine Ponceau). Entretanto, a quantificação em pixels de carboidratos ( $t_1 = 1,23$ ;  $P = 0,32$ ) e de proteínas  $t_3 = 1,29$ ;  $P = 0,31$ ) não diferiram entre os tratamentos (Tabela 1).

## Discussão

Nos insetos, a espermateca também denominada de receptáculo seminal, pode estar associada a um duto e uma glândula que é a forma mais comum, além de outras estruturas auxiliares. Em um estudo realizado por Marzo (2008), foram classificadas variações na morfologia da espermateca de acordo com a ocorrência ou não dessas estruturas. Assim, podem ocorrer espécies que apresentam apenas as estruturas do receptáculo e duto espermático como ocorre em *T. notata*. Ainda podem ocorrer espécies que apresentam apenas o receptáculo e a glândula, como em *Atomaria analis* (Stephens) (Coleoptera: Cryptophagidae), somente o receptáculo como em *Capnodis tenebrionis* (Linnaeus) (Coleoptera: Buprestidae), somente a glândula como ocorre no coleóptero da família Elateridae, *Lacon punctatus* (Herbst) (Marzo 2008). Em casos extremos, há a ocorrência de espécies sem espermateca como no coccinellideo *Stethorus pusillus* (Herbst) e nesse caso, as fêmeas armazenam os espermatozoides no oviduto (Putman 1955).

O receptáculo é de aspecto arredondado a riniforme, característico de espécies do mesmo gênero como ocorre na joaninha *Tenuisvalvae bisquinquepustulata* (Fabricius) (González 2007) e bastante esclerotizada. A cutícula da espermateca é crucial para manter os gametas isolados do ambiente externo e oxidação (Collins *et al.* 2004), que poderia causar danos aos espermatozoides.

A presença de músculos associados à espermateca funciona como esfíncter para evitar que os gametas escapem do reservatório e para controlar sua liberação durante a fertilização do óvulo (Gerber & Klostermeyer 1970). Dependendo da espécie, os músculos da espermateca podem ser distribuídos de várias maneiras: limitando-se à região proximal ou distal do receptáculo; pode associar-se com outras estruturas formando uma musculatura mais forte e concentrada chamada de “bomba”; e as fibras podem ainda ligar duas superfícies dispostas uma em frente à outra, chamada de uma condição comum da musculatura, conhecida como músculo compressor. Esse

último tipo de musculatura é mais encontrado em espermatecas esclerotizadas, como parece ocorrer em *T. notata* e, tem como função principal, a liberação de esperma para fecundação através da contração do músculo compressor (Grassé 1977).

Além da transferência de gametas, a cópula parece ter outras funções não específicas como a indução à produção de secreção de nutrientes pela espermateca, como observado em nossos resultados para fêmeas virgens e sexualmente maduras (> 5 dias de idade), as quais não apresentaram qualquer secreção na espermateca. Por outro lado, observou-se que as fêmeas copuladas uma vez, apresentaram apenas secreção na espermateca, sem espermatozoides. Isso pode estar relacionado com o tempo de migração dos espermatozoides para o lúmen da espermateca após a cópula. Os espermatozoides migram de forma variada entre espécies distintas de insetos e o tempo de preenchimento da espermateca pode chegar a horas após a cópula como, por exemplo, *Bombyx mori* (Linnaeus) (Lepidoptera: Bombycidae), em que a espermateca leva mais de 2,5 horas para preencher completamente (Suzuki *et al.* 1996).

Como em nossos experimentos, as fêmeas foram dissecadas imediatamente após atingirem o número necessário de cópulas em cada tratamento, é possível que quando as fêmeas copularam apenas uma vez, o tempo entre a cópula e a dissecação do inseto não tenha sido suficiente para a transferência dos espermatozoides para espermateca. Entretanto, quando as fêmeas copularam mais de uma vez, o intervalo entre uma cópula e outra foi em média de 28,77 minutos. Essas fêmeas foram dissecadas depois de ocorrer a segunda e terceira cópulas, e nesse caso foi possível observar a presença de espermatozoides na espermateca.

