

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

RAFAELLA DE LUCENA NÓBREGA

Hidrocarbonetos cuticulares são fundamentais para o reconhecimento do parceiro sexual em *Cyclocephala distincta* Burmeister (Melolonthidae, Cyclocephalini)?

RECIFE
2018

RAFAELLA DE LUCENA NÓBREGA

Hidrocarbonetos cuticulares são fundamentais para o reconhecimento do parceiro sexual em *Cyclocephala distincta* Burmeister (Melolonthidae, Cyclocephalini)?

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Animal.

Área de concentração: Comportamento Animal

Orientador: Profº. Dr. Artur Campos Dália Maia

Coorientador: Profº. Dr. Wendel José Teles Pontes

**RECIFE
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Nóbrega, Rafaella de Lucena

Hidrocarbonetos cuticulares são fundamentais para o reconhecimento do parceiro sexual em *Cyclocephala distincta* Burmeister (Melolonthidae, Cyclocephalini)?/ Rafaella de Lucena Nóbrega- 2018.

74 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Artur Campos D. Maia

Coorientador: Wendell J. Telles Pontes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia

Animal. Recife, 2018.

Inclui referências

1. Besouro 2. Reprodução 3. Animais-comportamento I. Maia, Artur Campos D. (orient.) II. Pontes, Wendell J. Telles (coorient.) III. Título

5957649

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-387

Elaborado por Elaine C. Barroso CRB4/1728

RAFAELLA DE LUCENA NÓBREGA

Hidrocarbonetos cuticulares são fundamentais para o reconhecimento do parceiro sexual em *Cyclocephala distincta* Burmeister (Melolonthidae, Cyclocephalini)?

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Biologia Animal.

Aprovado em: 26/07/2018

Prof. Dr. Artur Campos Dália Maia (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Wendel J Teles Pontes (Coorientador)
Universidade Federal de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Bruna Bezerra (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Luciana Iannuzzi (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Geanne K. Novais Santos (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

À Vovó Carminha, à minha Mãe e ao meu Esposo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, assim como tudo em minha vida, à Deus, pelas oportunidades de ensinamento em todos os momentos da minha vida, sendo minha fonte de forças para enfrentar os obstáculos que surgem.

À minha Mãe, por nunca duvidar que eu fosse capaz e sempre querer o melhor para meu futuro, mesmo que para isso precisasse passar menos tempo comigo. Te amo!

Ao meu esposo, por ser tão maravilhoso comigo. És minha inspiração e alegria todos os dias! Quem sempre esteve do meu lado, sempre compreensivo e me ajudando tanto, me incentivando a arriscar, que sempre vibrou com minhas vitórias, por mínimas que fossem. Muito obrigada, te amo!

À minha Sogra, por sempre me incentivar e torcer por mim, me mandar forças e me manter calma quando foi preciso. Sou muito grata por ter você na minha vida, que de sogra não tem nada, está mais para uma mãe mesmo. Te amo!

Aos meus orientadores, Artur e Wendel, muito obrigada pela confiança e todos os conselhos e conversas que tivemos. Obrigada por todo ensinamento, sinto que termino essa etapa bastante diferente da Rafaella insegura que iniciou o mestrado, saí da minha zona de conforto, tudo graças a vocês. Espero, muito ter respondido bem as expectativas de vocês.

À Professora Daniela Navarro pelo espaço e material cedido para que etapas importantes da pesquisa pudessem ser realizadas.

As lindas do Laboratório de Entomologia Aplicada (LEA-UFPE) por toda ajuda, meninas vocês são demais. Carla e Maria Luiza, principalmente, que foram tão presentes no último ano, me ajudando com no laboratório, pelas conversas, risadas, lanches e desabaços. Aprendi muito com vocês também e ainda temos muito o que aprender juntas. Malu, tu arrasasses demais nos desenhos!

Aos meus amigos do Hadouken, muito obrigada por toda força gente, por cada ajuda, conselhos e momentos de desabaço, vocês foram fundamentais. Amo vocês!

A CAPES pela bolsa concedida durante o Mestrado.

Olhe bem para a natureza, e então você vai entender tudo melhor.
(Albert Einstein)

RESUMO

Os hidrocarbonetos cuticulares (HCs) são importantes na biologia dos insetos, por conferirem controle do fluxo de água ao corpo. Investigações trouxeram descobertas nas áreas da ecologia química e quimiosistemática, mostrando especificidade taxonômica e seu papel como semioquímicos envolvidos no comportamento sexual. Os besouros Cyclocephalini são atraídos por compostos orgânicos voláteis de suas plantas hospedeiras. É nas inflorescências de espécies selecionadas de palmeiras (Arecaceae) que machos e fêmeas se encontram, alimentam-se e copulam, à exemplo de *Cyclocephala distincta*, espécie da tribo Cyclocephalini que ocorre em Pernambuco. Este trabalho teve como objetivo reconhecer os comportamentos reprodutivos da espécie mediados por HCs, que também foram aqui caracterizados quimicamente. Revalidado o repertório comportamental sexual da espécie, foi possível determinar os atos da monta e eversão de edeago como reflexo da escolha e investida sexual do macho. Observando o comportamento sexual dos machos frente a indivíduos coespecíficos de ambos os sexos, fêmeas de diferentes espécies e coespecíficos mortos por congelamento, demonstrou-se que eles investem de forma mais expressiva em fêmeas coespecíficas, embora tenham sido registradas cópulas interespecíficas. Machos mostraram-se capazes de discernir entre indivíduos vivos e mortos, mostrando preferência por fêmeas coespecíficas vivas. A caracterização química comparativa de extratos hexânicos cuticulares de fêmeas e machos não indicou diferenças qualitativas significativas. Bioensaios comportamentais mostraram que para machos de *C. distincta* o reconhecimento dos perfis de HCs apresenta caráter espécie-específico, logo, eles tendem a reconhecer mais facilmente parceiros coespecíficos. Foi possível concluir que machos de *C. distincta* precisam montar o potencial parceiro sexual para que ocorra reconhecimento tátil anatômico, e químico de contato mediado pelos HCs. Investimento sexual em cópulas interespecíficas sugerem dependência da relação com a planta hospedeira, que reduz a necessidade de mecanismos de reconhecimento específico e sexual mais refinados devido sua seletividade na atração apenas de indivíduos de *C. distincta*.

Palavras-chave: Comportamento. Reprodução. Comunicação química. Coró

ABSTRACT

The biological importance of cuticular hydrocarbons (CHCs), in the control of water flow in insects, has long been uncovered. Further investigations had led to new findings in the areas of chemical ecology and chemosystematics, showing high taxonomic specificity, and their role as semiochemicals, involved in sexual behavior. Also, Cylocephaline scarabs are attracted by floral volatile organic compounds of their host plants. Indeed, it is in the inflorescences of selected species of palm trees (Arecaceae) that male and female of *Cyclocephala distincta* for example, tribe of Cylocephaline that occur in Pernambuco, find shelter and feeding resources, and mate in safety. The main purpose of this work was to recognize the reproductive behaviors patterns of the species mediated by cuticle hydrocarbons (HCs), which were also chemically characterized, in this paper, for the first time. Revalidating the sexual repertoire of the species, it was possible to determine the behaviors of mounting and aedeagus eversion as a reflection of the male's mating choice and sexual investment. Observations of the sexual behavior of males paired with conspecific male and females, females of different species and inanimate conspecifics, showed that they invested more expressively in live conspecific females, although interspecific mating was also recorded. In addition, it was possible to evaluate that they can discern between live and inanimate individuals, always showing more preference for live conspecific females. The comparative chemical characterization of hexanic cuticular extracts from both, females and males, did not indicate any significant qualitative differences. Behavioral bioassays showed that for male of *C. distincta* the recognition of HCs profiles holds a species-specific component, in fact, they recognize conspecific partners more easily and they have more preference for them. It was possible to conclude that male of *C. distincta* always need mounting the potential sexual partner for anatomical tactile recognition and chemical contact, mediated by HCs, occur. Sexual investment in interspecific copulation suggests a dependence on the relation with the host plant, which reduces the need for more refined specific recognition and sexual mechanisms, by attracting only individuals of *C. distincta*.

Key-words: Behavior. Reproduction. Chemical communication. Masked chafer

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Métodos

Figura 1 – Sequência de acasalamento de *Cyclocephala distincta* (n = 25 pares). **a** um macho se aproxima de uma fêmea e esfrega as antenas no élitro dela; **b** macho sobe na fêmea; **c** macho monta a fêmea; **d** macho everte edeago; **e** macho inclina abdômem em direção ao pigídio da fêmea; **f** cópula; **g** macho retira o edeago da fêmea e o retrai junto ao seu corpo; **h** desmonta e separação dos indivíduos. Esquema comportamental adaptado do etograma de Souza (2013). Na ilustração, os machos são aqueles que possuem máculas nos élitros. Ilustrações por Maria Luiza Ferraz (IC – LEA/UFPE).....26

Artigo 1

Figura 1 – Comparação entre os tratamentos Macho x Fêmea e Macho x Macho, com razão 1:1, quanto ao tempo para realização da primeira monta (gráfico à esquerda) e número de montas e eversão de edeago realizadas (gráfico à direita) pelos machos de *Cyclocephala distincta*. *Indicação do tratamento significativo. Letras iguais indicam resultados sem diferença significativa.....35

Figura 2 – Gráficos comparando os tratamentos em que os machos de *Cyclocephala distincta* tinham dois machos x duas fêmeas como ofertas, com razão 2:1. Número de montas e eversão de edeago realizadas (gráfico à esquerda) e o tempo para realização da primeira monta em cada tratamento (gráfico à direita). *Indicação do tratamento significativo. Letras iguais indicam resultados sem diferença significativa.37

Figura 3 – Gráfico do tratamento com dois machos e uma fêmea de *Cyclocephala distincta*. *Indicação do sexo significativo.....37

Figura 4 – Gráfico com a quantidade dos atos observados por machos de *Cyclocephala distincta* com indivíduos inertes de ambos os sexos. *Indicação do tratamento significativo.....39

Figura 5 – Gráfico com a quantificação dos atos comportamentais, envolvidos no reconhecimento sexual, observados nos machos de *Cyclocephala distincta* com fêmeas vivas e inertes, ambas coespecíficas. *Indicação do tratamento significativo.39

Artigo 2

Figura 1 – Comportamentos de investida dos machos de *C. distincta*, quanto ao reconhecimento sexual em indivíduos sem HCs, comparados ao controle. Dados apresentados em valores percentuais (%). *Indicação do tratamento significante.....56

Figura 2 – Percentual de investidas de machos de *C. distincta* testados com indivíduos coespecíficos que tiveram seus HCs invertidos (a), no reconhecimento heteroespecífico e quanto ao reconhecimento do HCs coespecífico (b). Ambos os tratamentos são comparados ao controle. C.p.: *Cyclocephala paraguayensis*. C.d.: *C. distincta*. *Indicação do tratamento significante.....57

LISTA DE TABELAS

Métodos

Tabela 1 – Etograma simplificado de repertório de cópula de *Cyclocephala distincta* Burmeister 1847, com base nos atos comportamentais descritos por Souza (2013), após observações experimentais realizadas em laboratório.....25

Artigo 1

Tabela 1 – Atos executados por *Cyclocephala distincta* quando pareados com duas espécies, *Anomala undulata* e *Cyclocephala paraguayensis* (descrição dos atos no texto).....38

ARTIGO 2

Tabela 1 – Perfil dos hidrocarbonetos cuticulares de *Cyclocephala distincta* e *C. paraguayensis*, obtidos por imersão em hexano. *presente apenas em uma amostra.....55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	14
1.1.1	Objetivo Geral	14
1.1.2	Objetivos Específicos	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3	MÉTODO.....	23
3.1	COLETA DOS INDIVÍDUOS	23
3.2	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E ANÁLISE.....	23
3.3	BIOENSAIOS COMPORTAMENTAIS.....	24
3.3.1	Bioensaio 1	28
3.3.2	Bioensaio 2	28
3.3.3	Análise de dados	29
4	RESULTADOS.....	30
4.1	ARTIGO 1 – MACHOS DE <i>Cyclocephala distincta</i> (MELOLONTHIDAE, CYCLOCEPHALINI) POSSUEM FRACA CAPACIDADE DE DISCRIMINAÇÃO SEXUAL	30
4.2	ARTIGO 2 – PAPEL DOS HIDROCARBONETOS CUTICULARES NO RECONHECIMENTO SEXUAL DE <i>Cyclocephala distincta</i> (MELOLONTHIDAE: CYCLOCEPHALINI).....	48
5	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

Estudar o comportamento reprodutivo das espécies possibilita um melhor entendimento de sua história evolutiva, bem como fornece uma melhor compreensão quanto ao processo de reconhecimento dos parceiros (THORNHILL; ALCOCK, 1983). Em espécies onde a cópula ocorre em grandes agregações, estudos dos passos preliminares do processo de especiação devem oferecer novas formas de abordagem na identificação de populações que estejam iniciando tal processo; auxiliando na identificação mais precisa dos mecanismos do isolamento reprodutivo das espécies.

Insetos que se agregam em grandes quantidades nas plantas hospedeiras costumam utilizar a comunicação química para encontrar seu parceiro sexual (XUE et al., 2016). Adultos do gênero *Cyclocephala* possuem hábitos crepusculares e noturnos (GOTTSBERGER; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, 1991) e se agregam em grandes quantidades nas inflorescências das plantas que polinizam, sendo esta interação muitas vezes do tipo espécie-específica (MAIA et al., 2010; 2012). Tais interações são mediadas por compostos orgânicos voláteis liberados no horário de atividade de voo dos besouros (PEREIRA et al 2014; HOE et al, 2016), promovendo a agregação de ambos os sexos na mesma inflorescência (MAIA et al., 2018).

Por não haver evidências de híbridos naturais na literatura (ENDRODI, 1985), isto sugere que o reconhecimento do parceiro sexual ocorra nas inflorescências e seja categórico, aumentando a confiabilidade nesta identificação. Em muitos casos, é através dos hidrocarbonetos cuticulares que o reconhecimento do parceiro ocorre, além das inúmeras funções e importância que esses compostos possuem na vida do inseto (BLOMQUIST; BÁGNERES, 2010). Tal tipo de precisão no reconhecimento é encontrado em espécies cuja identificação ocorra a curta distância e seja também químico (FOMBONG et al., 2012). A especificidade dos HCs podem influenciar inclusive no isolamento reprodutivo em alguns casos (SHIMOMURA et al., 2010). Isto sugere que os HCs desempenham um importante papel na reprodução de muitos besouros.

Cyclocephala distincta é encontrado facilmente em fragmentos da Floresta Atlântica no estado de Pernambuco associado a palmeiras (VOEKS, 2002; ALBUQUERQUE et al., 2016; MAIA et al., 2018). Souza (2013) estudou a biologia e descreveu o comportamento reprodutivo da espécie, sendo este iniciado pelo macho,

diferente do que ocorre na maioria das espécies de inseto (MILINSKI, 2001). Tais aspectos possibilitam o uso da espécie como objeto de estudo para testar a hipótese de que ocorre reconhecimento sexual tátil entre os indivíduos, sendo este guiado pelos hidrocarbonetos cuticulares

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Este trabalho buscou investigar a efetividade dos hidrocarbonetos cuticulares (HCs) de *Cyclocephala distincta* como semioquímicos envolvidos na comunicação sexual intraespecífica, verificando se eles são suficientes para eliciar comportamentos sexuais do macho.

1.1.2 Objetivos Específicos

Especificamente buscou-se: 1) Revalidar o comportamento de pré-cópula e cópula da espécie; 2) Analisar o reconhecimento sexual em machos de *C. distincta*; 3) Identificar os componentes dos extratos cuticulares de machos e fêmeas de *C. distincta* através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS); e 4) Testar experimentalmente se a presença de hidrocarbonetos elicitou ou não o comportamento de corte e cópula em machos de *C. distincta*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

COMPORTAMENTO SEXUAL EM BESOUROS

O comportamento sexual desempenhado pelas inúmeras espécies de insetos possui diferenças entre os sexos, seja na busca ou no reconhecimento do parceiro sexual (BAILEY; ZUK, 2009; LANE et al., 2015; RODRIGUES et al., 2016; SHIMOMURA et al., 2017). Para a maioria dos insetos o macho é o responsável por localizar e reconhecer a fêmea (THORNHIL; ALCOCK, 1983), podendo ocorrer mudanças caso o macho venha a se tornar o sexo limitante (BAILEY; ZUK, 2009; RICKLEFS, 2010; ALCOCK, 2011). Esta aproximação entre os sexos pode ocorrer por motivos que não estejam exatamente ligados a reprodução, como o forrageamento e a atração por odores florais (MOORE, 2014; RODRIGUES et al., 2016). O repertório sexual apresentado pelos pares, divide-se em três momentos: pré-cópula, cópula e pós-cópula (THORNHIL; ALCOCK, 1983).

A pré-cópula é o período de tempo investido pelo macho na conquista da fêmea, quando ele realiza a cômte, terminando com o casal em cópula (BARBOSA; RODRIGUES, 2016; RODRIGUES et al., 2016). Nesta etapa ocorre a avaliação do parceiro sexual, levando em consideração seu *fitness* e o que ele pode oferecer à prole (ALCOCK, 2011; MOORE, 2014).

