

## ECOLOGY, BEHAVIOR AND BIONOMICS

### *Podisus nigrispinus* Requer Cópulas Longas para o Sucesso Reprodutivo

AGNA R S RODRIGUES<sup>1</sup>, JORGE B TORRES<sup>1\*</sup>, HERBERT A A SIQUEIRA<sup>1</sup>, VALÉRIA W TEIXEIRA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Depto. de Agronomia – Entomologia, Univ. Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE; agnarodrigues@yahoo.com.br; jtorres@depa.ufrpe.br; siqueira@depa.ufrpe.br

<sup>2</sup>Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal, Univ. Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE; valeria@dmfa.ufrpe.br; \*autor correspondente

*Edited by Wesley A C Godoy – ESALQ/USP*

*Neotropical Entomology 38(6):746-753 (2009)*

#### *Podisus nigrispinus* (Dallas) (Hemiptera: Pentatomidae) Requires Long Matings for Successful Reproduction

**ABSTRACT** - The occurrence of multiple and long matings seem to play an important role in the reproduction of the predatory stinkbugs such as *Podisus nigrispinus* (Dallas). However, the mechanisms underlying these behaviors remain unclear. In this study, the reproduction of *P. nigrispinus* was investigated as function of females' choice for their mating pair based on male body size and previous mating status, risk of predation and duration of mating. The female mating behavior was studied with female having multiple, partial or no partner choice based on male body size. Time to initiate a mating and its duration was observed after pairing males and females under risk of predation imposed by the presence of the predatory wasp *Polistes versicolor* Oliver. In addition, aiming to determine the reasons for long lasting matings, female had their mating interrupted at different intervals. Our data indicated that *P. nigrispinus* females do not select male partners as function of their body size and mating status. Duration of mating, mating partners' choice, and female fecundity and fertility were not influenced by the male size and risk of predation imposed by the predatory wasps. Mating interrupted after 30, 60, 120 and 240 min resulted in only 0, 3.1, 7.7 and 34% of egg hatching compared to 74.2% under uninterrupted mating (338 to 671 min long). Therefore, the reproductive success of *P. nigrispinus* females does not depend on male size and male mating status, but requires long-lasting mating as a condition for adequate spermatozoa transference to females instead.

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

**RESUMO** - A realização de múltiplas e longas cópulas parece ser importante para a reprodução de percevejos predadores como *Podisus nigrispinus* (Dallas), mas o comportamento governando essas características permanece desconhecido. Neste estudo foram investigados o comportamento de cópula e a reprodução de *P. nigrispinus* em função do tamanho do macho, seu status prévio de acasalamento, risco de predação e interrupção de cópulas. A escolha da fêmea para o acasalamento foi estudada sob múltipla escolha, parcial ou sem chance de escolha por machos grandes ou pequenos. O comportamento para o início do acasalamento e tempo de cópula sob risco de predação quando na presença de *Polistes versicolor* Oliver foi comparado àquele de casais sem risco de predação. Machos e fêmeas de *P. nigrispinus* acasalaram independentemente do tamanho e status prévio de acasalamento dos machos, além de não apresentarem preferência por parceiros. A duração da cópula, escolha do parceiro e fertilidade das fêmeas não foram influenciadas pelo tamanho do macho, nem a presença do predador alterou o comportamento de acasalamento e duração de cópula. Fêmeas com cópulas interrompidas após 30, 60, 120 e 240 min apresentaram baixa viabilidade de ovos (0; 3,1; 7,7 e 34%, respectivamente), enquanto aquelas com tempo natural de cópula (338 a 671 min) obtiveram 74,2% de viabilidade. Portanto, o sucesso reprodutivo de *P. nigrispinus* não depende do tamanho do macho ou de seu status de acasalamento, mas requer longas cópulas para a transferência de espermatozoides.

**PALAVRAS-CHAVE:** Asopinae, múltipla cópula, tamanho do macho, reprodução

Para muitas espécies de insetos, a ocorrência de múltiplas cópulas sugere que uma ou poucas cópulas não sejam suficientes para que as fêmeas obtenham esperma suficiente para a produção do número máximo de descendentes em

um evento reprodutivo (Ridley 1990). Além de obter maior quantidade de esperma, pelo menos outros dois benefícios têm sido demonstrados para as fêmeas que realizam múltiplas cópulas, o ganho em material genético e em material nutricional (Reynolds 1996). O ganho em material genético manifesta-se pela manipulação da paternidade dos descendentes (Edvardsson & Arnqvist 2000), diminuição da incompatibilidade de genótipos (Zeh & Zeh 1996) e impedimento de consanguinidade (Tregenza & Wedell 2002). Quanto ao ganho de nutrientes, machos de algumas espécies transferem para as fêmeas substâncias acessórias contidas no material seminal que são utilizadas no processo de respiração celular e vitelogenese (Koshiyama *et al* 1996), na oviposição (Herndon & Wolfner 1995), na ativação (Osanaï & Chen 1993) e manutenção da viabilidade dos espermatozoides durante seu armazenamento na espermateca (Tram & Wolfner 1999). Embora múltiplas cópulas possam resultar em benefícios para as fêmeas, esse comportamento também pode gerar desvantagens, tais como o aumento da alocação de energia e tempo para a procura de parceiros (Thornhill & Alcock 1983, Arnqvist 1989), o aumento do risco de predação e injúrias físicas provocadas pelos machos (Arnqvist 1989, Crudgington & Siva-Jothy 2000), o maior risco de contaminação por patógenos (Rolff & Siva-Jothy 2002) e o efeito tóxico de substâncias transferidas junto ao material seminal (Chapman *et al* 1995).