Outra hipótese a se considerar, é que a quantidade de espermatozoides armazenados na espermateca pode variar, podendo ser uma quantidade pequena que não seja suficiente para o preenchimento total do volume da espermateca, como por exemplo, em moscas *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). As fêmeas desta espécie armazenam apenas 24% do

esperma ejaculado pelo macho durante a cópula (Taylor & Yuval 1999). Além disso, o material ejaculado pode ser utilizado mais rapidamente para fertilização dos ovos, e nesse caso para as fêmeas de *T. notata* copuladas apenas uma vez, todo o material seminal liberado pelos machos pode ter sido usado diretamente para fertilização dos ovos sem a necessidade de armazenamento. Assim, o armazenamento somente ocorreria em cópulas subsequentes, quando foi possível observar a presença de secreção e espermatozoides no lúmen da espermateca de fêmeas copuladas múltiplas vezes.

Outros estudos com *T. notata* relacionados ao efeito do número de cópulas e o desempenho reprodutivo da espécie mostram que não há diferença significativa na produção de descendentes entre fêmeas copuladas uma ou múltiplas vezes, confirmando assim que as fêmeas que copulam apenas uma vez utilizam esses espermatozoides para fertilização dos ovos.

Foi possível observar a presença de carboidratos e proteínas no lúmen de espermatecas de *T. notata* através da coloração por H.E. A hematoxilina tem afinidade por elementos ácidos, portanto, cora proteínas, ricas em radicais amina no interior do lúmen da espermateca denominado pela secreção, e ácidos nucleicos, corando os espermatozoides. A eosina é atraída pelos elementos básicos observado no citoplasma das células do epitélio e tecido muscular. Além disso, o conteúdo da espermateca demonstrou reação positiva para teores de carboidratos (P.A.S.) e para os teores de proteínas totais (Xylidine Ponceau).

As substâncias proteicas encontradas na espermateca, sejam elas secretadas pelas fêmeas e/ou liberadas pelos machos, são importantes para manter os espermatozoides viáveis durante toda a vida reprodutiva da fêmea adulta (Schoeters & Billen 2000). Além disso, essas substâncias são importantes fontes de energia para os insetos, pois os carboidratos e as proteínas servem como precursores do metabolismo de diversas substâncias, e sua redução ocasionam efeitos indesejáveis em diversos processos fisiológicos (Oliveira & Cruz-Ladim 2003).



Também, é conhecido que na hora da cópula os machos podem liberar substâncias minerais, água e íons, bem como alomônios (Michaud *et al.* 2013), e metabólicos secundários precursores de prostaglandinas (Worthington *et al.* 2015). Essas substâncias exercem diversas funções como estimulantes de oviposição (Simmons 2011), podem acelerar a taxa de desenvolvimento dos ovariolos bem como a maturação dos ovários nas fêmeas (Obata 1988, Shahid *et al.* 2016), ou até mesmo os machos podem liberar substâncias para inibir uma nova cópula e assegurar a paternidade da descendência (Michaud *et al.* 2013). Este último, não seria o caso de *T. notata*, pois as fêmeas foram capazes de copular várias vezes no mesmo dia.

É possível que os custos gerados para manutenção dos espermatozoides viáveis por um longo período de tempo seja relativamente alto e nesse caso, a fêmea de *T. notata* tenha a preferência em copular mais vezes para garantir a reposição do material seminal do que armazenar espermatozoides por um maior período de tempo na espermateca, já que essa espécie tem uma expressiva longevidade, podendo viver mais de 450 dias sob condições alimentares e ambientais adequadas (Dreyer *et al.* 1997), e mais de 100 dias mesmo sendo condicionada a poligamia. Os custos relacionados à manutenção de espermatozoides viáveis, também poderia explicar a ausência de uma glândula secretora em *T. notata*, que só apresenta na sua espermateca um receptáculo seminal e duto espermático.