Na cópula, o macho insere seu edeago na genitália feminina e realiza movimentos de flexão dos últimos segmentos abdominais, transferindo os espermatozoides para a fêmea. Esta etapa se encerra com a remoção do edeago do corpo da fêmea e retração do mesmo no corpo do macho (SOUZA, 2013; KAMYIA et al., 2015). A duração dessa etapa difere bastante entre as espécies em função de fatores fisiológicos, ecológicos e comportamentais (THORNHILL; ALCOCK, 1983; ULLAH et al., 2017).

No pós-cópula machos e fêmeas se separam, inicialmente saindo da posição de monta após a finalização da cópula, como em algumas espécies de besouros (PELEGRINO et al., 2013; BENELLI; MEREGALLI; CANALE, 2014). No momento seguinte algumas possibilidades podem ocorrer, como a busca por novos parceiros (COLARES et al., 2015), comportamento de guarda (BURDFIELD-STEEL; SHUKER,

2014) ou a fêmea usufruir do presente nupcial, que é o conteúdo nutritivo transferido por algumas espécies de machos, durante a cópula (GWYNNE, 2008).

Com o encerramento da cópula a fêmea tende a buscar o melhor local para oviposição, onde haja alimento disponível e que proporcione segurança à prole (REFSNIDER; JANZEN, 2010), sendo este momento específico para cada espécie, havendo variações no tempo que as fêmeas destinam ao início da oviposição e ao tempo investido nesta fase (THORNHILL; ALCOCK, 1983). Muitas espécies de insetos escolhem sítios de agregação, como as plantas hospedeiras, para cópula e sítios de oviposição (XUE et al., 2016).

COMUNICAÇÃO QUÍMICA EM INSETOS

A forma como se dá a comunicação entre os insetos envolve muitas ações, ocorrendo em conjunto ou separadas, onde tanto o emissor quanto o receptor do(s) sinal(is) precisa(m) reconhecê-lo(s) (THOMAZINI, 2009; WYATT, 2014; CHUNG; CARROLL, 2015). A comunicação entre esses indivíduos ocorre principalmente por sinais químicos de longa ou curta distância através de quimiossensores distribuídos no corpo (WYATT, 2014). O sistema quimiossensorial, que inclui antenas, cerdas, pernas (tarsos) e aparelho bucal, é essencial para o recebimento dos sinais químicos, trabalhando juntamente com as informações provenientes dos demais órgãos sensoriais (RICKLEFS, 2010; WYATT, 2014; LEONHARDT et al., 2016). Isto é possível graças a um conjunto de estruturas, células e proteínas do sistema nervoso que atuam na interpretação dos diversos odores através da detecção olfativa ou gustativa (ZIEGLER et al., 2013).

Nos besouros Scarabaeidae a detecção é realizada a partir de sensilas olfativas presentes nas lamelas antenais (LEAL, 1998). Proteínas de ligação são responsáveis pela transferência das moléculas de odores até os receptores dos neurônios sensoriais olfativos, que traduzem o sinal em mudanças no potencial elétrico da membrana do axônio do neurônio sensorial. A propagação do sinal até o cérebro ocorre por uma retransmissão da informação pelos interneurônios do lobo antenal (SASCHSE; KRIEGER, 2011).

A mensagem enviada de um indivíduo a outro ocorre através dos compostos químicos, que podem ser voláteis e reconhecidos a longas distâncias, ou não-voláteis e necessitarem de maior aproximação ou contato para que a comunicação ocorra (LORENZO; MELO, 2012; LEONHARDT, 2016; PASK et al., 2017). Esses compostos são biosintetizados e podem referir-se a uma simples eliminação de resíduos, uma forma de proteção contra inimigo ou funcionarem como feromônios sexuais, como é o papel dos hidrocarbonetos cuticulares em algumas espécies de insetos (STEIGER; SCHMITT; SCHAEFER, 2010; WYATT, 2014; XUE et al., 2016).

HIDROCARBONETOS CUTICULARES - DO QUE SE TRATAM?

As primeiras descrições dos componentes presentes na cutícula dos insetos foram realizadas por Wigglesworth, em 1933. Apenas em 1937, os hidrocarbonetos foram sugeridos como componentes de cutícula, através de estudos desenvolvidos por Blount e colaboradores. Nas décadas seguintes passaram a receber mais atenção e, em 1960, os primeiros hidrocarbonetos cuticulares (HCs) foram caracterizados (BLOMQUIST; BAGNÈRES, 2010).

As primeiras análises químicas foram realizadas na barata americana, *Periplaneta americana* Linnaeus, 1758, com o desenvolvimento da cromatografia gasosa (CG), que levaram à identificação de três classes principais desses compostos: n-alcanos, alcanos metil-ramificados e alcenos (BLOMQUIST; BAGNÈRES, 2010; FALCÓN et al., 2014). Foi com o surgimento da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), que os HCs puderam ser melhor investigados, revelando que os compostos possuíam comprimento de cadeia variando entre 21-50 carbonos. Tal complexidade é proporcional à variedade de formas que eles podem apresentar, bem como suas inúmeras funções na vida dos insetos, seja para comunicação química, alimentação, comportamento e/ou reprodução (SYMONDS; ELGAR, 2004; SPIEGEL et al., 2016; OTTE; HILKER; GEISELHARDT, 2018).

Com biosíntese realizada pelos oenócitos, células localizadas na membrana basal (FAN et al., 2003), ao serem liberados na hemolinfa são transportados pela lipoproteína lipoforina e então depositados na cutícula (HOWARD; BLOMQUIST, 2005). O surgimento da biologia molecular proporcionou um melhor entendimento da biosíntese dos HCs, mostrando ocorrer a partir do alongamento de lipídios Acil-CoA,

que geram ácidos graxos de cadeia longa. Este alongamento produz aldeídos, sendo posteriormente convertidos em hidrocarbonetos devido a perda do grupo carboxila (HOWARD; BLOMQUIST, 2005; BLOMQUIST, 2010). Por serem componentes lipídicos hidrofóbicos, proporcionam a melhor barreira contra perda excessiva de água do organismo, permitindo, contudo, permeabilidade seletiva ao vapor d'água (CHUNG; CARROLL, 2015).

Os HCs da categoria dos n-alcenos apresentam cadeia com comprimento entre 21-33 carbonos e são os mais comuns em cutículas de insetos; os alcenos metil-ramificados comumente ocorrem nas posições dois ou cinco, mas ainda é desconhecida a sua função (BLOMQUIST, 2010). Os hidrocarbonetos insaturados (alcenos e alcadienos) são fundamentais na comunicação química, atuando como feromônios (WYATT, 2014; XUE et al., 2016).

A quantidade, qualidade e composição relativa de HCs encontradas em insetos apresentam variações ao longo da vida, sofrendo modificações conforme a dieta, ação hormonal, idade e status reprodutivo (HOWARD; BLOMQUIST, 2005; VALADARES; NASCIMENTO; NASCIMENTO, 2015). Ainda, são componentes específicos de cada espécie, a nível de indivíduo, uma vez que machos e fêmeas da mesma espécie podem possuir perfis quali e/ou quantitativamente diferentes (BLOMQUIST; BÀGNERES, 2010; LANE et al., 2015; XUE et al., 2016; OTTE; HILKER; GEISELHARDT, 2018).

HCS E SEU PAPEL NO COMPORTAMENTO SEXUAL

Os estudos com HCs dos insetos mostram sua utilidade ao longo da vida desses organismos (GIBBS, 1998; ROUAULT et al., 2004). Eles participam da comunicação entre os insetos, servindo como sinal químico de reconhecimento entre os indivíduos (BLOMQUIST; BÀGNERES, 2010; KAMYIA et al., 2015; SHIMOMURA et al., 2017). Por se tratarem de compostos biosintetizados, sua composição pode ser considerada como parte do genótipo/fenótipo de um inseto, podendo ser utilizados em estudos taxonômicos (WYATT., 2014; MENZEL; SCHIMITT; BLAIMER, 2017). Devido à sua utilização como marcadores em análises sistemáticas e filogenéticas, os HCs vêm sendo aplicados na identificação de espécies irmãs, além de investigações sobre

mecanismos de especiação (FINK et al., 2016; XUE et al., 2016) e em estudos biogeográficos (DAPPORTO; PALAGI; TURILLAZZI, 2004; VILLATA et al., 2018).

Os HCs funcionam como uma identidade que, a depender da espécie, pode informar status social, reprodutivo, idade, etc. (HOWARD; BLOMQUIST, 2005; BLOMQUIST; BÀGNERES, 2010; WYATT, 2014; XUE et al., 2016; PASK et al, 2017). Sinais feromonais são partes fundamentais da biologia reprodutiva de diversas espécies de insetos. A maioria deles ocorre de forma específica, com a liberação ocorrendo a partir de um sexo, para que o sexo oposto as reconheça e identifique (LANE et al., 2015; KEPPNER et al., 2017). Mas, para maior eficiência do sistema, é necessária uma estreita sensibilidade do receptor (BLOMQUIST; BAGNÈRES, 2010; WYATT, 2014). HCs como feromônios sexuais vêm sendo identificados em várias ordens (BLOMQUIST; BÀGNERES, 2010; KAMYIA et al., 2015; KEPPNER et al., 2017; SANTOS, 2018). A volatilidade que os compostos apresentam, influenciam na quimiorrecepção pelos parceiros. Quanto maior a cadeia, mais pesada e menos volátil essas moléculas serão, funcionando então como feromônios sexuais de contato (WYATT, 2014; SPIEGEL et al., 2016; SILK et al., 2017). É a partir do reconhecimento do feromônio sexual, que o comportamento sexual tende a iniciar (GEISELHARDT; OTTE; HILKER, 2009).

Insetos atraídos por feromônios de agregação ou semioquímicos da planta, reconhecem seus pares ou migrantes através dos HCs que funcionam como feromônio de contato, garantindo que o investimento reprodutivo se dará com indivíduos coespecíficos (SMADJA; BUTLIN, 2009; CHUNG; CARROLL, 2015). Experimentos de laboratório com espécies da ordem Coleoptera mostraram que a ausência ou troca de HCs entre espécies irmãs ou de mesmo gênero houve alterações na decisão de investida sexual por parte dos machos (KEPPNER et al, 2017).

RECONHECIMENTO SEXUAL PARA COLEÓPTEROS ASSOCIADOS A PLANTAS

Os estudos sobre interações inseto-planta apontam como estas ocorrem com os mais variados grupos de insetos, sejam eles herbívoros, parasitoides ou predadores, bem como o comportamento resposta destes aos compostos orgânicos voláteis (COVs) emitidos pelas plantas (SEYMOUR; WHITE; GIBERNAU, 2009; BOACHON et al., 2015). Esses compostos são resultados da redução no processo de digestão

vegetal, são biossintetizados pelas plantas e possuem natureza multifuncional, uma vez que possibilitam a atração ou repelência de organismos (PIKERSKY; GERSHENZON, 2002).

As plantas exalam os COVs devido a elevada pressão de vapor, transformando-os em estado gasoso, podendo ser liberado em diferentes partes da planta e atuar como protetor (KNUDSEN et al., 2006; ERB, 2018) ou funcionar como atrativo para polinizadores, quando liberados pelas partes florais (CAVALCANTE et al., 2009; MAIA et al., 2010; 2012). Os COVs podem ser comuns a polinizadores de várias espécies pertencentes ao mesmo gênero ou ter ação espécie-específico (TURLING; ERB, 2018).

Muitas espécies de coleópteros são atraídas por COVs, liberados estrategicamente pelas plantas no horário de vôo dos besouros, podendo ocorrer a partir da especificidade do composto, do perfume floral ou da espécie hospedeira (MAIA et al., 2010; PEREIRA et al., 2014; HOE et al., 2016). As plantas tendem a liberar tais compostos com a finalidade de atrair insetos antófilos que atuem na sua reprodução, assegurando seu sucesso reprodutivo (ENDRODI, 1985). Esses compostos possibilitam o encontro entre os sexos para aquelas espécies cuja relação polinizador-planta é estreita, tornando-se o local ideal para cópula, abrigo e alimentação (MAIA et al., 2010, 2012).

Em espécies de besouros que compartilham plantas hospedeiras, os HCs podem ser utilizados para garantir maior segurança no reconhecimento do parceiro sexual, funcionando como feromônios de contato (GEISELHARDT; OTTE; HILKER, 2009; LANE et al., 2015). Sua ação pode ser única no reconhecimento sexual (SHIMOMURA et al., 2010; XUE et al., 2016; KEPPNER et al., 2017), em conjunto com o dimorfismo sexual (RODRIGUES; GOMES; BENTO, 2014) ou com o comportamento desempenhado pelo parceiro (BARBOSA; RODRIGUES, 2016).

Ginzel & Hanks (2005), ao trabalharem com a família Cerambycidae e estudarem seus mecanismos de agregação nas plantas hospedeiras, bem como a localização do parceiro sexual entre eles na agregação, apontaram que o encontro dos sexos, para esses besouros ocorre em três passos: (1) atração pelos COVs, (2) um dos sexos atrai o outro com feromônios de agregação a curta distância e (3) machos reconhecem as fêmeas através dos feromônios de contato, os HCs, por passagem das antenas no élitro delas. Tal sistema pode ser observado também em representantes da família

Melolonthidae, uma vez que costumam de agregar em grande número nas plantas hospedeiras (SOUZA, 2013; MAIA et al., 2018).

MELOLONTHIDAE: CYCLOCEPHALINI

A família Melolonthidae é constituída por besouros popularmente conhecidos como escaravelhos e besouros de chifre, além de algumas espécies serem popularmente nomeadas de “corós” durante a fase larval (CHERMAN; MORÓN, 2014). Estes últimos são relatados em estudos agrícolas devido as consequências trazidas para alguns cultivos em diversas regiões do Brasil (OLIVEIRA; MORÓN; FRIZZAS, 2008; RODRIGUES et al., 2011; LUÇARDO; OLIVEIRA; FRIZZAS, 2014; SOUZA et al., 2014, 2015). Já na fase adulta, algumas espécies contribuem na polinização de várias angiospermas (MAIA et al., 2010; 2012; MOORE; JAMESON, 2013).

A subfamília Dynastinae agrupa besouros que na fase adulta possuem hábitos crepusculares ou noturnos e são antófilos, na sua maioria (ENDRODI, 1985; GOTTSBERGER, 1990). Entre as tribos da subfamília, destaca-se Cyclocephalini, com ocorrências registradas na América, África e Sudeste Asiático (RATCLIFFE; CAVE; CANO, 2013). São besouros polinizadores/visitantes florais especializados, atraídos por COV específicos de algumas angiospermas (GOTTSBERGER; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, 1991; HOE et al., 2016). Para diversas espécies de besouros Cyclocephalini, COVs florais atrativos desempenham importante papel na biologia reprodutiva, uma vez que asseguram a agregação de machos e fêmeas na(s) inflorescência(s) (SEYMOUR; WHITE; GIBERNAU, 2009; MAIA et al., 2010; MAIA et al., 2018). Uma vez que machos e fêmeas se encontram nas inflorescências, o segundo momento corresponde ao reconhecimento do parceiro, sendo este químico e comumente realizado através de feromônios de curta distância, em sua maioria emitidos pela fêmea (VUTS et al., 2014; BARBOSA; RODRIGUES, 2016; SANTOS, 2018).

Cyclocephala distincta BURMEISTER, 1847

O gênero *Cyclocephala* é o mais diverso entre os Cyclocephalini, esses besouros antófilos atuam no sucesso reprodutivo de suas plantas hospedeiras (DIERINGER et al., 1998; MAIA et al., 2010, 2012). Estas apresentam flores claras ou brancas, exalando aromas intensos perceptíveis inclusive pelo olfato humano, atraindo besouros de ambos os sexos (BERNHARDT, 2000; HOE et al., 2016).

Assim como os demais integrantes da subfamília Dynastinae, os besouros *Cyclocephala* podem ser pragas agrícolas durante sua fase larval (OLIVEIRA; ÁVILA, 2011; DUCHINI et al., 2017), com distribuição Neotropical e abundância em toda América do Sul (ENDRODI, 1985; RATCLIFFE; CAVE, 2006; SCHOOLMEESTERS, 2018). O gênero já foi registrado em diversos estados brasileiros, como: Mato Grosso do Sul (RODRIGUES et al., 2011; OLIVEIRA; ÁVILA, 2011), Santa Catarina (DUCHINI et al., 2017), Goiás (CAVALCANTE et al., 2009) e também em Pernambuco, como visitantes florais nos resquício de Mata Atlântica do estado, onde foi encontrado em palmeiras (Aracaceae) e outras inflorescências de Aracea (MAIA et al., 2010, 2012; ALBUQUERQUE et al., 2016).

Nos registros em Pernambuco, a espécie *Cyclocephala distincta*, teve a biologia e comportamento reprodutivo já descritos (SOUZA, 2013; SOUZA et al., 2015), apresentando desenvolvimento holometábolo e dimorfismo sexual marcado pela presença de garras tarsais no primeiro par de pernas dos machos. O etograma reprodutivo da espécie possui os atos descritos para as fases de pré-cópula, cópula e pós-cópula, para ambos os sexos. Souza (2013) supõe que o reconhecimento intraespecífico seja químico e posteriormente físico, onde os comportamentos ‘alisar’ e ‘subir’ sugerem que o macho precisa ter um reconhecimento tátil para identificar a fêmea.