Fêmeas do percevejo predador *Podisus nigrispinus* (Dallas) realizam múltiplas e longas cópulas (Torres *et al* 1997, Rodrigues *et al* 2008), sendo a longevidade das fêmeas reduzida com o aumento no número de cópulas (Torres *et al* 1997, Sousa-Souto *et al* 2006). Consequentemente, fêmeas que acasalam com menor frequência são mais fecundas, produzindo, em média, 150 ovos a mais do que fêmeas continuamente acasaladas (Torres *et al* 1997).

Os caracteres utilizados pelas fêmeas de *P. nigrispinus* para selecionar o parceiro ainda não são conhecidos. Contudo, em insetos, o tamanho do macho é um dos traços mais favorecidos e relatados com sucesso de paternidade em situações nas quais a fêmea pode escolher o parceiro (Andersson 1994). Usualmente, o número de descendentes produzidos por fêmeas que copularam com intensidade distinta é utilizado como forma de avaliar a necessidade e os benefícios de múltiplas cópulas (Harano *et al* 2006). Múltiplas cópulas e o entendimento de seleção sexual têm sido revisados, notadamente com enfoque na reprodução diferencial entre machos (Arnqvist & Danielson 1999). Assim, a reprodução diferencial entre machos pode ser resultante dos dois mecanismos da seleção sexual: a competição entre machos e a escolha da fêmea (Thornhill & Alcock 1983). Em múltiplas cópulas, as fêmeas podem escolher machos que trazem maiores benefícios (Berrigan & Locke 1991, Parker & Simmons 1994). Para alguns insetos, recursos oferecidos como território, morfologia genital, peso e tamanho do macho ou o tamanho de estruturas relacionadas ao comportamento de coorte são sexualmente selecionados e estão associados ao sucesso de cópula (Andersson 1994, Andersson & Iwasa 1996, Tadler *et al* 1999, Žunič *et al* 2008). Neste estudo, duas hipóteses foram testadas: 1) fêmeas de *P. nigrispinus* ao realizar múltiplas cópulas escolhem machos que oferecem maiores

benefícios para o seu sucesso reprodutivo e longevidade. Assim, a seleção do parceiro é direcionada pelo tamanho e status prévio de acasalamento do macho; e 2) longas cópulas estão relacionadas ao comportamento do macho em guardar as fêmeas de futuras cópulas, visto que os oócitos formados seriam fertilizados no período de guarda (De Clercq & Degheele 1997). Desta forma, o presente estudo objetivou investigar se fêmeas de *P. nigrispinus* emprega o tamanho e status de acasalamento do macho como características para a escolha do parceiro.

## Material e Métodos

Adultos de *P. nigrispinus* foram mantidos de acordo com Torres *et al* (2006), em condições controladas de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e 12h de fotofase. Ninfas de segundo ínstar foram separadas em potes plásticos de 500 ml ou em gaiolas de acrílico. Pupas de *Tenebrio molitor* L. ou lagartas do curuquerê-do-algodoeiro, *Alabama argillacea* (Hübner), foram oferecidas em abundância como alimento durante toda a fase ninfal. Nos experimentos descritos a seguir foram utilizados apenas indivíduos adultos de idade, tamanho e peso conhecidos. Manipulando a densidade de indivíduos no recipiente de criação das ninfas foi possível obter machos adultos com variação de tamanho e peso desejado.

**Influência do tamanho do macho na escolha da fêmea - chance de múltipla escolha.** A influência do tamanho do macho no processo de seleção sexual foi avaliada em adultos virgens de *P. nigrispinus* com quatro dias de idade, visto que ambos são receptivos à cópula a partir dos três dias de idade adulta (Carvalho *et al* 1994). O peso das fêmeas utilizadas variou de 70 mg a 80 mg, sendo os machos divididos em duas categorias: pequenos (< 40 mg) ou grandes (> 50 mg). Após a segunda cópula, os machos foram mortos por congelamento e a distância entre os espinhos do escutelo foi utilizada como estimativa do tamanho do inseto para as análises de relação entre tamanho e peso dos indivíduos.

O experimento com múltipla chance de escolha foi realizado com 60 casais divididos em três gaiolas contendo 20 casais/cada (i.e., 20 fêmeas, 10 machos pequenos e 10 machos grandes). Os insetos foram marcados no dorso com etiquetas numeradas (~2 mm de diâmetro), e liberados em gaiolas de acrílico transparente (31 x 43 x 44 cm) para observação da escolha e duração do período de cópula. Com o término da cópula, os insetos que acasalaram foram mantidos individualmente. Após o período de 15 dias, os insetos que acasalaram foram novamente liberados em gaiolas de acrílico, com a finalidade de se obter o reacasalamento.

Em cada observação, foram registrados o tamanho do macho selecionado para primeira e segunda cópula, a duração do período de cópula e a preferência de parceiro, parâmetro definido quando a fêmea escolhia o mesmo macho para a segunda cópula ou machos de mesma categoria de tamanho entre aqueles oferecidos.

Durante o período entre as cópulas (i.e., 15 dias), as fêmeas e machos foram mantidos individualizados em potes plásticos de 500 ml. Os indivíduos foram alimentados com pupas de *T. molitor*, vagem de feijão e água. As fêmeas foram

mantidas e observadas a cada dois dias com substituição da presa consumida, coleta das posturas e contagem de fêmeas sobreviventes. As posturas foram retiradas dos potes utilizando um chumaço de algodão e os ovos contados. Cada postura foi mantida isolada em placas de Petri, para avaliar a eclosão de ninfas.