A glândula secretora seria um órgão a mais para manter que, em alguns casos pode-se apresentar como uma estrutura maior que a própria espermateca, como ocorre no besouro Chrysomelidae *Luperus calabricus* (Laboissière) (Marzo 2008). Além disso, as fêmeas de *T. notata* têm limitações na capacidade de armazenamento da espermateca, que parece não variar muito em tamanho/volume após uma ou múltiplas cópulas, e fêmeas copuladas uma vez e múltiplas vezes apresentaram semelhanças na morfologia da espermateca. De fato, fêmeas copuladas apenas uma vez ou várias vezes não apresenta diferença significativa na fecundidade e

fertilidade, e a oviposição dura cerca de 50-60 dias após cópula (Cap. 1). Dessa forma, é possível inferir que o material seminal ejaculado nas sucessivas cópulas seja para substituir o material depositado nas primeiras cópulas, já utilizado para fertilização ou não pelas fêmeas, não alterando o número total de descendentes, mas sim a paternidade deles. Entretanto, essa hipótese está sendo investigada em outro estudo para melhor entender o efeito da poligamia na paternidade da descendência de *T. notata*.

Em todos os tratamentos, não foi possível observar apoptose celular do conteúdo da espermateca. Duas hipóteses sustentam o fato dessa análise não apresentar reação à técnica da imunofluorescência. A primeira hipótese, se baseia na reação do corante azul fluorescente diamidino-2-fenilindol (DAPI), que cora os núcleos das células. Principalmente baseado na estrutura gamética com metade do material genético, e no caso dos espermatozoides dos insetos, em que o núcleo não é organizado como ocorre em espermatozoides de mamíferos, formando uma cabeça com material genético altamente condensado (Chapman 2013). Podemos considerar ainda que o processo apoptótico é desencadeado por uma família de proteases, conhecidas como caspases (Grivicich *et al.* 2007) e compreende uma cascata de eventos. Caso no momento do processo de reação do corante, essas proteases não estejam ativas, a detecção da apoptose, seria dificultada.

Outra hipótese é que devido à espermateca ser altamente esclerotizada durante o processo de dissecação, o fixador utilizado (formol tamponado a 10%), não tenha sido absorvido em tempo suficiente que atingisse o interior da espermateca. Observa-se que a maioria das estruturas dos insetos é esclerotizada e, inclusive a espermateca é revestida internamente por uma espessa camada de quitina utilizada para proteção. Nesse caso, é possível que o tempo de absorção do fixador não tenha sido suficiente para manter inativas as reações celulares e, nesse caso, os espermatozoides tenham sido oxidados antes da absorção do fixador.

Em conclusão, a espermateca de *T. notata* mostra estruturas essenciais para que as fêmeas armazenem e regulem a utilização dos espermatozoides na reprodução. Apesar da ausência de glândula secretora, os espermatozoides são nutridos por substâncias proteicas e polissacarídeos, que podem ser responsáveis pela manutenção dos espermatozoides na espermateca até a fertilização dos oócitos. Contudo, muitos questionamentos acerca de como esses espermatozoides são utilizados pelas fêmeas, ainda, não foram esclarecidos necessitando de mais estudos.

### **Agradecimentos**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de mestrado. Ao laboratório de Fisiologia Animal pelo auxílio nas análises de histoquímica e de apoptose. Ao departamento de Biologia Celular e Ultraestrutura, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ) e Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), pelo auxílio para análise de microscopia de varredura.

### **Literatura Citada**

- Barbosa, P.R.R., M.D. Oliveira, J.A. Giorgi, C.S.A. Silva-Torres & J.B. Torres. 2014.** Predatory behavior and life history of *Tenuisvalvae notata* (Coleoptera: Coccinellidae) under variable prey availability conditions. Fla. Entomol. 97: 1026-1034.
- Borowiec, L. & J. Pomorska. 2009.** The structure of the spermathecae of the genus *Stolas* (Coleoptera: Chrysomelidae: Cassidinae: Mesomphaliini) and its taxonomic significance. Ann. Zool. Fenn. 59, 201-221.
- Collins, A.M., V. Williams & J.D. Evans. 2004.** Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. Insect Mol. Biol. 13: 141-146.
- Chapman, R.F., 2013.** The insects: structure and function. Cambridge, Cambridge University Press, 929p.
- Gerber, H.S. & E.C. Klostermeyer. 1970.** Sex control by bees: a voluntary act of egg fertilization during oviposition. Science 167: 82-84.