Nesta dissertação, testamos a hipótese de que a presença destes HCs fornece a informação decisiva que levam o macho a reconhecer o outro indivíduo como uma fêmea coespecífica, funcionando assim como um feromônio de contato. Assim, *C. distincta* é uma espécie que apresenta grande potencial como modelo biológico adequado para o estudo, pois são facilmente encontrados associados a palmeiras, nos fragmentos da Floresta Atlântica de Pernambuco.

3 MÉTODO

3.1 COLETA DOS INDIVÍDUOS

A coleta dos besouros foi realizada na Usina São José, em Igarassu/PE, configurada como uma reserva particular de Floresta Atlântica de Pernambuco, Brasil. Para atrair os indivíduos da espécie foco, foi utilizado armadilha odorífera iscada contendo mistura que remete ao odor liberado pela planta hospedeira pela qual a espécie possui atração. A liberação do odor foi feita com dispersor piezoelétrico conforme metodologia utilizada por Maia et al. (2018). Adicionalmente foi utilizado uma armadilha luminosa (MAIA et al., 2010) para atração de besouro de espécies distintas.

Os exemplares foram coletados manualmente e acondicionados em recipientes plásticos, que continham terra vegetal escura (All Garden LTDA) e levados para o laboratório, onde passavam por um período de 48h de aclimação. Após o prazo de aclimação, machos eram individualizados e fêmeas permaneciam em gaiolas juntamente com outras fêmeas.

3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E ANÁLISE

A extração cuticular, bem como a análise dos extratos obtidos foram desenvolvidas no Laboratório de Ecologia Química, no departamento de Química Fundamental da UFPE. Para esta etapa, machos e fêmeas foram temporariamente acondicionados em recipientes contendo areia fina lavada, com o objetivo de remover impurezas superficiais presentes na superfície de seus élitros. Em seguida foram individualizados em frascos de vidro (10ml), previamente lavados e autoclavados, para serem eutanasiados através do congelamento à -5°C. Permaneceram no freezer até o momento da extração.

Para extração, foi utilizado solvente n-hexano bidestilado, onde os besouros previamente agrupados em pequenos grupos com 10 indivíduos cada, foram imersos e agitados por um período de dois minutos. Após este prazo, os besouros foram retirados e secos por descanso em papel toalha. A solução obtida foi transferida para um vial (1,5ml) e concentrada sob fluxo laminar de nitrogênio para obtenção do volume final de 200 µl. Foram utilizadas cinco amostras de fêmeas e três de machos de *C. distincta*, além de duas amostras de fêmeas de *C. paraguayensis* Arrow, 1913 – para esta última espécie utilizou-se um volume de 5 ml de hexano para imersão – para

análise em CG-EM. Extratos extras obtidos foram utilizados nos experimentos que compoem o bioensaio dois.

Os vials foram analisados em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadruplo Agilent 5975C Series (Agilent Technologies, Palo alto, USA), equipado com coluna apolar HP-5 (Agilent J&W, 60 m x 0.25 mm diâmetro interno; espessura do filme 0.25 μ m). As amostras foram analisadas sob as seguintes condições: temperatura inicial de 60°C (mantida por 1 min), rampa de aquecimento de 15°C/min e temperatura final de 260°C, que foi mantida por 20 minutos. O gás de arraste utilizado foi o hélio, a fluxo constante de 1mL por minuto e a temperatura do injetor foi mantida a 250°C. Os compostos eluídos da coluna cromatográfica foram ionizados por impacto de elétrons à 70 eV. A fonte de ionização foi mantida à 230° C e o quadrupolo à 150°C. Os espectros de massa foram obtidos no modo *scan* com velocidade de 0,5 scan por segundo, com faixa de varredura de *m/z* de 35 a 550.

Uma alíquota de 1 μ l de cada extrato foi injetada em modo *splitless*. Os compostos foram identificados por meio da análise dos espectros de massa de cada pico cromatográfico, comparação com padrões autênticos e cálculo de índices de retenção. Foram calculados os índices de retenção linear dos componentes dos extratos cuticulares utilizando-se os tempos de retenção de cada composto e os tempos de retenção de alcanos (C9 a C34) analisados sob as mesmas condições. Os valores calculados foram comparados com os índices de retenção publicados na literatura (ADAMS, 2007; NIST WEBBOOK, 2014).

3.3 BIOENSAIOS COMPORTAMENTAIS

Experimentos comportamentais foram desenvolvidos no Laboratório de Entomologia Aplicada da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sob condições de temperatura e fotofase controladas. As observações ocorreram em horário natural de atividade do inseto, entre 18h – 23h (ALBUQUERQUE et al., 2016), seguindo o método de Animal Focal descrita por Altmann (1974). Os experimentos desenvolvidos, foram agrupados em dois grupos distintos, Bioensaio 1 e Bioensaio 2, que correspondem aos artigos resultantes desta dissertação (ver sessão de resultados).

Os comportamentos considerados foram: (1) monta, (2) eversão de edeago e (3) cópula (adaptado de SOUZA, 2013). Cada observação durou um período de 20 minutos, caso a cópula ocorresse antes deste tempo a observação se encerrava com a realização desta. Observações prévias de 25 casais possibilitaram a elaboração de um etograma simplificado da espécie (Tabela 1), sendo esses utilizados como referência para elaboração de uma prancha esquemática com a sequência comportamental da espécie (Figura 1). Todos os experimentos foram realizados em placas de Petri (60x15mm).

Tabela 1. Etograma simplificado de repertório de cópula de *Cyclocephala distincta* Burmeister 1847, com base nos atos comportamentais descritos por Souza (2013), após observações experimentais realizadas em laboratório.

ATO COMPORTAMENTAL	DESCRIÇÃO DO ATO
ENCOSTAR*	Aproxima as antenas à região da cabeça e/ou lateral do élitro.
SUBIR*	Sobe no dorso do outro indivíduo.
MONTAR	Macho segura-se ao élitro do outro indivíduo com as garras das pernas protorácicas.
ARRASTAR*	Indivíduo caminha com o macho sobre seu corpo, em monta.
EVERSÃO	Macho exhibe o edeago.
RESVALAR*	Com o edeago evertido, macho inclina o abdômen em direção ao pigídio do outro indivíduo.
CÓPULA**	Macho insere edeago na abertura do pigídio do outro indivíduo, movimentando o abdômen repetidas vezes, de forma que o edeago entra e sai parcialmente da abertura do pigídio do outro.
RETIRAR*	Macho remove o edeago do pigídio do outro indivíduo.
RETRAIR*	Macho recolhe o edeago dentro da sua cavidade abdominal.
GUARDA	Macho permanece em monta, com edeago recolhido por alguns minutos.
DEIXAR	Macho sai do dorso do outro indivíduo, se afastando continuamente deste.

A escala de tons de cinza segue as etapas do acasalamento: pré-cópula, cópula e pós-cópula, respectivamente. *atos que mantiveram o mesmo nome dado por Souza (2013). **ato com mesmo nome dado por Souza (2013), mas que sofreu modificações na descrição.

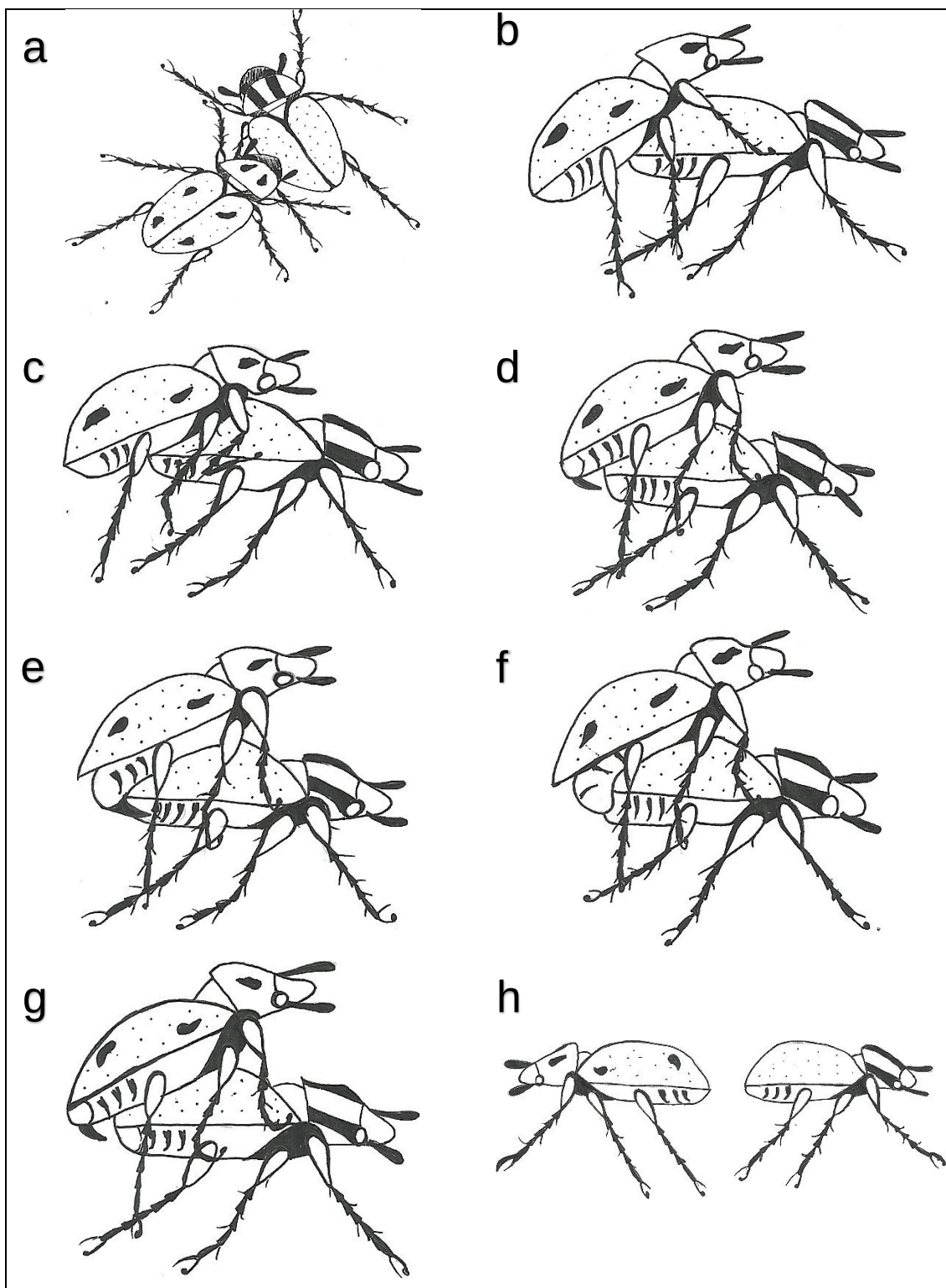


Figura 1. Sequência de acasalamento de *Cyclocephala distincta* (n = 25 pares). **a** um macho se aproxima de uma fêmea e esfrega as antenas no élitro dela; **b** macho sobe na fêmea; **c** macho monta a fêmea; **d** macho everte edeago; **e** macho inclina abdômem em direção ao pigídio da fêmea; **f** cópula; **g** macho retira o edeago da fêmea e o retrai junto ao seu corpo; **h** desmonta e separação dos indivíduos. Esquema comportamental adaptado do etograma de Souza (2013). Na ilustração, os machos são aqueles que possuem máculas nos élitros. Ilustração realizada por Maria Luiza Ferraz (IC – LEA/UFPE).

3.3.1 Bioensaio 1

Para as observações dos experimentos aqui reunidos, foi contabilizado o número de montas, eversões de edeago e cópulas realizadas, bem como o tempo que os machos levam para realizar a primeira monta. Os experimentos aqui agrupados tiveram o objetivo de avaliar o comportamento sexual desenvolvido pelos machos em diferentes situações propostas:

- (1) razão 1:1: machos pareados com outro macho e outra fêmea, em momentos distintos (N=25 para cada).
- (2) razão 2:1; machos pareados com dois machos, duas fêmeas, um macho e uma fêmea, constituindo três experimentos (N=25).
- (3) heteroespecíficos; machos tiveram como oferta indivíduos de uma espécie congênica (*C. paraguayensis*, N=40) e uma espécie distinta (*Anomala undulata*, Melsheimei, 1845, N=28).
- (4) coespecíficos vivos e mortos: os machos tiveram como oferta um macho morto, uma fêmea morta e, num terceiro momento, uma fêmea viva juntamente com uma fêmea morta (N=50). Os indivíduos mortos foram obtidos do freezer, proveniente de coletas anteriores.

3.3.2 Bioensaio 2

Para essas observações foram considerados o número de investidas (monta com eversão de edeago) realizadas pelos machos. Experimento prévio para avaliação do procedimento metodológico escolhido foi utilizado, testou-se se a retirada e reintrodução dos HCs afetaria o comportamento resposta do macho. Então eles foram pareados, em momentos diferentes, com fêmeas mortas com seus HCs intactos e com fêmeas mortas que tiveram seus HCs removidos e reintroduzidos. Resultados apontaram não haver diferença entre elas para o macho ($X^2 = 2,5$, gl = 1, $p = 0,1138$, $n=50$), tornando o procedimento seguro para os experimentos seguintes. Cada experimento constou de 50 repetições:

- (1) verificar o número de investidas do macho em cada um dos sexos que tiveram os HCs removidos. Machos foram pareados com machos e fêmeas inertes sem HCs, separadamente, resultando em dois bioensaios.

(2) verificar a reação do macho a inversão dos extratos cuticulares entre os sexos de indivíduos coespecíficos. Foi ofertado ao macho uma fêmea com HCs de macho e um macho com HCs de fêmea, constituindo dois bioensaios.

(3) análise da atratividade sexual de fêmeas congêneras mortas. Machos foram entam pareados com fêmeas de *C. paraguayensis* mortas, primeiramente, com os HCs intactos e, posteriormente, sem os HCs. Bioensaios realizados separadamente.

(4) análise do reconhecimento dos HCs de fêmeas coespecíficas. Para tal, foi utilizado o corpo de fêmeas de *C. paraguayensis* como modelo para adição do extrato cuticular da fêmea coespecífica. Assim, fêmeas *C. paraguayensis* com cutícula lavada, receberam em seu élitro a alíquota de 2,5 µL do extrato cuticular de fêmeas de *C. distincta* e foram oferecidas ao macho.

3.3.3 Análise de dados

Dados do bioensaio 1 foram analisados para normalidade com teste Shapiro-Wilks, aqueles que não apresentaram tal normalidade foram analisados com teste de Modelos Lineares Generalizados (GLM) com erro Poisson ou Quase Poisson.

Dados do bioensaio 2 foram analisados com teste qui-quadrado (X^2 -test) entre si e com o controle (fêmeas mortas intactas). Para ambas análises utilizou-se o programa estatístico R (versão 2.1.4), com índice de significância $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1 – MACHOS DE *Cyclocephala distincta* (MELOLONTHIDAE, CYCLOCEPHALINI) POSSUEM FRACA CAPACIDADE DE DISCRIMINAÇÃO SEXUAL

RESUMO

A maioria das espécies neotropicais de besouros da tribo Cyclocephalini são antófilas, dependendo das flores de seus hospedeiros para alimentação e abrigo, bem como sítios de acasalamento. Embora o papel dos compostos orgânicos voláteis florais como atrativos de longo alcance para esses besouros tenha recebido a devida atenção nos últimos anos, os mecanismos que mediam a discriminação de parceiros em agregações naturais de co- e heteroespecíficos ainda não estão claros. Em uma série de diferentes testes pareados e de múltipla escolha, registramos o comportamento sexual de machos de *Cyclocephala distincta* para verificar se eles favorecem fêmeas coespecíficas sobre machos e sobre fêmeas heteroespecíficas. A influência da movimentação também foi avaliada em bioensaios com indivíduos inertes, mortos por congelamento. Machos de *C. distincta* realizaram montas, o passo inicial do comportamento de acasalamento da espécie, com indivíduos coespecíficos de ambos os sexos indiscriminadamente. O investimento efetivo na cópula, no entanto, foi muito mais frequente nos pareamentos com o sexo oposto. Montas foram registradas em todas as repetições de pareamento heteroespecífico envolvendo fêmeas de *Cyclocephala paraguayensis*, e em 78% das repetições com fêmeas de *Anomala undulata*. Cópula seguiu-se à monta em 15% e 42% dos casos nessas espécies, respectivamente. Fêmeas vivas foram favorecidas em relação às fêmeas inertes em todas as etapas do comportamento de acasalamento. O tempo decorrido para que a primeira monta ocorresse foi significativamente maior em pareamentos com indivíduos inertes (machos ou fêmeas). No geral, nossos resultados mostram uma fraca capacidade de discriminação sexual por machos *C. distincta*, sugerindo que esta espécie deve depender da associação altamente específica com sua planta hospedeira para favorecer o encontro com o sexo oposto.

Palavras chave: Comportamento sexual. Cyclocephalini. Reconhecimento.

ABSTRACT

The majority of Neotropical species of cyclocephaline scarabs are anthophilous, relying on flowers of their preferred hosts for food and shelter, as well as mating sites. Although the role of floral volatile organic compounds as long-range attractants for these beetles has received due attention in recent years, the mechanisms that mediate close-range mate discrimination in natural aggregations of con- and heterospecifics are still unclear. In a series of different paired and multiple-choice tests, we recorded the mating-oriented behavior of male *Cyclocephala distincta* to verify whether they favor conspecific females over males, and over heterospecific females of similar size. The influence of movement was also assessed in bioassays with inert freeze-killed individuals. Male *C. distincta* attempted mounting, the initial step of mating behavior, with conspecifics of either sex indiscriminately. Effective copulation investment, nonetheless, was far more frequent in opposite sex pairings. Mountings were recorded in all replicates of heterospecific pairings with female *Cyclocephala paraguayensis*, and in 78% of replicates with female *Anomala undulata*. Copulation followed mounting in 15% and 42% of the cases, respectively. Live females were favored over inert freeze-killed females for all steps of mating behavior. The time elapsed for the first mounting to occur was significantly lengthier in pairings with inert conspecifics. Overall, our results depict poor mate discrimination ability by male *C. distincta*, suggesting that the species might rely on highly specific host plant associations to maximize conspecific encounters.