**Influência do tamanho e status prévio de acasalamento do macho na escolha da fêmea - chance parcial de escolha.** Os adultos utilizados neste experimento foram selecionados como mencionado anteriormente, sendo os mesmos marcados no dorso com etiquetas numeradas. Cada fêmea foi acondicionada em gaiolas plásticas transparente de 1 L com dois machos. Em dois grupos experimentais, as fêmeas não tinham a possibilidade de escolha, i.e., acasalar com um dos dois machos grandes ou com um dos dois machos pequenos (testemunhas). No terceiro grupo experimental, as fêmeas tinham a possibilidade de escolher entre machos de tamanho distinto (grande ou pequeno). Após o término da primeira cópula, as fêmeas foram retiradas e uma segunda fêmea virgem foi imediatamente introduzida no recipiente, podendo então optar por um macho ainda virgem ou por um macho com experiência de cópula. Para a primeira e segunda fêmea, foram avaliadas a escolha do macho pela fêmea e a duração do período de cópula. Após 15 dias, a primeira fêmea oferecida foi liberada nas gaiolas, juntamente com os machos em cada grupo experimental, sendo realizados novos registros para a escolha da fêmea, duração do período de cópula e preferência de parceiro. Durante o período experimental, machos e fêmeas do predador foram mantidos em condições semelhantes às descritas anteriormente.

**Risco de predação e comportamento de cópula.** Adultos de *P. nigrispinus* foram submetidos ao risco de predação e avaliados quanto à duração da cópula. O risco de predação consistiu na presença da vespa predadora *Polistes versicolor* Olivier junto aos indivíduos de *P. nigrispinus*. Ninhos com cinco a seis vespas adultas foram coletados nas instalações do campus da UFRPE. Para isso, utilizaram-se sacolas de papel de 2 L e ao anoitecer (entre 18:00h e 19:00h). Em cada gaiola de acrílico transparente (31 x 43 x 44 cm), contendo áreas para ventilação, foi introduzido um ninho com cinco a seis vespas. Os ninhos das vespas foram fixados na parte superior da gaiola em posição semelhante àquela em que estavam presos ao substrato original. No interior da gaiola, foram introduzidos dois ponteiros de algodão, com cerca de 20 cm de altura, com folhas jovens e com cinco a oito folhas completamente desenvolvidas. Os ponteiros foram acondicionados em frascos de vidro de 50 ml contendo água para evitar a murcha precoce das folhas. Lagartas de *A. argillacea* de terceiro/quarto ínstar foram liberadas sobre os ponteiros de algodão como presas para os percevejos e vespas predadoras.

O risco de predação (presença da vespa na gaiola) consistiu na observação da duração de cópula em duas condições: risco de predação para iniciar a cópula (i) e risco de predação após iniciada a cópula (ii). O risco de predação para iniciar a cópula foi estudado observando 40 casais divididos em quatro repetições de 10 casais por gaiola

contendo as vespas. Na condição risco de predação após iniciada a cópula, o pareamento foi realizado anteriormente à introdução dos pares nas gaiolas contendo as vespas. Essas condições foram comparadas com uma terceira situação onde fêmeas e machos foram liberados nas gaiolas sem vespas (indivíduos sem risco de predação).

**Tempo de cópula.** Foram utilizados adultos virgens com quatro dias de idade para investigar o efeito da interrupção da cópula no sucesso reprodutivo de fêmeas de *P. nigrispinus*. Os insetos foram liberados em gaiolas de acrílico transparente permitindo a livre escolha de parceiros. Logo após o início da cópula, os casais foram retirados e distribuídos aleatoriamente para compor cinco grupos experimentais com os diferentes tempos de duração de cópula: casais com cópula interrompida aos 30, 60, 120 e 240 min, e casais em que a cópula não foi interrompida ( $n = 14$  casais para cada grupo). Após atingirem o tempo para interrupção da cópula, os casais foram separados e as fêmeas mantidas em potes plásticos de 500 ml, recebendo a mesma alimentação empregada nos experimentos anteriores. As posturas foram coletadas e mantidas em placas de Petri para quantificação da porcentagem de eclosão, como medida indireta da transferência de espermatozoides para as fêmeas.

**Análises.** Para testar a relação entre peso de machos selecionados (pequeno e grande) e seu tamanho (dado pela distância entre os espinhos dorsais) foi conduzida análise de correlação utilizando-se o Proc CORR do SAS. Os resultados de escolha do macho pela fêmea com um parceiro foram analisados usando o Proc FREQ do SAS e interpretados pelo resultado do teste de qui-quadrado, considerando que a frequência 50:50 indica a inexistência de escolha por uma das categorias de machos (grandes ou pequenos).

As características de comportamento e de reprodução avaliadas, como duração de cópula, número de ovos e ninfas produzidas, longevidade da fêmea e viabilidade de ovos foram submetidas à análise de variância (Proc ANOVA) ou teste t (Proc TTEST), após serem submetidas aos testes de Kolmogorov e Bartlett para normalidade e homocedasticidade, respectivamente. O efeito do risco de predação na frequência de cópula após a exposição às vespas predadoras nas gaiolas foi analisado pelo Proc FREQ do SAS e teste de qui-quadrado. A duração de cópula para os casais expostos ao risco de predação antes do início da cópula, após terem iniciado a cópula e sem risco de predação foi submetida à análise de variância via o Proc ANOVA, comparando-se os três tratamentos. Os resultados obtidos das fêmeas submetidas à interrupção do tempo de cópula, como período de pré-oviposição, produção de ovos e ninfas (variáveis dependentes) e intervalos de interrupção de cópula (variável independente), foram submetidos à análise de regressão pelo Proc REG do SAS. O efeito da interrupção da cópula na longevidade da fêmea foi analisado através de análise de variância (Proc ANOVA) do SAS. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa SAS Version 8.02 (SAS Institute 2001).