- González, G. 2007.** Los Coccinellidae de Perú [online]. Disponible en World Wide Web: <http://www.coccinellidae.cl/paginasWebPeru/Paginas/InicioPeru.php>.
- Grassé, P.P. 1977.** L'accouplement et l'insémination, p. 331-349. In P.P. Grasse. (ed.), Traite de Zoologie, Editora Paris, 502p.
- Grivicich, I., A. Regner & A.B. Rocha. 2007.** Apoptosis: Programmed Cell Death. Rev. Bras. Cancerol. 53: 335-343.
- Huang, N., S. Civciristov, C.J. Hawkins & R.J. Clem. 2013.** SfDronc, an initiator caspase involved in apoptosis in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. Insect Biochem. Molec. Biol. 43: 444-454.
- Hodek, I. & A. Honek. 2009.** Scale insects, mealybugs, whiteflies and psyllids (Hemiptera, Sternorrhyncha) as prey of ladybirds. Biol. Control 51: 232-243.
- Junqueira, L.C.U. & L.M.M.S. Junqueira, 1983.** Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo, Guanabara Koogan, 123p.
- Marzo, L. 2008.** Biodiversita della spermateca nei Coleotteri. Atti Accad. Nazi. 56: 69-96.
- Michaud, J.P., M. Bista, G. Mishra, O. Singh. 2013.** Sexual activity diminishes male virility in two *Coccinella* species: Consequences for female fertility and progeny development. Bull. Entomol. Res. 103: 570-577.
- Mulsant, E. (1850).** Species des Coleopteres trimeres securipalpes. Ann. Sci. Phys. Nat. Lyon 2: 1-1104.
- Obrycki, J.J., J.D. Harwood, T.J. Kring, R.J. O'Neil. 2009.** Aphidophagy by Coccinellidae: application of biological control in agroecosystems. Biol. Control 51: 244-254.
- Oliveira, V.T.P. & C. Cruz-Landim. 2003.** Morphology and function of insect fat body cells: a review. Biociência 11: 195-205.
- Omkar, S.K. Sing & G. Mishra. 2010.** Multiple matings affect the reproductive performance of the aphidophagous ladybird beetle, *Coelophora saucia* (Coleoptera: Coccinellidae). Eur. J. Entomol. 107: 177-182.
- Pascini, T.V., J.M. Ramalho-Ortigao & G.F. Martins. 2012.** The fine structure of the spermatheca in *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). Ann. Entomol. Soc. Am. 106: 857-867.
- Pascini, T.V. & G.F. Martins. 2016.** The insect spermatheca: an overview. Zoology p. 1-17.
- Pearse, A.G.E. 1960.** Hystochemistry: theoretical and applied. London, Churchill, 998p.

- Peronti, A.L.B.G., N.M. Martinelli, J.G. Alexandrino, A.L. Marsaro Júnior, A.M. Penteado-Dias & L.M. Almeida. 2016.** Natural enemies associated with *Maconellicoccus hirsutus* (Hemiptera: Pseudococcidae) in the state of São Paulo, Brazil. Fla. Entomol. 99: 21-25.
- Pimenta, P.F.P. & W. Souza. 1985.** Fine structure and cytochemistry of endoplasmatic reticulum and its association with the plasma membrane of *Leishmania mexicana amazonensis*. J. Submicrosc. Cytology 17: 413-9.
- Putman, W.L. 1955.** Bionomics of *Stethorus punctillum* Weise (Coleoptera: Coccinellidae) in Ontario. Can. Entomol. 87: 09-33.
- Sanches, N.F. & R.S. Carvalho. 2010.** Procedimentos para manejo da criação e multiplicação do predador exótico *Cryptolaemus montrouzieri*. Cruz das Almas, EMBRAPA, 5p. (Circular Técnica 99).
- Shahid, M., A. Siddiqui, S.K. Omkar & G. Mishra. 2016.** Mating alters the rate of development of ovarioles in the ladybird, *Propylea dissecta* (Coleoptera: Coccinellidae). Eur. J. Entomol. 113: 44-50.
- Schoeters, E. & J. Billen. 2000.** The importance of the spermathecal duct in bumble bees. J. Insect. Physiol. 46: 1303-1312.
- Soller, M., M. Bownes & E. Kubli. 1999.** Control of oocyte maturation in sexually mature *Drosophila females*. Devolp. Biol. 208: 337-351.
- Solomon, R.W. 2009.** Free and open source software for manipulation of digital images. Am. J. Roentgenol, 192: 330-334.
- Suzuki, N., T. Okuda & H. Shinbo. 1996.** Sperm precedence and sperm movement under different copulation intervals in the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. 42, 199-204.
- Taylor, P. & B. Yuval. 1999.** Postcopulatory sexual selection in Mediterranean fruit flies: advantages for large and protein-fed males. Anim. Behav. 58, 247-254.
- Thornhill, R. & J. Alcock. 1983.** The evolution of insect mating systems. Massachusetts, Harvard University Press, 325p.
- Worthington, A.M., R.A Jurenka & C.D. Kelly. 2015.** Mating for male-derived prostaglandin: a functional explanation for the increased fecundity of mated female crickets? J. Exp. Biol. 218: 2720-2727.