Key words: Sex behaviour. *Cyclocephala*. Recognition.

4.1.1 INTRODUÇÃO

Entre espécies em que a cópula ocorre em grandes agregações o reconhecimento intraespecífico tátil parece lógico para evitar cópulas desnecessárias e desperdício energético. Um exemplo típico ocorre na espécie *Dendroctonus brevicomis* LeConte, (Curculionidae) um tipo de besouro de casca que infestam as coníferas *Pinus ponderosa*, ocorrendo no oeste dos EUA, Canadá e México (KELSEY; JOSEPH, 2003). A agregação é intensificada nos eventos de queimadas que ocorrem ao longo do ano, a partir dos semioquímicos liberados pela planta nesse momento, atraindo os besouros e possibilitando o encontro dos

parceiros, a ocorrência de cópulas e a utilização dos troncos para oviposição, (MCCULLOUGH et al., 1998). As fêmeas são atraídas pelos terpenos liberados pela planta, alimentam-se e exalam feromônios sexuais para atrair machos. Juntos, machos e fêmeas liberam feromônios de agregação para ambos os sexos e também controlam a densidade populacional presente na árvore (RENWICK; VITÉ, 1970).

A tribo Cyclocephalini (Melolonthidae: Dynastinae) é um dos mais diversos grupos de coleópteros antófilos na região neotropical com hábitos crepusculares e noturnos (GOTTSBERGER; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, 1991), sendo atraídos por voláteis florais de suas plantas hospedeiras (MAIA et al, 2010, 2012; PEREIRA et al 2014; HOE et al, 2016), promovendo a agregação de machos e fêmeas na mesma inflorescência (MAIA et al., 2018). O alto nível de especificidade na atração de algumas espécies na relação inseto-planta hospedeira, como parece ocorrer com os Cyclocephalini, pode levar a perda da capacidade de produzirem feromônios de longa distância (GIBERNAU et al, 1999), embora seja uma hipótese nunca testada.

Pouco se sabe como machos e fêmeas se identificam dentro de um ambiente em que ambos ocorrem em grande quantidade dentro de um espaço limitado, na ausência de um dimorfismo sexual evidente, se mostrando apenas na presença de tarsos mais dilatados como nos machos Cyclocephalini (SOUZA, 2013). Possivelmente ocorre um sistema eficiente de reconhecimento sexual dentro da inflorescência, de forma a evitar o gasto excessivo de energia em busca do parceiro sexual, uma vez que podem ocorrer mais de uma espécie congênica na mesma unidade floral, como já observado por Maia (2011).

Na maioria dos insetos a escolha do parceiro sexual é realizada pela fêmea, que recebe a corte dos machos e decide qual deles tem melhor fitness (MILINSKI 2001; ALCOCK, 2011). O ato de passar as antenas no parceiro é muito frequente entre machos e fêmeas nos variados grupos de insetos (RUP, 1986; GROOT et al , 1998; NUKMAL et al, 2017). Outros comportamentos comuns aos insetos, que precede a cópula, é a monta, porque é nesta etapa que o macho efetivamente investe seus esforços na cópula (WALGENBACH; BURKHOLDER, 1987; OMKAR; SRIVASTAVA, 2002; SANTOS et al, 2017).

Cyclocephala distincta Burmeister, 1847 é encontrada em Pernambuco – Brasil visitando palmeiras e outras plantas da família das Arecaceae (ENDRODI, 1985; MAIA

et al., 2018). Sua biologia e comportamento reprodutivo foram estudados por Souza (2013, et al., 2014), e mostrou que machos são os responsáveis pela iniciativa da corte à fêmea. Para algumas espécies deste gênero o reconhecimento dos parceiros pode se dar por ambos os sexos (DIERINGER et al, 1998; BARBOSA; RODRIGUES, 2016; SANTOS, 2018), mas a maneira pela qual ocorre ainda é obscura.

Baseado no fato de que os indivíduos de *C. distincta* são atraídos à longa distância para as inflorescências da planta hospedeira onde também é utilizada para a cópula, num agregado composto por adultos morfologicamente parecidos, vamos testar a hipótese de que ocorre reconhecimento sexual tátil entre os indivíduos de *C. distincta*. Foram desenvolvidos experimentos para testar a atratividade sexual de indivíduos em diferentes razões sexuais e heterospecíficos. Também verificou-se a capacidade de discernimento entre indivíduos coespecíficos vivos ou mortos,, bem como sua atratividade sexual para os machos.

4.1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.2.1 Coleta e manutenção dos besouros

A coleta dos insetos foi realizada nos meses de dezembro/2016, março e abril/2017 na Usina São José, localizada no município de Igarassu/PE (7°40'21,25"–7°55'50,92"S e 34°54'14,25"–35°05'21,08"W), uma reserva particular de Floresta Atlântica localizada em Pernambuco, Brasil. Exemplares de *Cyclocephala distincta* foram atraídos por armadilha odorífera iscada com uma mistura 1:1 de 2-isopropil-3-metoxipirazina e 2-sec-butil-3-metoxipirazina (Sigma-Aldrich, pureza $\geq 99\%$), liberada através de um dispersor piezoeletrônico (250 μ L de cada composto diluídos em 250 mL de solução 1:50 de etanol em água deionizada) (MAIA et al. 2018). Juntamente, foi colocada uma armadilha luminosa (MAIA et al. 2010), afim de atrair besouros de outras espécies. Todos os insetos atraídos pelas armadilhas foram coletados manualmente e acondicionados em recipientes plásticos de 250 cm³ contendo terra vegetal da marca All Garden. Após período de aclimação (48h), os besouros foram individualizados até a realização das observações, que ocorreram entre 24-48h após individualização. Os experimentos foram desenvolvido no Laboratório de Entomologia Aplicada da Universidade Federal de Pernambuco, sob condições controladas de temperatura, entre 25 $\pm$ 2°C e fotofase de 12h. Todas as observações ocorreram entre

às 18h – 23h (ALBUQUERQUE et al., 2016). A manutenção das gailas e alimentação dos indivíduos seguiu metodologia utilizada por Souza et al., 2015.

4.1.2.2 Observações e experimentos desenvolvidos

As observações foram realizadas considerando-se os seguintes comportamentos: 1) monta (macho sobe no outro indivíduo, segura-se ao seu élitro pelas garras tarsais do primeiro par de pernas e permanece fixado por um período superior a dez segundos), 2) eversão (macho everte e retrai edeago) e 3) cópula (macho introduz seu edeago na abertura do pigídio da fêmea, movimenta dorso-ventralmente a cabeça repetidas vezes, simultaneamente com contração do abdômem). Essa sequência foi baseada em observações anteriores descritas para *C. distincta* (SOUZA, 2013) (Figura 1, Tabela 1). As observações foram feitas através do método Animal Focal (ALTMANN, 1974), por um período máximo de 20 minutos, em casos onde a cópula ocorreu antes deste tempo as observações encerraram-se com a realização da cópula.

Os registros foram feitos quanto ao número de montas realizadas pelos machos em cada repetição, o tempo levado para realizar a primeira monta e o número de eversões de edeago. Foi considerado como escolha do parceiro sexual e investida efetiva para cópula o ato de eversão do edeago desempenhado pelos machos, uma vez que este ato antecede a inserção do edeago, quando a cópula é iniciada.

Todos os tratamentos foram realizados em placa de petri (60x15mm). Repetições em que não houveram o comportamento foco (descritos acima) foram descartadas da análise. Cada placa de petri consistiu de uma repetição (um macho focal e um indivíduo ofertado), onde nos experimentos 1 à 3 os tratamentos constaram de 25 repetições, enquanto que o experimento 4 constou de 50 repetições, com indivíduos diferentes para cada uma.

4.1.2.2.1 Experimento 1 (Razão 1:1)

Os machos foram testados separadamente quanto à atratividade sexual que ambos os sexos possuem. No primeiro tratamento, machos foram pareados com machos. No segundo tratamento, machos foram pareados com fêmeas.

4.1.2.2.2 Experimento 2 (Razão 2:1)

Este experimento constou de três tratamentos, onde o macho focal foi pareado com 1) duas fêmeas, 2) dois machos e 3) um macho e uma fêmea. No tratamento com mais de um macho, para o reconhecimento individual dos besouros, cada um teve o élitro marcado com tinta inerte, da marca Acrilex, nas cores verde e branca. Menos de 1% da superfície total do corpo foi pintado. Um experimento preliminar mostrou que a coloração inserida no élitro não influencia na preferência sexual do macho quando pareado com fêmeas pintadas e não pintadas ($X^2 = 2,2857$, $df = 1$, $p\text{-value} = 0,1306$, $n=25$).

4.1.2.2.3 Experimento 3 (Heteroespecíficos)

Foram elaborados experimentos envolvendo espécies morfologicamente parecidas, usando testes sem opção de escolha. O macho focal foi pareado com 1) fêmeas de *Cyclocephala paraguayensis* Arrow, 1913, que possuem o dobro do tamanho de *C. distincta* e 2) com indivíduos da espécie *Anomala undulata* Melsheimer, 1845, com tamanho aproximado. Não foi possível identificar o sexo de *A. undulata*. Foram realizadas 20 repetições com *C. paraguayensis* e 14 repetições com *A. undulata*.

4.1.2.2.4 Experimento 4 (Coespecíficos vivos e mortos)

Machos focais foram colocados em três situações distintas: 1) uma fêmea morta; 2) um macho morto e 3) uma fêmea viva e uma fêmea morta. Indivíduos mortos foram provenientes de coletas anteriormente realizadas, onde se escolheu aleatoriamente um grupo de machos e fêmeas para serem mortos por congelamento. Eles permaneceram congelados, entre 3-4 dias, até realização das observações. Para que a temperatura não interferisse na escolha do macho, os indivíduos utilizados eram retirados do congelador 30 minutos antes de iniciar as observações. Cada tratamento contou com 50 repetições.

4.1.2.3 Análise dos dados

Todos os dados foram analisados para normalidade com o teste Shapiro-Wilks. Por não terem distribuição normal, foram analisados como dados não paramétricos, com o teste de Modelos Lineares Generalizados (GLM) com erro Poisson ou Erro Quase Poisson para aqueles que apresentaram sobredisperção de dados. Foi

utilizado o programa estatístico R (versão 2.1.4). Foi considerado significativo quando $p < 0.05$.

4.1.3 RESULTADOS

Ao se aproximarem do outro indivíduo, seja macho ou fêmea, os machos de *C. distincta* passaram as antenas no élitro do outro, buscando a região distal do élitro. Este comportamento pode ser seguido do ato de caminhar sobre o outro, para só em seguida realizar a monta. Mas pode ocorrer de forma rápida, não seguindo esta sequência na maioria das vezes, onde ele apenas monta o primeiro indivíduo que encontra (ver Figura 1, Tabela 1 em métodos).

4.1.3.1 Experimento 1 (Razão 1:1)

Estando com uma fêmea, a média foi de única monta até a cópula. O tempo gasto para realização da primeira monta teve média de $125,6 \pm 32,30$ segundos. Em apenas duas ocasiões houve eversão de edéago no tratamento macho x macho. Embora a investida efetiva para realizar cópula tenha ocorrido nesses dois casos, o tempo limite de observação foi encerrado sem que uma cópula fosse registrada. Os machos exibiram comportamento de “fuga” ao serem montados pelo macho focal, agitando o terceiro par de pernas, afastando-se rapidamente do outro macho.

Este comportamento de “fuga” também é exibido pelas fêmeas que não mostram-se receptivas para a cópula, porém não o desenvolvem na mesma agilidade que os machos que recebem a monta, levando-a a “aceitar” a cópula conforme a insistência do macho.

Ao comparar os os tratamentos deste experimento, não houve diferença significativa para machos ou fêmeas no que diz respeito ao número de montas (GLM com error Poisson, $X^2 = -0.1719$, $gl = 1$, $p = 0.47383$) e ao tempo para realização da primeira monta (GLM com error Poisson, $X^2 = 1035,1$, $gl = 1$, $p = 0,06498$) (Figura 1). Porém quando comparados a quantidade de eversões de edeago que ocorreram para tratamento, houve um número maior para as fêmeas, sendo significativamente diferente dos machos ($X^2 = -3.1570$, $gl = 1$, $p < 0,01$) (Figura 1).

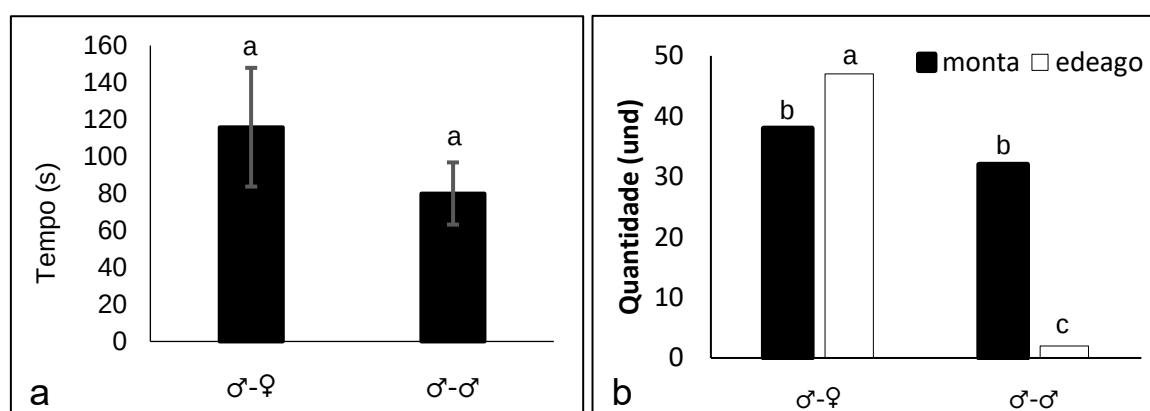


Figura 1. Comparação entre os tratamentos Macho x Fêmea e Macho x Macho, com razão 1:1, quanto ao tempo para realização da primeira monta (a) e número de montas e eversão de edeago realizadas (b) pelos machos de *Cyclocephala distincta*. Letras iguais indicam resultados sem diferença significativa. O intervalo dos gráficos indica o erro padrão.

4.1.3.2 Experimentos 2 (Razão 2:1)

No tratamento macho x fêmea x fêmea, não houve preferência por nenhuma delas, quanto ao número de montas realizadas (GLM com error Quasipoisson: $X^2 = 2,2857$, $gl = 1$, $p = 0,1306$) (Figura 2). Toda monta foi seguida por cópula. O tempo médio para realização da primeira monta foi de $65,4 \pm 7,29$ segundos.

No tratamento macho x macho x macho, o número de montas entre si não apresentou diferença significativa (GLM com error Quasipoisson: $X^2 = 0,81$, $gl = 1$, $p = 0,75$). O tempo para realização da primeira monta foi de aproximadamente quatro minutos. Não houve cópula registrada para nenhuma repetição no tempo limite das observações. Houve investida efetiva com everção de edeago em nove repetições.

Para comparar os dois tratamentos e verificar se existe uma possibilidade maior de machos montar as fêmeas em termos de quantidade, os dados de apenas um dos machos do segundo tratamento foi escolhido, aleatoriamente, uma vez que não houve diferença significativa entre eles quanto ao número de montas realizadas.

O número de montas realizadas pelo macho com os outros machos não apresentou diferença significativa comparado com o número de montas realizadas quando duas fêmeas estavam disponíveis ($X^2 = 0,5108$, $gl = 1$, $p = 0,091554$) (Figura 2). O tempo da primeira monta apresentou diferenças significativas, onde a monta levou mais tempo para ser realizada no tratamento envolvendo três machos ($X^2 = 288,43$, $gl = 1$, $p = 0,04325$) (Figura 2). A quantidade de investidas efetivas de cópula apresentou diferença significativa entre os tratamentos, ocorrendo mais quando machos estavam pareados com fêmeas (GLM com error Poisson, $X^2 = -1.56862$, $gl = 1$, $p = 0.00142$) (Figura 2).

No tratamento macho-fêmea-macho, não houve preferência sexual para a primeira escolha do macho ($X^2 = 0,4286$, $gl = 1$, $p = 0,512$). No entanto, o número de montas totais realizadas foi maior na fêmea ($X^2 = 91,95$; $gl = 1$, $p < 0,05$) (Figura 3). Das 21 repetições observadas, apenas 7 tiveram única monta com cópula na fêmea. Em 3 repetições, embora tenham montas registradas, não houve cópula, nas demais repetições as eversões de edeago seguiram com cópula em fêmeas.