## Resultados

**Influência do tamanho do macho na escolha da fêmea - chance de múltipla escolha.** O peso dos machos foi, em média, de 38,1 mg para machos pequenos (tamanho médio de 5,4 mm) e de 53,4 mg para machos grandes (tamanho médio de 5,9 mm), havendo relação positiva entre tamanho e peso ( $r = 0,77$ ;  $P < 0,0001$ ).

Entre as fêmeas e machos pareados, 10% das fêmeas não acasalaram pela primeira vez. Portanto, de 60 pareamentos, foram observados 54 acasalamentos. A frequência de escolha entre machos grandes e pequenos pelas fêmeas em condição de múltipla escolha foi similar tanto na primeira cópula ( $\chi^2 = 0,33$ ;  $P = 0,563$ ) quanto na segunda cópula ( $\chi^2 = 0,05$ ;  $P = 0,819$ ). Fêmeas que escolheram machos grandes ou machos pequenos na primeira cópula, mantiveram a mesma tendência para escolha de machos grandes ( $\chi^2 = 2,66$ ;  $P = 0,102$ ) e pequenos ( $\chi^2 = 1,87$ ;  $P = 0,172$ ) na segunda cópula. Entre as 38 fêmeas acasaladas pela segunda vez, apenas 13% ( $n = 5$ ) mantiveram a mesma escolha pelo tamanho do macho (grande ou pequeno) na segunda cópula.

O tamanho do macho não influenciou a duração de cópula na primeira ( $t_{42,5} = -1,42$ ;  $P = 0,163$ ) ou segunda cópula da fêmea ( $t_{25,5} = -1,07$ ;  $P = 0,295$ ) (Fig 1A). Contudo, na análise sem distinção do efeito do tamanho do macho na duração da cópula, os machos de *P. nigrispinus* investiram mais tempo na primeira cópula realizada ( $F_{1,88} = 10,1$ ;  $P = 0,002$ ) (Fig 2).

As características reprodutivas de fêmeas de *P. nigrispinus*, realizando as duas cópulas ( $n = 37$ ) no 4º e 19º dia de idade

não foram afetadas pelas classes de tamanhos dos machos utilizados. A longevidade das fêmeas foi, em média, 55,4 a 64,2 dias ( $F_{2,34} = 1,180$ ;  $P = 0,320$ ); o número de ovos produzidos foi de 507,3 a 621,8 ( $F_{2,34} = 0,820$ ;  $P = 0,449$ ); e o número de ninfas de 428,3 a 513,2 ( $F_{2,34} = 0,380$ ;  $P = 0,688$ ).

**Influência do tamanho e status prévio de acasalamento do macho na escolha da fêmea - chance parcial de escolha.** Machos selecionados para este experimento também apresentaram relação positiva entre tamanho e peso ( $r = 0,78$ ;  $P < 0,0001$ ) (macho pequeno: 37,4 mg e 5,3mm; macho grande: 53,7 mg e 5,8 mm), assim como encontrado no estudo de múltipla escolha.

A escolha do macho pela fêmea para realizar a segunda cópula foi similar quando as fêmeas foram pareadas aos machos de mesma categoria de peso: dois machos grandes ( $\chi^2 = 0,13$ ;  $P = 0,723$ ) ou dois machos pequenos ( $\chi^2 = 0,04$ ;  $P = 0,844$ ), ou com machos grandes e pequenos na primeira ( $\chi^2 = 0,22$ ;  $P = 0,643$ ) e na segunda cópula ( $\chi^2 = 0,03$ ;  $P = 0,864$ ). Para fêmeas com escolha inicial, seja por macho grande ou macho pequeno, a realização da segunda cópula permaneceu na mesma proporção para machos grandes ( $\chi^2 = 0,25$ ;  $P = 0,614$ ) e para machos pequenos ( $\chi^2 = 0,05$ ;  $P = 0,813$ ). Entre as fêmeas acasaladas pela segunda vez, 53% delas ( $n = 9/17$ ) não demonstraram preferência de parceiro entre primeira e segunda cópula. O efeito do status prévio de acasalamento do macho não alterou o comportamento de escolha da fêmea. A escolha da segunda fêmea virgem foi similar tanto nas situações sem escolha, dois machos grandes ( $\chi^2 = 0,03$ ;  $P = 0,864$ ), dois machos pequenos ( $\chi^2 = 0,03$ ;  $P = 0,864$ ) como na