Tabela 1. Média (+EP) de pixels para polissacarídeos neutros e proteínas na secreção de espermatecas de *Tenuisvalvae notata* após uma e três cópulas.

Tratamentos <sup>1</sup>	Primeira cópula	Terceira cópula	Estatística
Proteínas	135,58 ± 7,64	123,98 ± 6,78	t <sub>1</sub> = 1,29; P = 0,31
Carboidratos neutros	114,03 ± 9,05	121,83 ± 5,74	t <sub>1</sub> = 1,23; P = 0,32

<sup>1</sup>Médias analisadas na linha (T Student,  $\alpha = 0,05\%$ ).

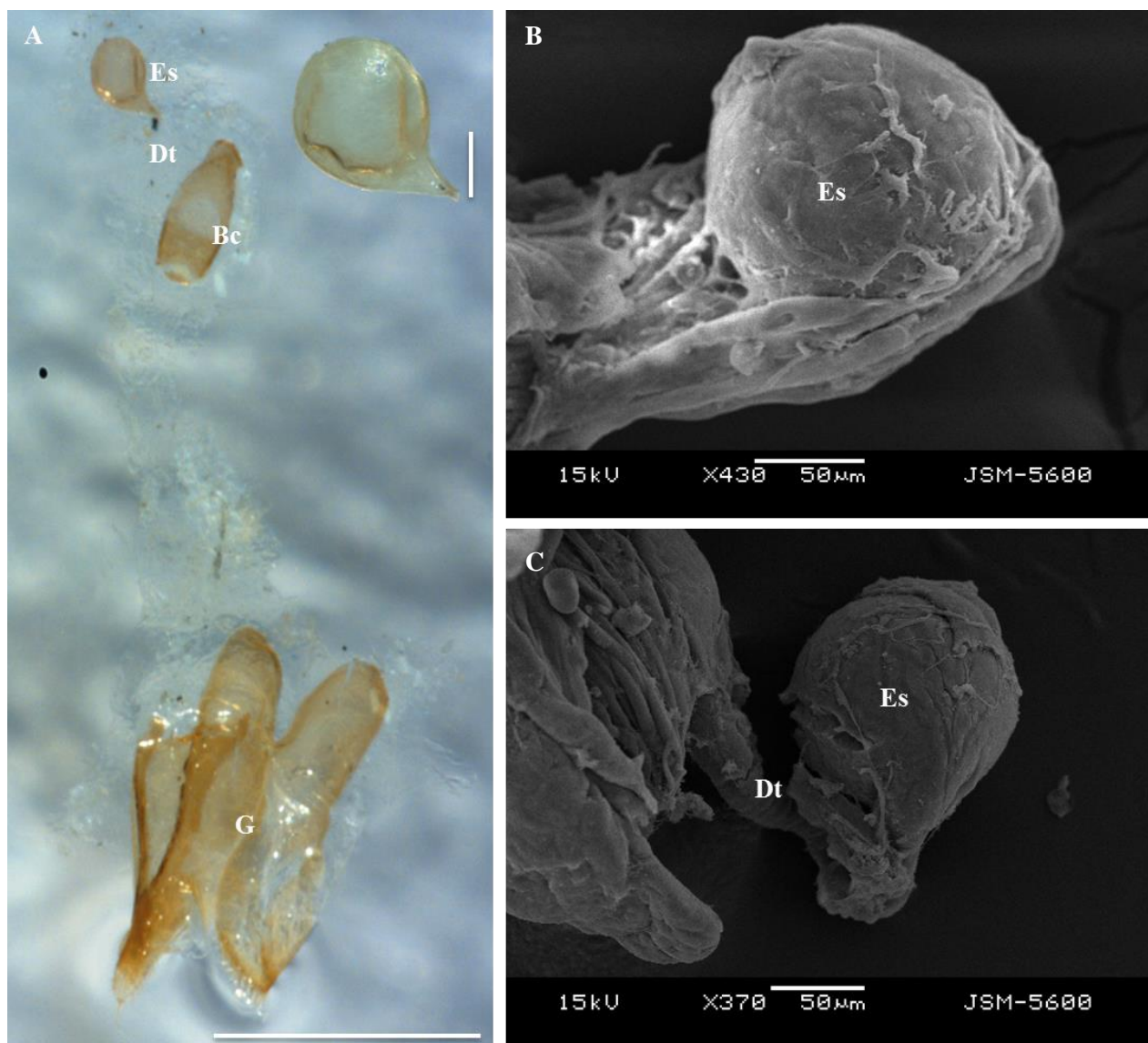


Figura 1. Morfologia de espermatecas de *Tenuisvalvae notata*. (A) estrutura a fresco do aparelho reprodutor. Detalhe na espermateca com maior aumento. Barra: 50 µm. (B) Microscopia eletrônica de varredura de espermateca de fêmeas virgens (C) e com três cópulas. Es – Espermateca, Bc – Bursa copulatrix, Dt – Duto, G – genitália. Barra: A = 1 mm; B e C = 50 µm.