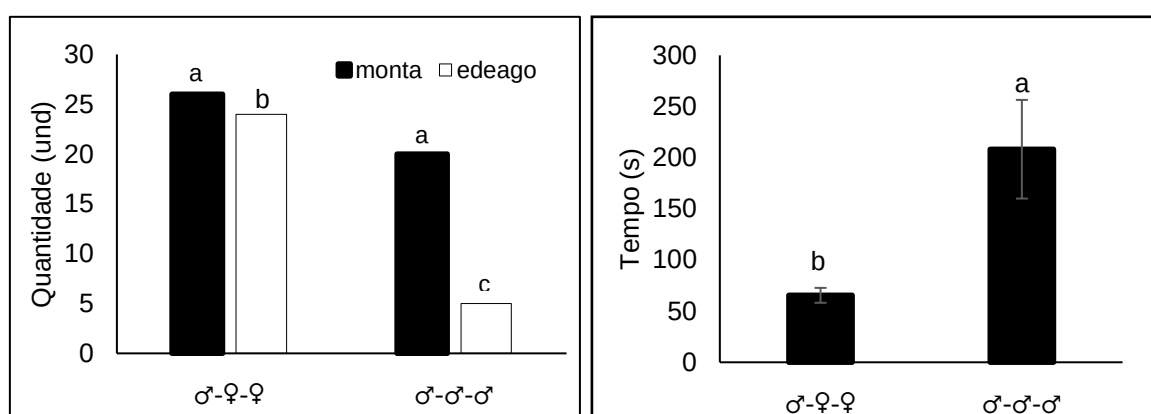


Figura 2. Gráficos comparando os tratamentos em que os machos de *Cyclocephala distincta* tinham dois machos x duas fêmeas como ofertas, com razão 2:1. Número de montas e eversão de edeago realizadas (gráfico à esquerda) e o tempo para realização da primeira monta em cada tratamento (gráfico à direita). *Indicação do tratamento significativo. Letras iguais indicam resultados sem diferença significativa.

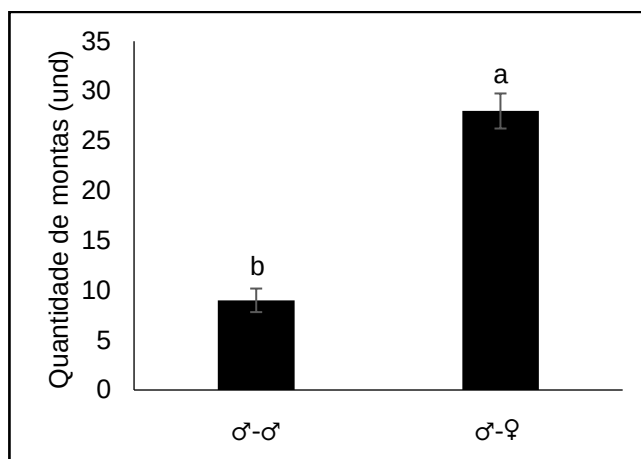


Figura 3. Gráfico do tratamento com dois machos e uma fêmea de *Cyclocephala distincta*. O intervalo dos gráficos indica o erro padrão.

4.1.3.3 Experimentos 3 (Heteroespecíficos)

Machos de *C. distincta* pareados com uma fêmea de *C. paraguayensis* tiveram montas em todas as repetições. Apenas 15% delas resultaram em cópulas (Tabela 1). Quando pareado com *A. undulata*, os machos de *C. distincta* tiveram 78% de montas, onde 42% resultaram em cópula, onde uma das repetições houve edeágo evertido duas vezes (Tabela 1).

Na aproximação de *C. distincta* a partir de uma determinada distância, *A. undulata* levantava o terceiro par de pernas, o que parecia desencorajar *C. distincta* de realizar a monta. Em alguns casos, *C. distincta* conseguia realizar a monta com sucesso sobre *A. undulata* antes mesmo deste comportamento de repelir. Com a monta em curso, *A. undulata* levantava as pernas, mas isso não fazia com que *C. distincta* se separasse.

Tabela 1. Atos executados por *Cyclocephala distincta* quando pareados com duas espécies, *Anomala undulata* e *Cyclocephala paraguayensis* (descrição dos atos no texto).

	<i>Anomala undulata</i> (n=28)		<i>Cyclocephala paraguayensis</i> (n=40)	
	qtd	média ± erro padrão	qtd	média ± erro padrão
Monta	11	0,39 ± 0,13	47	1,175 ± 0,29
Edéago	11	0,39 ± 0,13	15	0,375 ± 0,16
Cópula	6	0,21 ± 0,10	3	0,075 ± 0,04

4.1.3.4 Experimentos 4 (Coespecíficos vivos e mortos)

Nas observações do macho com uma fêmea morta, metade das repetições tiveram registro de monta, todos com uma monta por repetição.

Quando pareado com um macho morto, quatro repetições realizaram monta, correspondendo a 8% dos casos observados. Dentre essas repetições, 3 ocorreram eversão de edeago, embora não tenha ocorrido a cópula até a estrapolação do tempo limite de observação.

Ao comparar os dois últimos tratamentos que envolveram machos e fêmeas mortos, a quantidade de montas e eversões de edeago realizadas foi significativamente superior nas fêmeas (Figura 4).

O terceiro tratamento envolveu duas opções de escolha para o macho, uma fêmea morta e outra viva. O número de montas foi superior para as fêmeas vivas, com 36 registros, enquanto que oito montas foram contabilizadas para fêmeas mortas. Apenas em 3 repetições houve mais de uma monta realizada, todas elas ocorrendo na mesma fêmea. Em duas repetições houve monta em cada uma das fêmeas.

O tempo da primeira monta até a cópula também foi superior quando comparado com as fêmeas mortas. Das 30 repetições em que houve cópula, 26 foram com fêmeas vivas e 4 com fêmeas mortas (Figura 5).

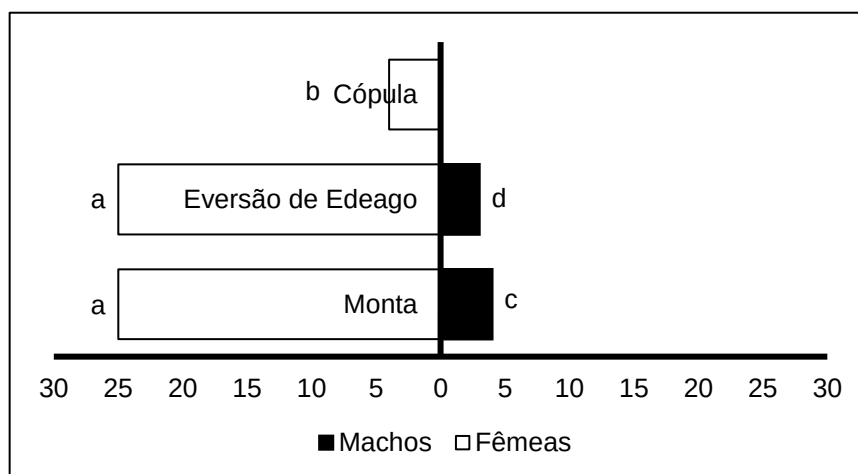


Figura 4. Gráfico com a quantidade dos atos observados por machos de *Cyclocephala distincta* com indivíduos mortos de ambos os sexos. Letras iguais indicam resultados sem diferença significativa.

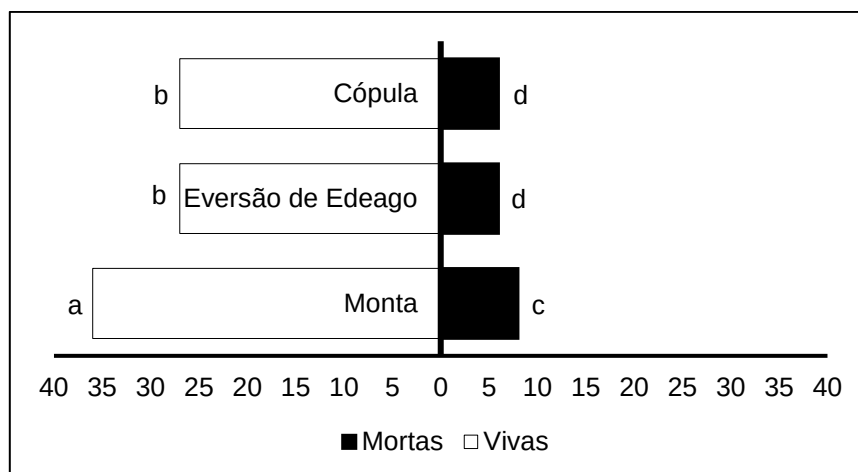


Figura 5. Gráfico com a quantificação dos atos comportamentais, envolvidos no reconhecimento sexual, observados nos machos de *Cyclocephala distincta* com fêmeas vivas e mortas, ambas coespecíficas. Letras iguais indicam resultados sem diferença significativa.

4.1.4 DISCUSSÃO

Machos de *Cyclocephala distincta* realizam atos comportamentais pré-copulatórios para ambos os sexos sem distinção aparente, para indivíduos de espécies diferentes e inclusive para indivíduos mortos. Embora o ato da monta seja o passo inicial na identificação, este é confirmado com a eversão do edeago, que ocorre em sequência e precede a inserção do edeago, efetivando a cópula (GROOT, 1998; SOUZA, 2013; NUKMAL et al, 2017). O que não ocorre para todos os indivíduos com quem os machos esbarram, uma vez que a monta seguida por eversão de edeago ocorreu em sua maioria com as fêmeas. Provavelmente, o investimento para se ter uma seleção sexual a curta distância de forma rápida não compensa (SERRANO et al, 1991; SCHARF; MARTIN, 2013), resultando em montas aleatórias, independente da atração específica. Assim como já visto nas ordens Coleoptera, Hymenoptera e Diptera (SERRANO et al, 1991; SCHARF; MARTIN, 2013; SWITZER et al, 2014).

Cyclocephala é um gênero dependente do sistema de dispersão de odores florais para se agruparem no mesmo espaço (HOE et al, 2016; MAIA et al., 2018). Nas observações realizadas em laboratório, os machos comportam-se da mesma forma com todos os indivíduo que esbarram, desenvolvendo os mesmos atos de reconhecimento: aproximar, tatear o élitro do outro indivíduo com as antenas, caminhar sobre e montar. Sabendo que o local em que estão inseridos é bastante seletivo, atraindo em sua maioria apenas uma espécie (GOTTSBERGER;

SILBERBAUER-GOTTSBERGER, 2006), o comportamento de monta aleatória funciona como uma estratégia para evitar desperdício energético, pois a primeira seleção já foi realizada pelo odor floral (THORNILL; ALCOCK, 1983; SCHARF; MARTIN, 2013; HOE et al, 2016).

A maioria dos casos de comportamento sexual macho-macho sugere que poderia ser o resultado de identificações erradas (ver revisão de SCHARF; MARTIN 2013). Nossos resultados sugerem que *C. distincta* não teve uma seleção pré-sexual, e provavelmente é incapaz de se diferenciar entre indivíduos da mesma espécie. Assim, após a montao macho insistirá na cópula que só será concluída se o indivíduo montado puder ser facilmente penetrado ou se o esforço contínuo durar muito tempo, desestimulando o macho da tentativa de cópula.

Nos insetos, a falta de discernimento sexual caracterizada por montas e eversão de edeago entre indivíduos de mesmo sexo já foram registradas em *Palmarcorixa nana* Waley, 1930 (Hemiptera), *Diaprepes abbreviatus* Linnaeus, 1758 (Curculionidae) e *Tribolium castaneum* Herbst, 1797 (Tenebrionidae) (AIKEN 1981; SERRANO et al 1991; HARARI et al 2000). O não investimento no reconhecimento imediato do parceiro sexual é positivo para as espécies onde machos e fêmeas se agregam no mesmo ambiente, com razões sexuais aproximando-se de 1:1, evitando o gasto energético desnecessário, resultando no reconhecimento do parceiro correto através de tentativa-e-erro (THORNILL; ALCOCK, 1983; SERRANO et al, 2000; BAILEY; ZUK, 2009). Evolutivamente, a estratégia desse macho aumenta seu fitness em detrimento daqueles machos que escolhem o que montar (BAILEY; ZUK, 2009; ALCOCK, 2011).

Os machos de *C. distincta* também realizaram comportamento copulatório com indivíduos heteroespecíficos, quando sem chance de escolha. O elevado número de eversões de edeago e cópulas registrada na interação com *Anomala undulata* pode ter ocorrido devido a sua grande semelhança morfológica com *C. distincta*. Erros que inviabilizam o discernimento sexual em decorrência das semelhanças entre o tamanho, formato do corpo e coloração dos élitros ocorrem com *Tribolium castaneum* e *T. confusum* Duval 1913 (Tenebrionidae) (SERRANO et al, 1991, 2000). Essas semelhanças morfológicas contudo não ocorrem com *C. paraguayensis*, que possui o dobro de tamanho de *C. distincta* e são notadamente mais vagarosos, não reagindo depois de montados.

Para machos de *C. distincta*, o impulso inato à cópula parece ser um elemento comportamental que suplanta a necessidade de reconhecimento do parceiro. Em um desenho experimental que foge à situação natural, no qual machos de *C. distincta* não tinham oportunidade de encontrar fêmeas coespecíficas, o estímulo oriundo da presença de indivíduos que a elas se assemelhavam pareceu ser suficiente para disparar o comportamento de acasalamento dos machos.

A incapacidade dos machos de realizar escolhas corretas de parceiras coespecíficas é geralmente baseada em medidas imprecisas para o reconhecimento do acasalamento, já que o tamanho, por exemplo (SOLESNKY, 2004), deve desencadear o comportamento sexual mesmo diante de um indivíduo de outra espécie. Este comportamento corrobora a hipótese de acasalamento heteroespecífico (GRÖNING; HOCHKIRCH, 2008), um tipo de interferência reprodutiva em que o comportamento sexual heteroespecífico é bem sucedido quando há barreiras sexuais fracas e baixa rejeição entre as espécies.

Quando os indivíduos não apresentam reação, machos de *C. distincta* conseguem distinguir os sexos. De fato, apesar do sistema não ser totalmente direcional, como ocorre em sistemas onde os feromônios de contato auxiliam o reconhecimento (STEIGER et al, 2007; CHUNG; CARROLL, 2015; BILLETER; LEVINE, 2015; LANE et al, 2015, 2016; XUE et al, 2016; SANTOS, 2018), existe algum componente inato das fêmeas que os machos reconhecem e fazem com que eles optem por indivíduos do sexo oposto. As fêmeas, em sua maioria, tendem a resistir as investidas, desde o momento em que ocorre a monta. Porém, sua resistência ao macho que está montando é consideravelmente menor do que machos que recebem a monta. Machos conseguem se desvencilhar rapidamente através de esperneio. Provavelmente é a baixa resistências das fêmeas que leva a um número muito maior de eversões de edeago e cópulas ocorrendo com elas.

Ao observar os efeitos da reação do indivíduo montado diante da persistência no ato copulatório dos machos de *C. distincta*, os mesmos apresentam maior quantidade de atos comportamentais copulatórios para fêmeas vivas do que fêmeas mortas. Por sua vez, machos demonstram discernimento sexual direcionado às fêmeas coespecíficas, quando indivíduos inanimados de ambos os sexos lhes são oferecidos. Embora exista um provável caráter químico no mecanismo de discernimento sexual por machos de *C. distincta*, este parece na verdade ser melhor explicado pela

interação com elementos comportamentais exibidos exclusivamente pela fêmea, apresentando-se dessa forma sinergicamente diferentes daqueles encontrados em outros machos, ou indivíduos inertes.

4.1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIKEN, R. B. The Relationship between body weight and homosexual mounting in *Palmarcorixa nana* Walley (Heteroptera: Corixidae). **The Florida Entomologist**, [s.l.], v. 64, n. 2, p.267-271, jun. 1981. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/3494579>.

ALCOCK, John. **Comportamento animal: uma abordagem evolutiva**. Coordenação da tradução: Eduardo Bessa Pereira da Silva; Revisão técnica: Regina Helena Ferraz Macedo. - 9. ed. - Porto Alegre: Artmed. 2011.

ALTMANN J. Observational study of behavior: sampling methods. **Behaviour**. Jan 1; 49(3): 227-66, 1974.

BAILEY, Nathan W.; ZUK, Marlene. Same-sex sexual behavior and evolution. **Trends in Ecology and Evolution**, [s.l.], v. 24, n. 8, p.439-446, aug. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2009.03.014>.

BARBOSA, Carlos Aparecido; RODRIGUES, Sérgio Roberto. Comportamento de cópula em *Cyclocephala verticalis* Burmeister (Coleoptera: Scarabaeidae). **Entomobrasilis**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.158-162, dez. 2016. <http://dx.doi.org/10.12741/ebrasilis.v9i3.581>.

BILLETER, Jean-christophe; LEVINE, Joel D. The role of cVA and the Odorant binding protein Lush in social and sexual behavior in *Drosophila melanogaster*. **Frontiers in Ecology and Evolution**, [s.l.], v. 3, p.1-14, jul. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fevo.2015.00075>.

BONDURIANSKY, Russell. The evolution of male mate choice in insects: a synthesis of ideas and evidence. **Biological Reviews of The Cambridge Philosophical Society**, [s.l.], v. 76, n. 3, p.305-339, aug. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1017/s1464793101005693>.

CHUNG, Henry; CARROLL, Sean B. Wax, sex and the origin of species: Dual roles of insect cuticular hydrocarbons in adaptation and mating. **Bioessays**, [s.l.], v. 37, n. 7, p.822-830, may 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201500014>.

DIERINGER, Gregg et al. Endothermy and floral utilization of *Cyclocephala caelestis* (Coleoptera: Scarabaeoidea; Melolonthidae): a cloud forest endemic beetle. **Acta Zoológica Mexicana**, México, n. 73, p.145-153, jun. 1998. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.032763>.