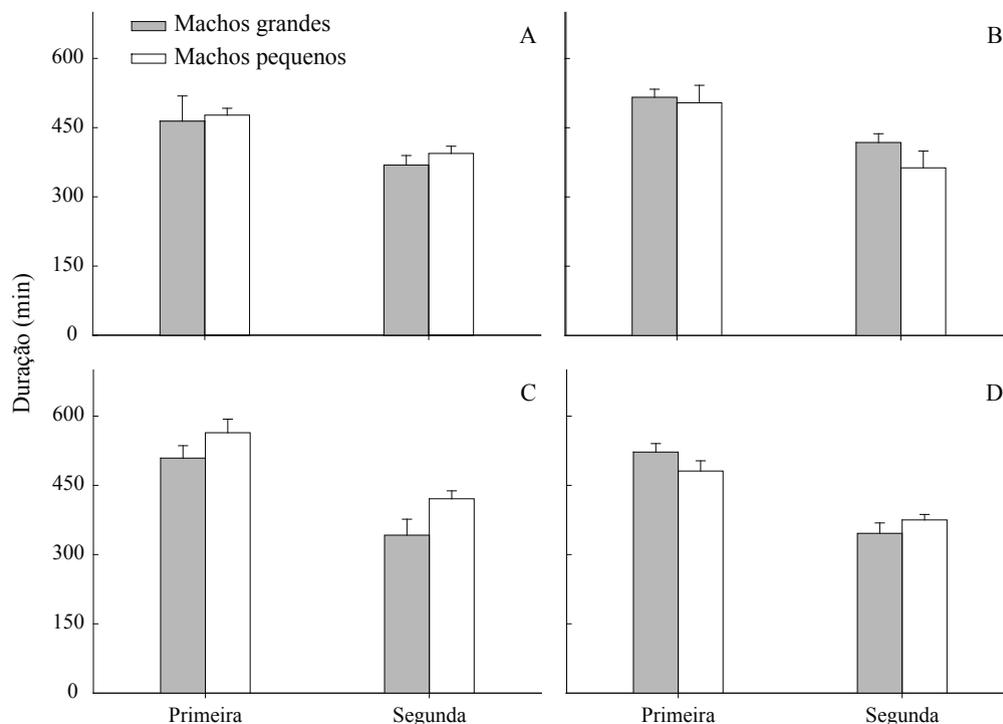


Fig 1 Duração média de cópula (+EP) para fêmeas de *Podisus nigrispinus* acasalando com machos de diferentes classes de peso, com chance de múltipla escolha (A), sem chance de escolha (B), com chance parcial de escolha (C) e em cópulas sucessivas (D). Barras sem letras, não diferem entre si, e barras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

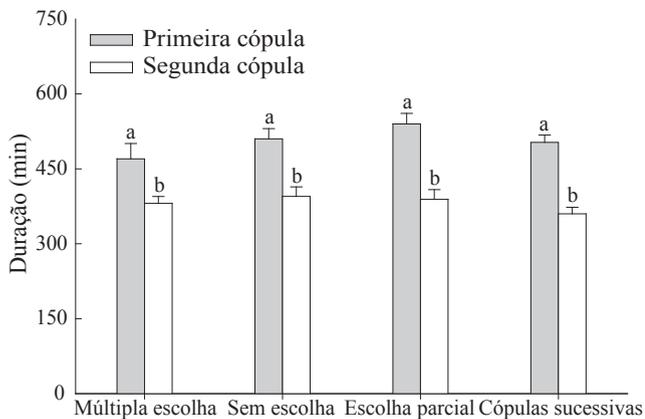


Fig 2 Duração média da primeira e segunda cópula (+EP) de fêmeas de *Podisus nigrispinus* sob diferentes possibilidades de escolha do parceiro independente do tamanho do macho. Barras sob diferentes letras diferem estatisticamente pelo teste t ( $P < 0,05$ ).

situação com chance parcial de escolha, um macho grande e um macho pequeno ( $\chi^2 = 0,04$ ;  $P = 0,515$ ).

Também, quando na situação sem chance de escolha, o tamanho do macho não influenciou a duração de cópula na primeira ( $t_{25,3} = 0,29$ ;  $P = 0,775$ ) ou segunda cópula ( $t_{15,5} = 1,34$ ;  $P = 0,199$ ) (Fig 1B). Para fêmeas em chance parcial de escolha, a duração da primeira ( $t_{18,9} = -1,39$ ;  $P = 0,181$ ) e segunda ( $t_{1,4} = -1,82$ ;  $P = 0,091$ ) cópulas não foram influenciadas pelo tamanho do macho.

O tamanho do macho não influenciou a duração da primeira ( $F_{1,25} = 2,08$ ;  $P = 0,162$ ) e da segunda cópula ( $F_{1,25} = 1,25$ ;  $P = 0,275$ ) quando em cópulas sucessivas com a primeira e segunda fêmea virgem (Fig 1D). Entretanto, independentemente do tamanho, os machos apresentaram maior investimento de tempo em todas as condições: para a primeira cópula sem chance de escolha ( $F_{1,61} = 15,30$ ;  $P < 0,001$ ), com chance parcial de escolha ( $F_{1,52} = 2,92$ ;  $P = 0,043$ ) ou em cópulas sucessivas ( $F_{1,50} = 54,19$ ;  $P < 0,001$ ) (Fig 2).

As características reprodutivas da primeira fêmea realizando as duas cópulas ( $n = 46$  fêmeas) aos quatro e 19 dias de idade não foram afetadas pelas classes de tamanhos dos machos utilizados. A longevidade das fêmeas foi, em média, de 45,7 a 51,9 dias ( $F_{2,43} = 0,40$ ;  $P = 0,670$ ); o número de ovos produzidos foi de 397,8 a 448,5 ( $F_{2,43} = 0,30$ ;  $P = 0,746$ ); e o número de ninfas de 301,8 a 351,1 ( $F_{2,43} = 0,39$ ;  $P = 0,678$ ).

A duração para a realização da segunda cópula pelo macho foi, em média, de 44,4 a 58,2 min e não variou entre machos de tamanho distintos ( $F_{1,25} = 0,04$ ;  $P = 0,836$ ). Apesar desse curto intervalo de tempo observado entre cópulas para ambos os tamanhos de machos, o sucesso reprodutivo das fêmeas não foi alterado. Em média, a longevidade das fêmeas foi de 35,0 a 43,9 ( $F_{1,25} = 1,94$ ;  $P = 0,176$ ); produção de ovos de 264,2 a 308,8 ( $F_{1,25} = 0,68$ ;  $P = 0,416$ ); e produção de ninfas de 197,8 a 221,5 ( $F_{1,25} = 0,33$ ;  $P = 0,572$ ), para ambos os tamanhos de machos.