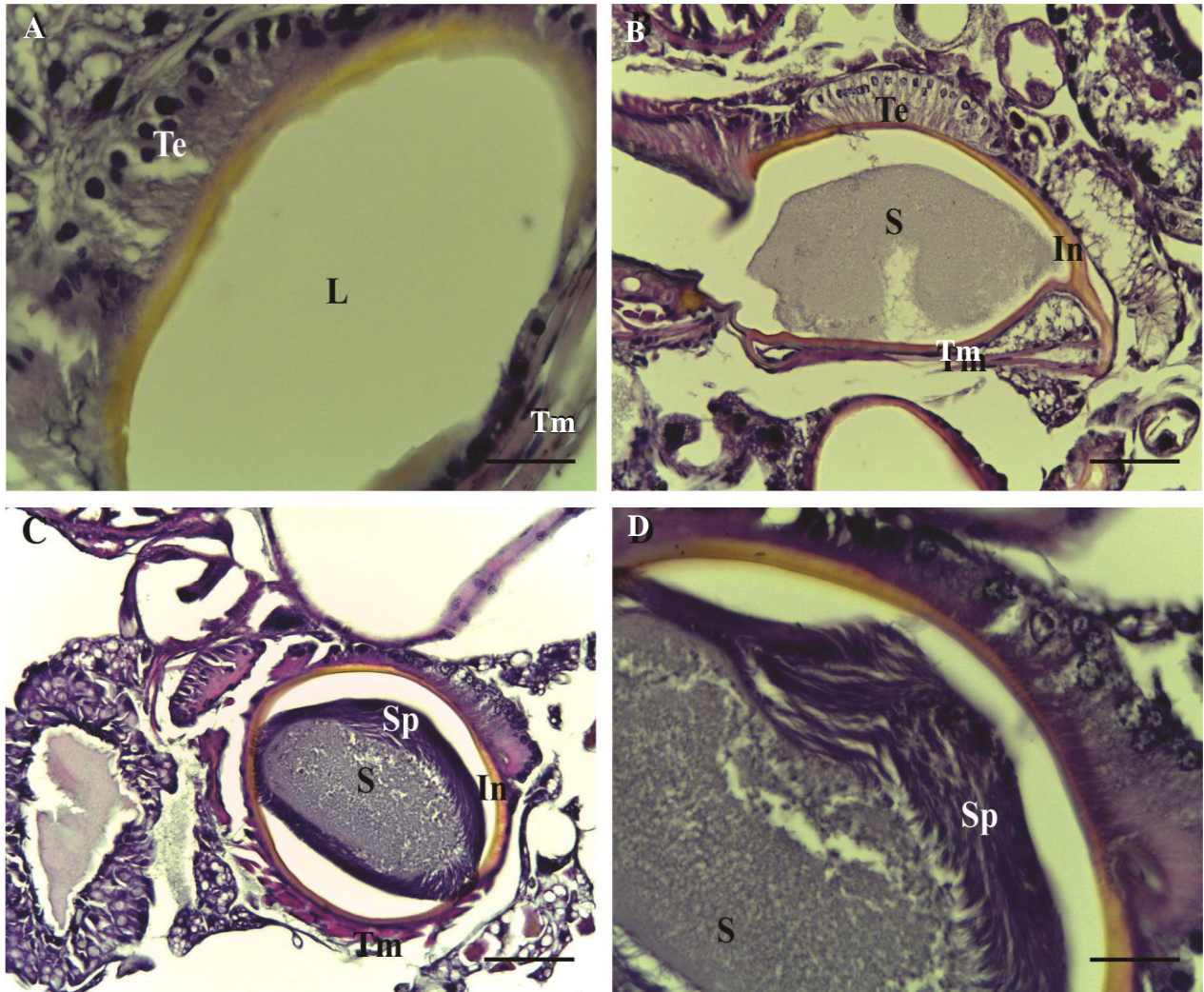


Figura 2. Histologia de espermatecas de *Tenuisvalvae notata* coradas em H.E. (A) Espermateca de fêmeas virgens. (B) Espermateca de fêmeas com uma cópula. (C) Espermateca de fêmeas com três cópulas. (D) Detalhe da espermateca com três cópulas mostrando a presença de espermatozoides. Te – Tecido epitelial, Tm – Tecido muscular, In – íntima, L – lúmen da espermateca, S – secreção, Sp – espermatozoides. Barra: A e D = 20  $\mu$ m; B e C = 50  $\mu$ m.



## CAPÍTULO 4

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados encontrados em nossos estudos, podemos sugerir que apesar de ser poligâmica, *T. notata* pode ser monogâmica se for dada uma chance, escolhendo acasalar preferencialmente com o mesmo parceiro sexual, previamente conhecido. A poligamia nessa espécie tem custos, como a redução da sobrevivência das fêmeas. Entretanto, é mantida provavelmente porque eles são naturalmente de longa duração, podendo viver mais de um ano, ocorrem em colônias o que facilita o encontro entre múltiplos parceiros, e para aumentar ganho em material genético assegurando a produção de uma progênie geneticamente diversificada e mais segura contra a perda de condicionamento físico. Além disso, a poligamia possa ser mantida nessa espécie, pois os custos gerados para manutenção dos espermatozoides viáveis por um longo período de tempo na espermateca seja considerado, e nesse caso, a fêmea tenha a preferência em copular mais vezes do que armazenar espermatozoides por um maior período de tempo. Ao contrário do esperado, o aumento no número de cópulas em curto prazo não levou a um ganho reprodutivo significativo em *T. notata*, mas a idade parece ser um fator preponderante, pois as fêmeas mais jovens copuladas apenas uma vez tiveram maior fecundidade e fertilidade que fêmeas mais velhas. Os resultados aqui obtidos podem contribuir para um melhor entendimento do modo de reprodução em Coccinellidae, em especial de *T. notata*. E ainda, pode auxiliar no incremento da produção massal de *T. notata* e futuras liberações em campo. Estudos futuros, ainda, relacionados à reprodução em *T. notata* servirão para melhor esclarecer o efeito da poligamia na paternidade.