ENDRÖDI, Sebo. **The Dynastinae of the world**. Springer, 1985. ISBN 906193138X.

FOELKER, C. J.; HOFSTETTER, R. W. Heritability, Fecundity, and Sexual size dimorphism in four species of bark beetles (Coleoptera: Curculionidae). **Annals of the Entomological Society of America**, [s.l.], v. 107, n. 1, p.143-151, jan. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1603/an12153>.

GIBERNAU, Marc et al. Beetle pollination of *Philodendron solimoesense* (Araceae) in French Guiana. **International Journal of Plant Sciences**, [s.l.], v. 160, n. 6, p.1135-1143, nov. 1999. University of Chicago Press. <http://dx.doi.org/10.1086/314195>.

GOTTSBERGER, Gerhard; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, Ilse. **Life in the Cerrado: a South American Tropical Seasonal Ecosystem**. Vol.II. Pollination and Seed Dispersal. Reta, Ulm. 2006.

GOTTSBERGER, Gerhard; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, Ilse. Olfactory and visual attraction of *Erioscelis emarginata* (Cyclocephalini, Dynastinae) to the inflorescences of *Philodendron selloum* (Araceae). **Biotropica**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.23-28, mar. 1991. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/2388684>.

GRÖNING, Julia; HOCHKIRCH, Axel. Reproductive interference between animal species. **The Quarterly Review of Biology**, [s.l.], v. 83, n. 3, p.257-282, sep. 2008. University of Chicago Press. <http://dx.doi.org/10.1086/590510>.

GROOT, Astrid T. et al. Copulation behaviour of *Lygocoris pabulinus* under laboratory conditions. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, [s.l.], v. 88, n. 3, p.219-228, sep. 1998. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1570-7458.1998.00366.x>.

HARARI, A. R.; BROCKMANN, H. J.; LANDOLT, P. J. Intrasexual mounting in the beetle *Diaprepes abbreviatus* (L.). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 267, n. 1457, p.2071-2079, oct. 2000. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2000.1251>.

HOE, Yin Chen et al. Flowering mechanisms, pollination strategies and floral scent analyses of syntopically co-flowering *Homalomena* spp. (Araceae) on Borneo. **Plant Biology**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.563-576, jul. 2016. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/plb.12431>.

KELSEY, Rick G; JOSEPH, Gladwin. Ethanol in ponderosa pine as an indicator of physiological injury from fire and its relationship to secondary beetles. *Canadian Journal of Forest Research*, [s.l.], v. 33, n. 5, p.870-884, may 2003. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/x03-007>.

LANE, S. M. et al. Sexual Selection on male cuticular hydrocarbons via male-male competition and female choice. **Journal of Evolutionary Biology**, [s.l.], v. 29, n. 7, p.1346-1355, jul. 2016. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jeb.12875>.

LANE, Sarah M. et al. Rival male chemical cues evoke changes in male pre- and post-copulatory investment in a flour beetle. **Behavioral Ecology**, [s.l.], v. 26, n. 4, p.1021-1029, jul. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/beheco/arv047>.

MAIA, A.C.D. Atração olfatória em sistemas de polinização Cyclocephalini-arácea (Scarabaeidae, Dynastinae; Araceae) e manutenção em cativeiro de *Cyclocephala*. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal da Paraíba, UFPB, Brasil. 2011.

MAIA, Artur Campos Dália et al. 2-Alkyl-3-methoxypyrazines are potent attractants of florivorous scarabs (Melolonthidae, Cyclocephalini) associated with economically exploitable Neotropical palms (Arecaceae). **Pest Management Science**, [s.l.], p.1-9, mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.4895>.

MAIA, Artur Campos Dália et al. The cowl does not make the monk: scarab beetle pollination of the neotropical aroid *Taccarum ulei* (Araceae). **Biological Journal of The Linnean Society**, [s.l.], v. 108, n. 1, p.22-34, dec. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8312.2012.01985.x>.

MAIA, Artur Campos Dália et al. Pollination of *Philodendron acutatum* (Araceae) in the Atlantic Forest of Northeastern Brazil: A Single scarab beetle species guarantees high fruit set. **International Journal of Plant Sciences**, [s.l.], v. 171, n. 7, p.740-748, sep. 2010. University of Chicago Press. <http://dx.doi.org/10.1086/654846>.

MCCULLOUGH, Deborah G.; WERNER, Richard A.; NEUMANN, David. Fire and insects in northern and Boreal Forest ecosystems of North America. **Annual Review of Entomology**, [s.l.], v. 43, n. 1, p.107-127, jan. 1998. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.107>.

MILINSKI M. The economics of sequential mate choice in sticklebacks. In: Dugatkin LA (ed) **Model systems in behavioral ecology: integrating conceptual, theoretical and empirical approaches**. Princeton University Press, Princeton pp 245–264. 2001.

NUKMAL, Nismah et al. Ethogram of mating and male mate-locating strategy of *Papilio peranthus* (Lepidoptera: Papilionidae) at Gita Persada butterfly park, Lampung, Indonesia. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, India, v. 1, n. 5, p.869-874, 2017.

OMKAR, Omkar; SRIVASTAVA, Shefali. The reproductive behaviour of an aphidophagous ladybeetle, *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). **European Journal of Entomology**, [s.l.], v. 99, n. 4, p.465-470, 10 dec. 2002. Biology Centre, AS CR. <http://dx.doi.org/10.14411/eje.2002.060>.

PEREIRA, Juliana et al. *Philodendron adamantinum* (Araceae) lures its single cyclocephaline scarab pollinator with specific dominant floral scent volatiles. **Biological Journal of the Linnean Society**, [s.l.], v. 111, n. 3, p.679-691, feb. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/bij.12232>.

RENEWICK, J. A. A., and VITÉ, J. P. Systems of chemical communication in *Dendroctonus*. **Systems of chemical communication in Dendroctonus**, v. 24, n.13, p.283-292, jun.1970.

RUP, Pushpinder J. Mating and its attendant behaviour in *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, [s.l.], v. 22, n. 2, p.77-79, apr. 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-474x\(86\)90022-6](http://dx.doi.org/10.1016/0022-474x(86)90022-6).

SANTOS, Elisabete A. dos et al. Sexual behavior in ladybird beetles: Sex with lights on and a twist for *Tenuisvalvae notata* (Coleoptera). **Behavioural Processes**, [s.l.], v. 144, p.93-99, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beproc.2017.09.006>.

SANTOS, Geanne Karla Novais. Semioquímicos e perfil de hidrocarbonetos cuticulares em espécies de besouros antófilos da tribo Cyclocephalini. **Tese de Doutorado**, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco. 2018.

SCHARF, Inon; MARTIN, Oliver Y. Same-sex sexual behavior in insects and arachnids: prevalence, causes, and consequences. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, [s.l.], v. 67, n. 11, p.1719-1730, aug. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00265-013-1610-x>.

SERRANO, José M et al. Inter- and intraspecific sexual discrimination in the flour beetles *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum*. **Heredity**, [s.l.], v. 85, n. 2, p.142-146, aug. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2540.2000.00741.x>.

SERRANO, José M. et al. The genetic properties of homosexual copulation behavior in *Tribolium castaneum*: Diallel analysis. **Behavior Genetics**, [s.l.], v. 21, n. 6, p.547-558, nov. 1991. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01066681>.

SOLENSKY, Michelle J. The effect of behavior and ecology on male mating success in overwintering monarch butterflies (*Danaus plexippus*). **Journal of Insect Behavior**, v. 17, n. 6, p. 723-743, nov. 2004. <https://doi.org/10.1023/B:JOIR.0000048985.58159.0d>.

SOUZA, Thamyrys Barbosa. Aspectos biológicos, descrição dos imaturos e comportamento de cópula de *Cyclocephala distincta* Burmeister (Coleoptera: Dynastinae, Cyclocephalini). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil. 2013.

SOUZA, Thamyrys Bezerra de et al. The life of *Cyclocephala celata* Dechambre, 1980 (Coleoptera: Scarabaeidae). **Journal of Natural History**, [s.l.], v. 48, n. 5-6, p.275-283, jul. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00222933.2013.791886>.

STEIGER, S. et al. The smell of parents: breeding status influences cuticular hydrocarbon pattern in the burying beetle *Nicrophorus vespilloides*. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 274, n. 1622, p.2211-2220, sep. 2007. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2007.0656>.

SWITZER, Paul V; FORSYTHE, Patrick S; KRUSE, Kipp C. Male-male mounting and the unreliability of body size as a character for mate choice in male Japanese beetles (*Popillia japonica* Newman). **Zoological Studies**, [s.l.], v. 53, n. 1, p.53-60, aug. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s40555-014-0053-z>.

THORNHILL, Randy; J. ALCOCK, John. **The evolution of insect mating systems**. Harvard University Press, Cambridge, 576p. 1983.

VOEKS, Robert A. Reproductive ecology of the piassava palm (*Attalea funifera*) of Bahia, Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, [s.l.], v. 18, n. 01, p.121-136, jan. 2002. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0266467402002079>.

WALGENBACH, Catherine A.; BURKHOLDER, Wendell E. Mating Behavior of the Maize Weevil, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **Annals of the Entomological Society of America**, [s.l.], v. 80, n. 5, p.578-583, sep. 1987. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/aesa/80.5.578>.

XUE, Huai-jun et al. Contact pheromones of 2 sympatric beetles are modified by the host plant and affect mate choice. **Behavioral Ecology**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.895-902, jan. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/beheco/arv238>.

4.2 ARTIGO 2 – PAPEL DOS HIDROCARBONETOS CUTICULARES NO RECONHECIMENTO SEXUAL DE *Cyclocephala distincta* (MELOLONTHIDAE: CYCLOCEPHALINI)

RESUMO

O estudo do comportamento sexual de uma espécie permite um maior entendimento sobre sua ecologia e evolução. Em grandes agregações, que muitas vezes agrupam centenas ou milhares de indivíduos em flores ou inflorescências de suas plantas hospedeiras, besouros antófilos da tribo Cyclocephalini devem identificar corretamente seus parceiros sexuais para assegurar seu sucesso reprodutivo. Sabendo que os hidrocarbonetos cuticulares (HCs) funcionam como feromônios de contato em uma diversa gama de espécies de besouros, este estudo teve como objetivo investigar se eles também são elementos-chave no processo de reconhecimento sexual em *Cyclocephala distincta*. Foram analisadas amostras de extratos hexânicos de HCs obtidos de machos e fêmeas da espécie, e registrados os comportamentos dos machos quanto à sua presença, ausência, transposição (macho / fêmea) e reintrodução. A caracterização química de extratos cuticulares de machos e fêmeas por cromatografia gasosa - espectrometria de massa (GC-MS) não mostrou diferenças composicionais qualitativas entre os sexos. O perfil químico do HCs de *C. distincta* é amplamente dominado por parafinas e olefinas de numeração ímpar (23C a 31C), mas hidrocarbonetos ramificados e um éster alifático também foram identificados. Os resultados dos bioensaios demonstraram que os HCs, por si sós,

não exercem influência sobre o reconhecimento sexual na espécie, mas reforçam o reconhecimento intraespecífico.

Palavras-chave: Reconhecimento sexual. Coleoptera. Reprodução. Comportamento.

ABSTRACT

The study of a species' sexual behavior allows a greater understanding about its ecology and evolution. In large aggregations that often account for hundreds or thousands of individuals in flowers or inflorescences of their host plants, anthophilous cyclocephaline scarabs must identify correctly their sexual partners to ensure optimal reproductive success rates. Knowing that cuticular hydrocarbons (CHCs) function as close-range pheromones in a diverse range of species of beetles, this study aimed to investigate whether they are also key elements in the sexual recognition process in *Cyclocephala distincta*. Thus, we analyzed samples of hexane CHC extracts obtained from both males and females of the species, and recorded male behavior regarding their presence, absence, transposal (male/female) and reintroduction. Chemical characterization of male and female CHC extracts by gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) showed no qualitative compositional differences between sexes. The CHC chemical profile of *C. distincta* is largely dominated by odd-numbered paraffins and olefins (23C to 31C), but branched hydrocarbons and an aliphatic ester were also identified. Bioassay results demonstrated that CHCs alone do not exert influence on the sex recognition in the species, but bolsters intraspecific recognition.

Key words: Sex recognition. Coleoptera. Reproduction. Behavior.

4.2.1 INTRODUÇÃO

A forma como os pares se comportam durante a cópula, nos possibilita uma melhor compreensão de sua ecologia comportamental evolutiva (THORNHILL; ALCOCK, 1983). A forma como os parceiros se encontram e a sequência de atos que podem ocorrer, por ambos os sexos, variam entre as espécies de insetos, embora três etapas distintas ocorram: pré-cópula, cópula e pós-cópula (KAMYIA et al., 2015; KEPPNER et al., 2017).

Em espécies que fazem uso de suas plantas hospedeiras como sítios de agregação, é comum que os indivíduos se reúnem devido a liberação de feromônio de longo alcance (RODRIGUEZ-REBOLLAR et al., 2012) ou por compostos orgânicos voláteis (COVs) liberados pelas flores da planta hospedeira (MAIA et al., 2010; 2012). Em espécies de insetos que são atraídos por COVs para reprodução, podem ocorrer agrupamentos de um número consideravelmente grande de indivíduos em um espaço relativamente limitado, de forma que o reconhecimento do parceiro sexual precisa se dar através de mecanismos de reconhecimento de curto alcance. Nesta condição o encontro dos parceiros sexuais pode ser mediado por feromônios sexuais de contato, sendo estes geralmente encontrados na cutícula dos indivíduos (HOWARD; BLOMQUIST, 2005). Em alguns casos, os compostos para reconhecimento sexual geralmente são os hidrocarbonetos cuticulares (HCs) (XUE et al., 2016).

Os HCs são compostos constituídos por carbono e hidrogênio, formando cadeias que variam de 21 à 50 carbonos, sintetizados por oenócitos (HOWARD; BLOMQUIST, 2005). Suas propriedades hidrofóbicas e lipofílicas funcionam para evitar a dessecação. As longas cadeias configuram compostos não voláteis, que podem atuar no reconhecimento à curta distância entre os indivíduos (BLOMQUIST; BAGNÈRES, 2010).

Os HCs foram identificados e reconhecidos como feromônios sexuais de contato em diversas espécies de besouros, especialmente naquelas que necessitam da planta hospedeira como fonte de alimento e reprodução (XUE et al., 2016). A especificidade dos HCs podem influenciar inclusive no isolamento reprodutivo em alguns casos (SHIMOMURA et al., 2010). Isto sugere que os HCs desempenham um importante papel na reprodução de muitos besouros.

Entre os Melolonthidae, a tribo Cyclocephalini é a mais diversa, havendo registros de espécies por toda América, África e Sudeste Asiático (RATCLIFFE; CAVE, 2013). Esses besouros são atraídos por COVs exalados pelas plantas que visitam, sendo esses espécie-específicos e essenciais para a reprodução floral e dos besouros (HOE et al., 2016). É através dos COVs liberados durante o período de vôo dos besouros que machos e fêmeas se agregam nas inflorescências, onde encontram alimento e possibilidade de reprodução (MAIA et al., 2010; MAIA et al., 2018).

Entre os Cyclocephalini, o gênero mais diverso é *Cyclocephala*, constituído por besouros antófilos com distribuição Neotropical, existindo em grande quantidade na América do Sul (ENDRODI, 1985; RATCLIFFE; CAVE, 2006; SCHOOLMEESTERS, 2018). Em Pernambuco *Cyclocephala distincta* Burmeister, 1847, foi encontrado em palmeiras (Arecaceae) nos resquícios de Mata Atlântica do estado (ALBUQUERQUE et al., 2016; MAIA et al., 2018) tendo sua biologia e comportamento reprodutivo estudados por Souza (2013) e seu período de atividade estudado por Albuquerque et al. (2016).

Experimentos de teste de escolha, realizados em laboratório, mostraram que machos de *C. distincta* tem baixa capacidade de discernimento em reconhecer parceiros sexuais em um primeiro momento de monta (Capítulo 1), mas que tendem posteriormente a elicitar comportamento copulatório na maioria das vezes em fêmeas. Baseado nesta evidência, levantamos a hipótese de que este tipo de reconhecimento sexual tardio em *C. distincta* pode estar relacionado aos HCs. Desta forma identificamos os componentes dos extratos cuticulares de machos e fêmeas de *C. distincta* e desenvolvemos experimentos comportamentais baseados na presença e ausência de HCs, que possibilitaram avaliar seu papel no reconhecimento sexual da espécie.

4.2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.2.1 Coleta e manutenção dos insetos em cativeiro

A coleta dos insetos foi realizada na Usina São José, localizada no município de Igarassu/PE (7°40'21,25"–7°55'50,92"S e 34°54'14,25"–35°05'21,08"W), numa área de borda florestal. Exemplos de *Cyclocephala distincta* foram coletadas conforme metodologia descrita no Capítulo I. Os insetos foram coletados manualmente e acondicionados em recipientes plásticos de 250 cm³ contendo terra vegetal e mantidos individualizados até a realização das observações. A extração cuticular ocorreu no Laboratório de Ecologia Química, no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os bioensaios comportamentais foram executados no Laboratório de Entomologia Aplicada da UFPE no período noturno, entre 18h e 23h.