**Risco de predação e comportamento de cópula.** A presença de vespas não inibiu o início da cópula para os casais que foram expostos ao risco de predação antes de iniciarem o

acasalamento ( $n = 37$ ), comparado àqueles sem risco ( $n = 29$ ) ( $\chi^2 = 0,48$ ;  $P = 0,485$ ). Da mesma forma, a duração de cópula foi semelhante nas diferentes situações avaliadas, com risco e sem risco de predação ( $F_{2,103} = 0,31$ ;  $P = 0,736$ ), variando, em média, de 451,9 a 465,6 min.

**Tempo de cópula.** O tempo natural de cópula observado neste experimento variou de 338 a 671 min. A interrupção da cópula após 30, 60, 120 e 240 min do seu início influenciou o período de pré-oviposição (Fig 3A), número de ovos e número de ninfas produzidas (Fig 3B). Entretanto, a duração de cópula não teve efeito sobre a longevidade das fêmeas ( $F_{4,62} = 1,06$ ;  $P = 0,386$ ).

As fêmeas pareadas com machos de diferentes status de acasalamento escolheram, de modo semelhante, machos virgens e pré-acasalados, embora o investimento na segunda cópula fosse menor em todas as situações de acasalamento. Em cópulas sucessivas, machos reacasalaram, passados, em média, 50 min da primeira cópula. Apesar do intervalo entre cópulas, a transferência de espermatozoides viáveis

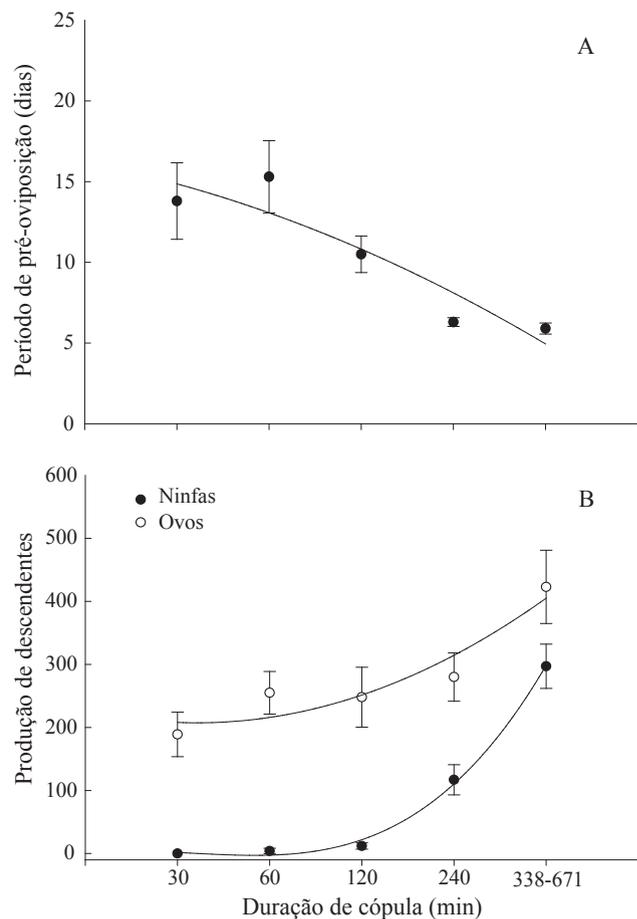


Fig 3 Efeito da duração da cópula mediante a sua interrupção no período de pré-oviposição (A:  $\hat{y} = 17,051 - 0,064x + 0,00008590x^2$ ,  $F = 13,12$ ,  $P = 0,071$ ,  $R^2 = 0,92$ ) e, no número de ovos (B:  $\hat{y} = 17,050 - 0,064x + 0,000086x^2$ ,  $F = 36,31$ ,  $P = 0,009$ ,  $R^2 = 0,92$ ) e, de ninfas (B:  $\hat{y} = 17,870 - 0,679x + 0,0064x^2 + 0,0000079x^3$ ,  $F = 390,32$ ,  $P = 0,037$ ,  $R^2 = 0,99$ ) produzidas por fêmeas de *Podisus nigrispinus*.

para a fêmea proporcionando o início de produção de ninfas exige tempo, o qual pode ser estimado em torno de 42,5 min (equação Fig 3B).

### Discussão

O tamanho dos machos não afetou a escolha da fêmea para o acasalamento. Também, o comportamento de múltiplas cópulas não foi associado à escolha de parceiro, pois a primeira escolha não determina a escolha para a segunda cópula, como confirmado durante a situação sem escolha com machos de mesmo tamanho. A diversificação de cópulas por fêmeas de *P. nigrispinus* e outros pentatomídeos (McLain & Marsh 1990, McLain 1992) pode resultar em ganho genético para as fêmeas por permitir a heterogeneidade dos descendentes (Thornhill & Alcock 1983). Além disso, múltiplas cópulas são necessárias para a manutenção do estoque de espermatozoides em *P. nigrispinus* (Rodrigues *et al* 2008).

Os resultados obtidos indicam que *P. nigrispinus* possui estratégia de acasalamento distinta em função do tamanho e status prévio de acasalamento de machos, quando comparados a outras espécies de insetos. O tamanho do macho é um dos traços mais relacionados ao sucesso reprodutivo em insetos (Andersson 1994).

Estudos de seleção do parceiro pela fêmea mostram que a cópula com machos grandes resulta em maior fecundidade e fertilidade (Tadler *et al* 1999), visto que os mesmos podem transferir compostos nutritivos utilizados pelas fêmeas na vitelogênese ou na manutenção de processos vitais (Cordero 1995, Koshiyama *et al* 1996, McLain 1998). Para McLain *et al* (1990), a seleção para cópula poderia levar as fêmeas a preferir machos grandes. Entretanto, a seleção do parceiro por fêmeas de *P. nigrispinus* não foi alterada pelo tamanho e status de acasalamento do macho.