4.2.2.2 Extração dos HCs

Para extração cuticular, machos e fêmeas foram acondicionados temporariamente em recipiente contendo areia fina lavada para remoção das impurezas superficiais presentes em suas cutículas a partir de caminhadas por dentro da camada de areia. Posteriormente, foram individualizados em frascos de vidro de 10 ml, lavado e autoclavado, para que pudessem receber os insetos. Estes foram armazenados à -5°C para ocorrer anestesia e morte por congelamento, permanecendo no freezer até extração cuticular.

Os besouros foram imersos em 2 ml de n-hexano bidestilado seguido de agitação manual por 2 minutos. Após o tempo de extração, a solução foi retirada com uma pipeta de Pasteur e transferida para um vial com capacidade para 1,5 ml. A solução foi então concentrada sob fluxo laminar de N₂ até um volume final de 200 µl. O procedimento de limpeza e extração foi repetido para cada conjunto de indivíduo estabelecido para extração. Cada extrato de fêmea ou macho de *C. distincta* correspondeu a um *pool* de 10 indivíduos. Foram obtidas 5 amostras de fêmea, 3 de machos. Duas amostras também foram obtidas de fêmeas de *C. paraguayensis* Arrow, 1913, com mesma metodologia utilizada para *C. distincta*, porém com um volume de 5 ml para imersão das fêmeas, por se tratarem de indivíduos maiores. Os *vials* contendo extratos cuticulares foram mantidos sobre refrigeração até a realização das análises por CG-EM.

A imersão dos insetos pelo período de 2 minutos em hexano não afetou a extração dos hidrocarbonetos cuticulares, permitindo uma extração com pouca interferência de outras classes de lipídios, eliminando a necessidade de realização de coluna cromatográfica para purificar as frações lipídicas. Assim, utilizou-se a mesma quantidade de extrato para cada indivíduo ofertado nos bioensaios comportamentais seguintes.

4.2.2.2.1 Análise dos extratos cuticulares

Os extratos foram analisados em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas com analisador do tipo quadrupolo Agilent 5975C Series (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) equipado com coluna apolar HP-5 (Agilent J&W, 60 m x 0.25 mm diâmetro interno; espessura do filme 0.25 µm). As amostras foram analisadas sob as seguintes condições: temperatura inicial de 60°C (mantida

por 1 min), rampa de aquecimento de 15°C/min e temperatura final de 260°C, que foi mantida por 20 minutos. O gás de arraste utilizado foi o hélio, a fluxo constante de 1mL por minuto e a temperatura do injetor foi mantida a 250°C. Os compostos eluídos da coluna cromatográfica foram ionizados por impacto de elétrons à 70 eV. A fonte de ionização foi mantida à 230° C e o quadrupolo à 150°C. Os espectros de massa foram obtidos no modo *scan* com velocidade de 0,5 scan por segundo, com faixa de varredura de *m/z* de 35 a 550.

Uma alíquota de 1 µl de cada extrato foi injetada em modo *splitless*. Os compostos foram identificados por meio da análise dos espectros de massa de cada pico cromatográfico, comparação com padrões autênticos e cálculo de índices de retenção. Foram calculados os índices de retenção linear dos componentes dos extratos cuticulares utilizando-se os tempos de retenção de cada composto e os tempos de retenção de alcanos (C9 a C34) analisados sob as mesmas condições. Os valores calculados foram comparados com os índices de retenção publicados na literatura (ADAMS, 2007; NIST WEBBOOK, 2014).

O efeito do sexo dos animais (fêmeas ou machos) sobre a composição média dos HCs de *C. distincta* foi acessada através de análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA; ANDERSON, 2001) com o software PAST v.3.20 (HAMMER et al. 2001), utilizando-se uma matriz de distância calculada com índice de distância de Bray Curtis.

4.2.2.3 Bioensaios comportamentais

Machos de *C. distincta* foram avaliados quanto ao comportamento reprodutivo seguindo metodologia previamente utilizada (Capítulo 1). Para testar se o procedimento metodológico de retirada e reintrodução do HCs afeta de alguma forma o comportamento pré-copulatório nesta espécie, machos foram pareados com fêmeas inertes intactas (com HCs) *versus* fêmeas inertes que tiveram os HCs retirados e reintroduzidos. Tal procedimento foi realizado afim de investigar se a quantidade escolhida para reintrodução dos HCs afetaria na escolha do macho, além de possibilitar a reutilização dos indivíduos utilizados para obtenção dos extratos, sem necessidade de nova coleta, bem como a manipulação destes entre indivíduos durante os bioensaios. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa

no número de investidas feitas pelo macho em fêmeas com HCs intactos, daquelas que tiveram seu HC retirado e reintroduzido ($X^2 = 2,5$, $gl = 1$, $p = 0,1138$, $n=50$).

Os bioensaios foram realizados à temperatura controlada $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Cada bioensaio constou de um macho pareado com um indivíduo inerte com HCs intacto ou reintroduzido, em placas de petri de vidro (90x15mm). A duração e atos comportamentais observados foram os mesmos descritos no Capítulo 1. Neste experimento, os atos comportamentais “monta” e “eversão de edéago” passam a ser tratados como um novo ato comportamental, chamado “investida” (ver Discussão Capítulo 1). O ato “cópula” foi suprimido das observações. A reintrodução de HCs se deu com a aplicação de 2,5 μL do extrato sobre todo o élitro do indivíduo. Os dados obtidos nos experimento foram comparados com um grupo controle, que consistiu de fêmeas inertes com seus HCs intactos. Cada bioensaio teve 50 repetições e foram realizados na seguinte ordem:

(1) verificar o número de investidas do macho em cada um dos sexos que tiveram os HCs removidos. Machos foram pareados com machos e fêmeas inertes sem HCs, separadamente, resultando em dois bioensaios.

(2) verificar a reação do macho a inversão dos extratos cuticulares entre os sexos de indivíduos coespecíficos. Foi ofertado ao macho uma fêmea com HCs de macho e um macho com HCs de fêmea, constituindo dois bioensaios.

(3) análise da atratividade sexual de fêmeas congênicas mortas. Machos foram entam pareados com fêmeas de *C. paraguayensis* mortas, primeiramente, com os HCs intactos e, posteriormente, sem os HCs. Bioensaios realizados separadamente.

(4) análise do reconhecimento dos HCs de fêmeas coespecíficas. Para tal, foi utilizado o corpo de fêmeas de *C. paraguayensis* como modelo para adição do extrato cuticular da fêmea coespecífica. Assim, fêmeas *C. paraguayensis* com cutícula lavada, receberam em seu élitro a alíquota de 2,5 μL do extrato cuticular de fêmeas de *C. distincta* e foram oferecidas ao macho.

4.2.2.4 Estatística

O número de investidas em cada um dos bioensaios foram analisadas com teste qui-quadrado (X^2 -test) entre si e com o controle. As análises foram realizadas no programa estatístico R (versão 2.1.4).

4.2.3 RESULTADOS

4.2.3.1 Extratos cuticulares – perfil dos hidrocarbonetos de cutícula

Nos extratos cuticulares de *C. distincta*, foram identificados hidrocarbonetos lineares e ramificados, saturados e insaturados, com cadeia de 23 a 31 átomos de carbono, além de um éster: oleato de etila. Houve predomínio de cadeias com número ímpar de carbonos, principalmente entre os alcenos. Não houve diferença significativa entre as composições dos HCs de machos e fêmeas de *C. distincta* (PERMANOVA: $F = 1,902$, $P = 0,1252$). Amostras de *C. paraguayensis* também foram dominadas por alcanos com 23 a 29 átomos de carbono. Contudo, verificou-se também a presença de alcadienos, além de ácidos e ésteres alifáticos. Pentacosano (C25) é o principal composto majoritário encontrado para as duas espécies aqui estudadas, seguido do hexacosano (C26) e x-nonacoseno (C29:1) para *C. distincta* e de heptacosano (C26) e nonacosano (C31) para *C. paraguayensis*.

Tabela 1. Perfil dos hidrocarbonetos cuticulares de *Cyclocephala distincta* e *C. paraguayensis*, obtidos por imersão em hexano. * presente apenas em uma amostra.

IR**	C. distincta.		C. paraguayensis.	
	Fêmeas (n = 5)	Machos (n = 3)	Fêmeas (n = 2)	
Alcanos (parafinas)				
tricosano (C23)	2300	8,63 ± 1,06	7,77 ± 1,10	4,42 ± 0,30
tetracosano (C24)	2400	0,37 ± 0,10	0,32 ± 0,13	0,40 ± 0,19
pentacosano (C25)	2500	19,17 ± 2,59	21,25 ± 0,82	35,72 ± 9,25
hexacosano (C26)	2600	14,87 ± 2,21	17,77 ± 3,50	0,32*
heptacosano (C27)	2700	5,64 ± 1,48	7,46 ± 0,86	23,23 ± 3,73
octacosano (C28)	2800	---	---	0,23*
nonacosano (C29)	2900	---	---	8,54 ± 0,91
hentriacontano (C31)	3100	0,29 ± 0,31	0,48 ± 0,21	---
Alcenos (olefinas) e alcadienos				
(Z)-9-pentacoseno (C25:1)	2477	3,53 ± 1,74	1,86 ± 0,19	---
(Z)-7-pentacoseno (C25:1)	2484	6,64 ± 2,48	6,32 ± 0,10	---
(Z)-9-heptacoseno (C27:1)	2679	4,86 ± 0,95	3,38 ± 0,30	---
(Z)-7-heptacoseno (C27:1)	2686	2,60 ± 1,54	2,63 ± 0,19	---
(Z)-9-nonacoseno (C29:1)	2877	18,16 ± 2,03	15,43 ± 0,62	---
(Z)-9-hentriaconteno (C31:1)	3077	11,57 ± 2,83	12,52 ± 2,85	0,42 ± 0,38
(Z)-7-hentriaconteno (C31:1)	3085	0,38 ± 0,85	---	---
x,y-hentriacontadieno (C31:2)	nd	---	---	0,67 ± 0,74
x,y-tritriacontadieno (C33:2)	nd	---	---	5,76 ± 2,95
a,b-tritriacontadieno (C33:2)	nd	---	---	1,46*
x-tritriaconteno (C33:1)	nd	---	---	2,30 ± 1,76
y-tritriaconteno (C33:1)	nd	---	---	1,16 ± 1,07
x,y-pentatriacontadieno (C35:2)	nd	---	---	2,52*
a,b-pentatriacontadieno (C35:2)	nd	---	---	3,37*
Ácidos e ésteres alifáticos				
ácido hexadecanoico	1961	---	---	4,01 ± 3,78
éster não-identificado 1	1976	---	---	0,15 ± 0,13
etil hexadecanoato	1995	---	---	1,54 ± 0,94
palmitato de isopropila	2025	---	---	0,13 ± 0,08
ácido x-octadecenoico	2143	---	---	4,85 ± 5,54
ácido octadecanoico	2162	---	---	0,16 ± 0,25
oleato de etila	2173	0,46 ± 0,25	0,93 ± 0,54	2,84 ± 2,33
etil octadecanoato	2195	---	---	0,15 ± 0,13
Hidrocarbonetos ramificados				
x-metilheptacosano	2728	1,41 ± 0,57	0,65 ± 0,11	---
x-metilnonacosano	2927	0,38 ± 0,27	0,12 ± 0,08	---

**IR: Índice de Retenção de um componente. Os números expressos nos perfis referem-se a quantidade de tal componente encontrado no extrato cuticular dos indivíduos estudados.

4.2.3.2 Bioensaios comportamentais

A retirada dos HCs dos indivíduos coespecíficos ofertados diminuiu o número de investidas dos machos. Ao comparar os bioensaios com o controle, ambos apresentaram diferença significativa: fêmea x controle ($X^2 = 10,125$, $gl = 1$, $p = 0,001463$) e macho x controle ($X^2 = 5,4444$, $gl = 1$, $p = 0,01963$) (Figura 1). Porém não houve diferença quando comparados entre si, machos e fêmeas receberam quantidades próximas de investidas ($X^2 = 0,88889$, $gl = 1$, $p = 0,3458$).

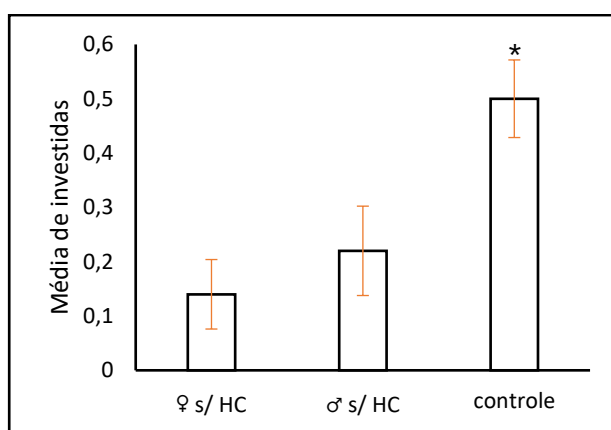


Figura 1. Comportamentos de investida dos machos de *C. distincta*, quanto ao reconhecimento sexual em indivíduos sem HCs, comparados ao controle. Dados apresentados em média e o eixo das barras apontam o erro padrão obtido. *Indicação do tratamento significativo.

Quando os indivíduos coespecíficos ofertados tiveram seus HCs invertidos entre os sexos, os machos investiram em ambos, sem diferenças significativas entre eles ($X^2 = 0,3913$, $gl = 1$, $p = 0,5316$). Na comparação com o grupo controle, as investidas foram significativamente menores com machos com HCs de fêmeas ($X^2 = 6,4286$, $gl = 1$, $p = 0,01123$), mas sem diferença quando tratou-se de fêmeas com HCs de machos ($X^2 = 3,7895$, $gl = 1$, $p = 0,05158$) (Figura 2a).

Quanto ao reconhecimento heteroespecífico, não houve diferença de investida para as fêmeas de *C. paraguayensis* com e sem seus HCs ($X^2 = 3,7692$, $gl = 1$, $p = 0,0522$) (Figura 2b). Contudo, machos realizaram mais investidas sobre fêmeas da mesma espécie do que fêmeas congênicas, com seus respectivos HCs ($X^2 = 6,4286$, $gl = 1$, $p = 0,01123$) ou na ausência deles ($X^2 = 17,286$, $gl = 1$, $p = <0,05$).

Ao se adicionar HCs de fêmeas coespecíficas sobre fêmeas de *C. paraguayensis*, os machos investiram menos do que quando foram ofertadas fêmeas controle ($X^2 = 8,7576$, $gl = 1$, $p = 0,003083$) (Figura 2b).

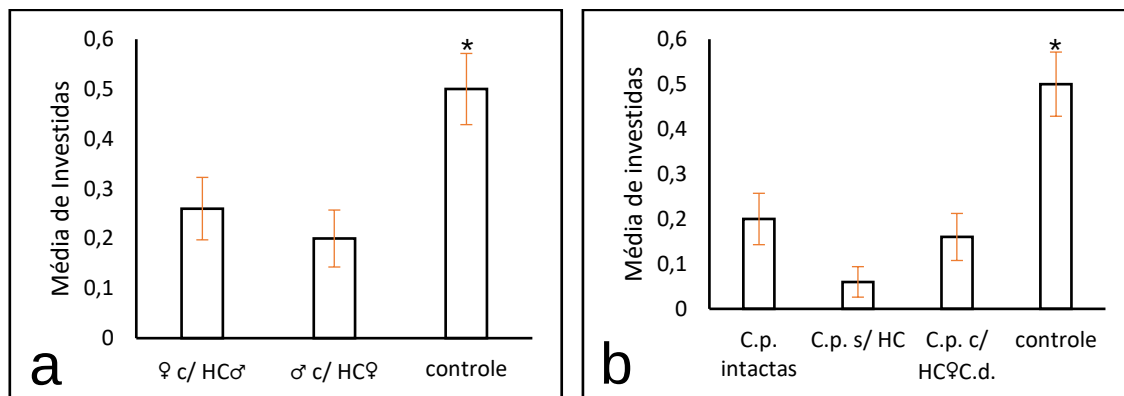


Figura 2. Percentual de investidas de machos de *C. distincta* testados com indivíduos coespecíficos que tiveram seus HCs invertidos (a), no reconhecimento heteroespecífico e quanto ao reconhecimento do HCs coespecífico (b). Ambos os tratamentos são comparados ao controle. C.p.: *Cyclocephala paraguayensis*. C.d.: *C. distincta*. Dados apresentados em média e o eixo das barras apontam o erro padrão obtido. *Indicação do tratamento significativo.

4.2.4 DISCUSSÃO

Os extratos cuticulares não apresentaram diferenças qualitativas entre os sexos para *C. distincta* (Tabela 1). Os hidrocarbonetos saturados e insaturados com cadeia de 23 a 31 átomos de carbono, compostos predominantes em extratos cuticulares de *C. distincta*, também foram registrados em *C. paraguayensis* e encontrados também em duas outras espécies do gênero (SANTOS, 2018).

Com predomínio de alcanos na composição dos HCs, essas espécies possuem compostos compartilhados com *C. celata* Dechambre, 1980 e *C. cearae* Höhne, 1923 (Santos, 2018), compondo o grupo de espécies do gênero *Cyclocephala* que tiveram seus perfis cuticulares identificados. As quatro espécies citadas acima, juntamente com *Eriosceles emarginata* Mannerheim, 1829 (SANTOS, 2018) são os primeiros representantes da Tribo Cyclocephalini a terem seus perfis cuticulares identificados, uma vez que ainda não há dados sobre análise dos HCs em besouros da tribo.