A ausência de efeito do tamanho do macho e do seu status prévio de acasalamento no sucesso reprodutivo de fêmeas de *P. nigrispinus* corrobora a não inexistência de comportamento de seleção de parceiro pela fêmea da espécie. Entretanto, esses dados poderão ser melhores interpretados após análise da qualidade dos espermatozoides transferidos às fêmeas por machos de tamanho e status de acasalamento distintos, assim como pela avaliação da qualidade dos descendentes produzidos.

Em relação à duração da cópula, machos pequenos e grandes apresentaram semelhante investimento, tanto na primeira cópula como no reacasamento. O tempo de cópula de *P. nigrispinus* esteve relacionado à transferência de material seminal para as fêmeas (Fig 3), e não à guarda da fêmea. Após 15 dias ou a produção de 200 ovos, o intervalo entre posturas aumenta e a viabilidade de ovos diminui, indicando necessidade de reacasamento (Torres & Zanuncio 2001). No entanto, a presença de espermatozoides remanescentes na espermateca da fêmea é indicada pela produção de ovos férteis e, consequentemente, de ninfas após 15 dias da primeira cópula. Portanto, a presença de espermatozoides remanescentes na espermateca por ocasião do reacasamento, ou seja, segunda escolha da fêmea,

pode ter resultado em menor duração de cópula, e assim o macho de *P. nigrispinus* necessitaria de menor período de transferência de material seminal para o completo preenchimento da espermateca.

O comportamento de cópula sucessiva em *P. nigrispinus* não impede ou minimiza o reacasamento de machos. Assim, em cópulas sucessivas com fêmeas virgens, duas situações podem estar acontecendo: (i) machos necessitam de menor período de tempo para iniciar a transferência de espermatozoides, e (ii) machos podem sofrer redução na produção e transferência de espermatozoides a curto prazo. Por outro lado, o efeito de cópulas sucessivas no sucesso reprodutivo de fêmeas de *P. nigrispinus* segue o mesmo padrão relatado por Torres & Zanuncio (2001), que não encontraram diferença no sucesso de paternidade de machos até cinco cópulas sucessivas. Assim, esses resultados sugerem ter sido adequada a transferência de espermatozoides para as fêmeas entre machos virgens e reacasados, mesmo com menor intervalo de tempo entre cópulas.

As longas cópulas em percevejos podem torná-los suscetíveis ao ataque por outros predadores devido à menor mobilidade durante o acasalamento. Entretanto, mesmo submetidos ao risco de predação, o início do acasalamento e a duração do período de cópula não foram afetados em *P. nigrispinus*. Para contornar o aumento de exposição à predação durante as múltiplas cópulas, percevejos possuem feromônio de alarme que pode auxiliar na redução de predação (Gamberale & Tullberg 1996). Além disso, a coloração esverdeada pálea dos adultos de *P. nigrispinus*, em campo, reduz o contraste com o ambiente, o que pode dificultar a sua localização na planta por predadores oportunistas. Entretanto, a mortalidade de casais durante o acasalamento, que pode perdurar por mais de 11h (671 min), merece estudos em campo.

Em conclusão, os resultados mostram que fêmeas de *P. nigrispinus* acasalam independente do tamanho e status de acasalamento do macho, além de não apresentarem seleção por parceiro. Por outro lado, o tamanho de fêmeas possui importante papel para as características reprodutivas da espécie (Zanuncio *et al* 1992). A necessidade de longos períodos de cópula não é afetada pelo risco de predação, o qual não inibe o início da cópula nem sua duração. Assim, a hipótese de que machos maiores beneficiariam as fêmeas de *Podisus* pela transferência de fluidos seminais e, assim, por realizarem múltiplas cópulas poderiam selecionar o macho pelo seu tamanho foi refutada. Da mesma forma, a realização de longas cópulas não se mostrou associada à guarda de fêmeas para evitar a realização de novas cópulas, mas sim à necessidade do inseto de um período prolongado para a transferência de material seminal em quantidade apropriada às fêmeas.

### Agradecimentos

Ao Robério C S Neves e à Roberta L dos Santos do Laboratório de Controle Biológico da UFRPE, pelo fornecimento de presas utilizadas na criação dos predadores. Ao CNPq pela concessão de bolsas de Mestrado e Produtividade ao primeiro e segundo autores, respectivamente.

## Referências

- Andersson M (1994) Sexual selection. Princeton, Princeton University Press, 599p.
- Andersson M, Iwasa Y (1996) Sexual selection. *Trends Ecol Evol* 11: 53-58.
- Arnqvist G (1989) Multiple mating in a water strider: mutual benefits or intersexual conflict? *Anim Behav* 38: 749-756.
- Arnqvist G, Danielsson I (1999) Postmating sexual selection: the effects of male body size and recovery period on paternity and egg production rate in a water strider. *Behav Ecol* 10: 358-365.
- Berrigan D, Locke S H (1991) Body size and male reproductive performance in the flesh fly, *Neobellieria bullata*. *J Insect Physiol* 37: 575-581.
- Carvalho R D S, Vilela E F, Borges M, Zanuncio J C (1994) Ritmo do comportamento de acasalamento e atividade sexual de *Podisus connexivus* Bergroth (Heteroptera: Pentatomidae: Asopinae). *An Soc Entomol Bras* 23: 197-202.
- Chapman T, Liddle L F, Kalb J M, Wolfner M F, Partridge L (1995) Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females is mediated by male accessory gland products. *Nature* 373: 241-244.
- Cordero C (1995) Ejaculate substances that affect female insect reproductive physiology and behavior: honest or arbitrary traits? *J Theor Biol* 174: 453-461.
- Crudginton H S, Siva-Jothy M T (2000) Genital damage, kicking and early death. *Nature* 407: 855-856.
- De Clercq P, Degheele D (1997) Effects of mating status on body weight, oviposition, egg load, and predation in the predatory stinkbug *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). *Ann Entomol Soc Am* 90: 121-127.
- Edvardsson M, Arnqvist G (2000) Copulatory courtship and cryptic female choice in red flour beetles *Tribolium castaneum*. *Proc R Soc Lond B* 267: 559-563.
- Edvardsson M, Canal D (2006) The effects of copulation duration in the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Behav Ecol* 17: 430-434.
- Gamberale G, Tullberg B S (1996) Evidence for a more effective signal in aggregated aposematic prey. *Anim Behav* 52: 597-601.
- Harano T, Yasui Y, Miyatake T (2006) Direct effects of polyandry on female fitness in *Callosobruchus chinensis*. *Anim Behav* 71: 539-548.
- Herndon L A, Wolfner M F (1995) A *Drosophila* seminal fluid protein, Acp26Aa, stimulates egg laying in females for 1 day after mating. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10114-10118.
- Koshiyama Y, Tsumuki H, Fujisaki K, Nakasuji F (1996) Nutritional contribution to females of <sup>14</sup>C-labeled male secretions transferred during mating in *Menida scotti* (Heteroptera: Pentatomidae). *Res Popul Ecol* 38: 51-56.
- McLain D K (1992) Preference for polyandry in female stink bugs, *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *J Insect Behav* 5: 403-410.
- McLain D K (1998) Non-genetics benefits of mate choice: fecundity enhancement and sexy sons. *Anim Behav* 55: 1191-1201.
- McLain D K, Lanier D L, Marsh N B (1990) Effects of female size, mate size, and number of copulations on fecundity, fertility, and longevity of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Ann Entomol Soc Am* 83: 1130-1136.
- McLain D K, Marsh N B (1990) Male copulatory success: heritability and relationship to mate fecundity in the southern green stinkbug, *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). *Heredity* 60: 161-167.
- Osanai M, Chen P S (1993) A comparative study on the arginine degradation cascade for sperm maturation of *Bombyx mori* and *Drosophila melanogaster*. *Amino Acids* 5: 341-350.
- Parker G A, Simmons L W (1994) Evolution of phenotypic optima and copula duration in dungflies. *Nature* 370: 53-56.
- Reynolds J D (1996) Animal breeding systems. *Trends Ecol Evol* 11: 68-72.
- Ridley M (1990) The control and frequency of mating in insects. *Funct Ecol* 4: 75-84.
- Rodrigues A R S, Serrão J E, Teixeira, W W, Torres J B, Teixeira, A A (2008) Spermatogenesis, changes in reproductive structures, and time constraint associated with insemination in *Podisus nigrispinus*. *J Insect Physiol* 54: 1543-1551.
- Rolff J, Siva-Jothy M T (2002) Copulation corrupts immunity: a mechanism for a cost of mating in insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9916-9918.
- SAS Institute (2001) SAS/STAT User's guide, version 8.02, TS level 2MO. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Sousa-Souto L, Evangelista Jr W S, Lima E R, Zanuncio J C, Fonseca M G (2006) Sperm depletion: a cost for single mated females of *Podisus nigrispinus* (Dallas, 1851) (Heteroptera: Pentatomidae). *Braz Arch Biol Tech* 49: 923-926.
- Tadler A, Nemeschkal H L, Pass G (1999) Selection of male traits during and after copulation in the seedbug *Lygaeus simulans* (Heteroptera, Lygaeidae). *Biol J Linn Soc* 68: 471-483.
- Thornhill R, Alcock J (1983) The evolution of insect mating systems. Cambridge, Harvard University Press, 547p.
- Torres J B, Zanuncio J C (2001) Effects of sequential mating by males on reproductive output of the stinkbug predator, *Podisus nigrispinus*. *BioControl* 46: 469-480.
- Torres J B, Zanuncio J C, Moura M A (2006) The predatory stinkbug *Podisus nigrispinus*: biology, ecology and augmentative releases for lepidoperan larval control in Eucalyptus in Brazil. *CAB Reviews: Persp Agric Vet Sci* 15: 1-18.
- Torres J B, Zanuncio J C, Oliveira M C (1997) Mating frequency and its effect on female reproductive output in the stinkbug predator *Podisus nigrispinus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Med Fac Landbouww Univ Gent* 62: 491-498.
- Tram U, Wolfner M F (1999) Male seminal fluid proteins are essential for sperm storage in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 153:837-844.

- Tregenza T, Wedell N (2002) Polyandrous females avoid cost of inbreeding. *Nature* 415: 71-73.
- Zanuncio J C, Bragança M A L, Diaz J L S, Sartório R C (1992) Avaliação dos parâmetros de fecundidade de *Podisus connexivus* (Hemiptera: Pentatomidae) de diferentes pesos. *Rev Ceres* 39: 591-596.
- Zeh J A, Zeh D W (1996) The evolution of polyandry I: Intra-genomic conflict and genetic and genetic incompatibility. *Proc R Soc Lond B* 263: 1711-1717.
- Žunič A, Cokl A, Doberlet M V, Millar J G (2008) Communication with signals produced by abdominal vibration, tremulation, and percussion in *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae). *Ann Entomol Soc Am* 101, 1169-1178.

*Received 07/III/08. Accepted 31/VIII/09.*

---