Estudos sobre reconhecimento químico através do uso de HCs em ensaios comportamentais têm demonstrado haver uma relação da resposta com os perfis cuticulares identificados (SMADJA; BUTLIN, 2009; SANO; BANNON; GREENE, 2018). Diferenças qualitativas no perfil dos HCs em outras espécies de besouros tem

mostrado que eles podem desempenhar um papel importante na distinção entre os sexos (STEIGER et al, 2007, 2008; GEISELHARDT; OTTE; HILKER, 2009; XUE et al., 2016).

Para os besouros que realizam o reconhecimento do parceiro a curta distância, a diferença na composição relativa dos compostos cuticulares pode funcionar como determinante principal da investida na cópula (STEIGER et al, 2008; XUE et al., 2016; KEPPNER et al., 2017). Eles também podem atuar conjuntamente com outros critérios de escolha (ORTIZ-DOMÍNGUEZ et al, 2006) ou, ainda, não serem utilizados para tal finalidade (BAILEY; ZUK, 2009; BAILEY et al, 2013). Em *C. distincta* podemos afirmar que o segundo caso se aplica, uma vez que investidas sexuais ocorreram mesmo em indivíduos que tiveram os perfis cuticulares trocados, em maior quantidade do que as registradas na espécie congênica testadas. Mostrando que para a *C. distincta* os HCs são componente do reconhecimento intraespecífico. Diferente do que ocorre em besouros do gênero *Altica*, que não só possuem reconhecimento químico sexual, como também identificam heterospecíficos a partir dos HCs, independentemente do sexo (XUE et al., 2016).

A semelhança entre os perfis cuticulares de machos e fêmeas encontra suporte nos resultados dos bioensaios realizados, onde machos não mostraram-se capazes de discernir entre machos e fêmeas na hora da investida sexual (Fig. 3a). Machos de *C. distincta* conseguem reconhecer os HCs de indivíduos coespecíficos, mas não discriminam o sexo. Embora os HCs sejam utilizados como feromônio de contato em muitas espécies de insetos e sejam a pista fundamentais que elicitam o comportamento de cópula (BLOMQUIST; BAGNÈRES, 2010), para *C. distincta* o macho utiliza também os caracteres morfológicos do outro indivíduo para identificação correta, fazendo-o enquanto realiza a monta.

A monta é o primeiro contato efetivo do macho com outro indivíduo para que possa fazer um reconhecimento tátil e passar as antenas sobre sua superfície. A antena é o órgão sensorial mais utilizado para identificação de pistas químicas através das sensilas olfativas, que em besouros Melolonthidae encontram-se nas lamelas dos últimos antenômeros (LEAL, 1998). É neste momento que o reconhecimento ocorre e o macho decide ou não investir na cópula, evertendo o edeago, o que corrobora com o reconhecimento químico e tátil encontrado por Souza (2013) para a espécie.

As investidas dos machos na espécie congênica provavelmente está associada ao composto majoritário compartilhado, visto que espécies do mesmo gênero podem apresentar compostos de HCs comuns (VANÍCKOVÁ et al., 2014; XUE et al., 2016) e despertar interesse nos machos (BAILEY; FRENCH, 2012). Casos de reconhecimento errôneo são as investidas sexuais interespecíficas registradas por Maklakov e Bonduriansky (2009) e Shimomura et al. (2017), ao trabalharem com reconhecimento sexual de diferentes espécies de besouro do gênero *Callosobruchus*.

A presença dos HCs de fêmeas coespecíficas no corpo de fêmeas de uma espécie diferente, do mesmo gênero, não elicitou o macho tanto quanto o controle. Os resultados apontam para uma necessidade de um reconhecimento morfológico juntamente com o HCs para que ocorra corretamente a identificação sexual, apontando também que os demais compostos cuticulares podem estar envolvidos no reconhecimento intraespecífico da espécie. Quando machos investiram em fêmeas interespecíficas, o corpo inerte juntamente com o maior tamanho não se mostrou adequado para realização da monta, uma vez que ele não conseguiu agarrar-se ao élitro da fêmea, como observado em experimentos anteriores (Capítulo 1).

Com isso, entendemos que os HCs funcionam como um componente do reconhecimento intraespecífico em *C. distincta*, utilizando-os juntamente com a morfologia do par coespecífico, não sendo suficientes sozinhos. *Cyclocephala distincta* também parece reconhecer HCs de outras espécies, uma vez que houve investidas, mas em menor quantidade àquelas no grupo controle. São desconhecidos para a espécie feromônios sexuais voláteis, o que aponta para uma dependência do odor floral da planta hospedeira para o encontro de machos e fêmeas. Assim, os hidrocarbonetos cuticulares de *C. distincta* auxiliam na identificação de coespecíficos, enquanto as diferenças morfológicas provavelmente são responsáveis pelo reconhecimento sexual, que somente ocorre após a monta.

4.2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, Marti J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.32-46, fev. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>.

ADAMS, Robert P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 5 online ed. Texensis Publishing, 2017.

ALBUQUERQUE, Larissa Simões Corrêa de; GROSSI, Paschoal Coelho; IANNUZZI, Luciana. Flight patterns and sex ratio of beetles of the subfamily Dynastinae (Coleoptera, Melolonthidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, [s.l.], v. 60, n. 3, p.248-254, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbe.2016.03.002>.

BAILEY, Nathan W. et al. Tissue-specific transcriptomics in the field cricket *Teleogryllus oceanicus*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 3, n. 2, p. 225-230, 2013.

BAILEY, Nathan W.; FRENCH, Nicholas. Same-sex sexual behaviour and mistaken identity in male field crickets, *Teleogryllus oceanicus*. **Animal behaviour**, v. 84, n. 4, p. 1031-1038, 2012.

BAILEY, Nathan W.; ZUK, Marlene. Same-sex sexual behavior and evolution. **Trends in Ecology & Evolution**, [s.l.], v. 24, n. 8, p.439-446, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2009.03.014>.

BLOMQUIST, Gary J.; BAGNÉRES, A. G. Structure and analysis of insect hydrocarbons. **Insect hydrocarbons: Biology, biochemistry, and chemical ecology**, p. 19-34, 2010.

ENDRÖDI, S. **The Dynastinae of the world**. Series Entomologica. Dordrecht: Dr W. Junk. Publishers, 1985.

GEISELHARDT, Sven; OTTE, Tobias; HILKER, Monika. The role of cuticular hydrocarbons in male mating behavior of the mustard leaf beetle, *Phaedon cochleariae* (F.). **Journal of Chemical Ecology**, [s.l.], v. 35, n. 10, p.1162-1171, out. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-009-9704-7>.

HAMMER, O.; D.A.T. HARPER & P.D. RYAN. PAST: Paleontological Statistic software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4 (1): 1-9. http://palaeoelectronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm [Accessed: 20/06/2018]. 2001.

HOE, Y. C. et al. Flowering mechanisms, pollination strategies and floral scent analyses of syntopically co-flowering *Homalomena* spp. (Araceae) on Borneo. **Plant Biology**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.563-576, 1 fev. 2016. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/plb.12431>.

HOWARD, Ralph W.; BLOMQUIST, Gary J. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. **Annual Review of Entomology**, [s.l.], v. 50, n. 1, p.371-393, jan. 2005. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130359>.

KAMIYA, Aline Cristiane et al. Mating behavior and evidence for male-produced aggregation pheromone in *Cyrtomon luridus* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Insect Behavior**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.55-66, 19 dez. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10905-014-9481-1>.

KEPPNER, Eva M. et al. Beyond cuticular hydrocarbons: Chemically mediated mate recognition in the Subsocial Burying Beetle *Nicrophorus vespilloides*. **Journal of Chemical Ecology**, [s.l.], v. 43, n. 1, p.84-93, 27 dez. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-016-0806-8>.

LEAL, Walter Soares. Chemical ecology of phytophagous scarab beetles. **Annual Review of Entomology**, [s.l.], v. 43, n. 1, p.39-61, jan. 1998. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.39>.

MAIA, Artur Campos Dália et al. 2-Alkyl-3-methoxypyrazines are potent attractants of florivorous scarabs (Melolonthidae, Cyclocephalini) associated with economically exploitable. Neotropical palms (Arecaceae). **Pest Management Science**, [s.l.], p.1-9, 25 mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.4895>.

MAIA, Artur Campos Dália et al. The cowl does not make the monk: scarab beetle pollination of the neotropical aroid *Taccarum ulei* (Araceae). **Biological Journal of the Linnean Society**, [s.l.], v. 108, n. 1, p.22-34, 10 out. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8312.2012.01985.x>.

MAIA, Artur Campos Dália et al. Pollination of *Philodendron acutatum* (Araceae) in the Atlantic Forest of Northeastern Brazil: A single scarab beetle species guarantees High Fruit Set. **International Journal of Plant Sciences**, [s.l.], v. 171, n. 7, p.740-748, set. 2010. University of Chicago Press. <http://dx.doi.org/10.1086/654846>.

MAKLAKOV, Alexei A.; BONDURIANSKY, Russell. Sex differences in survival costs of homosexual and heterosexual interactions: evidence from a fly and a beetle. **Animal Behaviour**, v. 77, n. 6, p. 1375-1379, 2009.

NIST Webbok. **National Institute of Standards and technology**. 2014. <http://www.nist.gov/>.

ORTIZ-DOMINGUEZ, Maribel et al. Epicuticular compounds and sexual recognition in the ball-roller scarab, *Canthon cyanellus cyanellus*. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, [s.l.], v. 119, n. 1, p.23-27, abr. 2006. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1570-7458.2006.00388.x>.

RATCLIFFE, B.C.; CAVE, R.D. The dynastine scarab beetles of Honduras, Nicaragua and El Salvador (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae). **Bulletin of the University of Nebraska State Museum**, v.21, p.1–424, 2006.

RODRÍGUEZ-REBOLLAR, Hilda et al. Evaluación de un cebo feromonal para la captura del picudo del agave (Coleoptera: Curculionidae). **Acta Zoologica Mexicana [online]**, México, v. 28, n. 1, p.73-85. 2012.

SANO, Kazuhiro; BANNON, Nathanael; GREENE, Michael J. Pavement Ant Workers (*Tetramorium caespitum*) Assess Cues Coded in Cuticular Hydrocarbons to Recognize Conspecific and Heterospecific Non-Nestmate Ants. **Journal Of Insect Behavior**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.186-199, 24 fev. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10905-017-9659-4>.

SANTOS, Geanne Karla Novais. Semioquímicos e perfil de hidrocarbonetos cuticulares em espécies de besouros antófilos da tribo Cyclocephalini. **Tese de Doutorado**, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco. 2018.

SCHOOLMEESTERS P. **Scarabs: World Scarabaeidae database** (version Jul 2017). In: Roskov Y., Abucay L., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., De Wever A., Nieukerken E. van, Zarucchi J., Penev L., eds. 2018. Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 26th February 2018. Digital resource

at www.catalogueoflife.org/col. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-8858.

SHIMOMURA, Kenji et al. Identification of cuticular compounds collected from *Callosobruchus rhodesianus* (Pic) eliciting heterospecific mating behavior with male *Callosobruchus maculatus* (F.). **Chemoecology**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.65-73, 28 fev. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00049-017-0231-7>.

SHIMOMURA, Kenji et al. Variation in mate recognition specificities among four *Callosobruchus* seed beetles. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, [s.l.], v. 135, n. 3, p.315-322, jun. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1570-7458.2010.00994.x>.

SMADJA, C; BUTLIN, R K. On the scent of speciation: the chemosensory system and its role in premating isolation. **Heredity**, [s.l.], v. 102, n. 1, p.77-97, 6 ago. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.2008.55>.

SOUZA, T.B. Aspectos biológicos, descrição dos imaturos e comportamento de cópula de *Cyclocephala distincta* Burmeister (Coleoptera: Dynastinae, Cyclocephalini). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil. 2013.

STEIGER, S. et al. The smell of parents: breeding status influences cuticular hydrocarbon pattern in the burying beetle *Nicrophorus vespilloides*. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 274, n. 1622, p.2211-2220, 7 set. 2007. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2007.0656>.

STEIGER, S. et al. The Coolidge effect, individual recognition and selection for distinctive cuticular signatures in a burying beetle. **Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 275, n. 1645, p.1831-1838, 22 ago. 2008. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2008.0375>.

THORNHILL, R. & J. ALCOCK, J.(1983). **The evolution of insect mating systems**. Harvard University Press, Cambridge, 576p.

VANÍČKOVÁ, L. et al. Resolution of three cryptic agricultural pests (*Ceratitis fasciventris*, *C. anonae*, *C. rosa*, Diptera: Tephritidae) using cuticular hydrocarbon profiling. **Bulletin of Entomological Research**, [s.l.], v. 104, n. 05, p.631-638, 4 jun. 2014. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0007485314000406>.

XUE, Huai-jun et al. Contact pheromones of 2 sympatric beetles are modified by the host plant and affect mate choice. **Behavioral Ecology**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.895-902, 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/beheco/arv238>.

5 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos nesse trabalho foi possível entender que o comportamento sexual de *C. distincta* ocorre a partir do reconhecimento químico e anatômico do outro indivíduo, sendo a parte química mediada pelos hidrocarbonetos cuticulares, ocorrendo sempre por parte do macho conforme já apontado por Souza (2013). O ato de monta realizado para ambos os sexos e indivíduos testados mostrou que a discriminação coespecífica e sexual a curta distância não é prontamente eficaz; o macho, contudo, necessita desempenhá-la para que ocorra reconhecimento do parceiro. É com o comportamento de eversão de edeago que machos de *C. distincta* demonstram escolha efetiva para a cópula, e este ocorre em com maior frequência em fêmeas coespecíficas íntegras, seguido por fêmeas mortas com perfil de hidrocarbonetos cuticular intacto, o que demonstra o papel desses compostos como feromônios sexuais de contato.

Cyclocephala distincta, uma espécie de besouros antófilos, dependente dos voláteis orgânicos florais emitidos pelas suas plantas hospedeiras para assegurar encontros coespecíficos, utilizando os HCs e a morfologia no reconhecimento químico e tátil do possível parceiro sexual. Estudos eletrofisiológicos com a espécie podem ajudar a entender melhor qual composto funciona como resposta no reconhecimento intraespecífico e os motivos que levaram as investidas interespecíficas.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, Larissa Simões Corrêa de; GROSSI, Paschoal Coelho; IANNUZZI, Luciana. Flight patterns and sex ratio of beetles of the subfamily Dynastinae (Coleoptera, Melolonthidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, [s.l.], v. 60, n. 3, p.248-254, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbe.2016.03.002>.
- ALCOCK, John. **Comportamento animal: uma abordagem evolutiva**. Coordenação da tradução: Eduardo Bessa Pereira da Silva; Revisão técnica: Regina Helena Ferraz Macedo. - 9. ed. - Porto Alegre: Artmed. 2011.
- BARBOSA, Carlos Aparecido; RODRIGUES, Sérgio Roberto. Comportamento de cópula em *Cyclocephala verticalis* Burmeister (Coleoptera: Scarabaeidae). **Entomobrasil**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.158-162, 15 dez. 2016. Entomo Brasilis. <http://dx.doi.org/10.12741/ebrasilis.v9i3.581>.
- BAILEY, Nathan W.; ZUK, Marlene. Same-sex sexual behavior and evolution. **Trends In Ecology & Evolution**, [s.l.], v. 24, n. 8, p.439-446, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2009.03.014>.
- BENELLI, Giovanni; MEREGALLI, Massimo; CANALE, Angelo. Field observations on the mating behavior of *Aclees* sp. cf. *foveatus* Voss (Coleoptera: Curculionidae), an Exotic Pest Noxious to Fig Orchards. **Journal of Insect Behavior**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.419-427, 1 fev. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10905-014-9437-5>.
- BERNHARDT, Peter. Convergent evolution and adaptive radiation of beetle-pollinated angiosperms. **Plant Systematics and Evolution**, [s.l.], v. 222, n. 1-4, p.293-320, 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00984108>.
- BLOMQUIST, Gary J. Structure and analysis of insect hydrocarbons. **Insect hydrocarbons: Biology, biochemistry, and chemical ecology**, p. 19-34, 2010.
- BLOMQUIST, Gary J.; BAGNÈRES, Anne-Geneviève (Ed.). **Insect hydrocarbons: biology, biochemistry, and chemical ecology**. Cambridge University Press, 2010.
- BOACHON, Benoît et al. CYP76C1 (Cytochrome P450) mediated linalool metabolism and the formation of volatile and soluble linalool oxides in *Arabidopsis* flowers: A strategy for defense against floral antagonists. **The Plant Cell**, [s.l.], p.2972-2990, 16

out. 2015. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.15.00399>.

BURDFIELD-STEEL, Emily R.; SHUKER, David M. Mate-guarding in a promiscuous insect: species discrimination influences context-dependent behaviour. **Evolutionary Ecology**, [s.l.], v. 28, n. 6, p.1031-1042, 18 out. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10682-014-9726-7>.

CAVALCANTE, Tadeu Robson Melo et al. Polinização e formação de frutos em *Araticum*. **Bragantia**, [s.l.], v. 68, n. 1, p.13-21, 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0006-87052009000100002>.

CHERMAN, Mariana Alejandra; MORON, Miguel Ángel. Validación de la familia Melolonthidae Leach, 1819 (Coleoptera: Scarabaeoidea). **Acta Zool. Mex** [online]. 2014, vol.30, n.1, pp.201-220. ISSN 2448-8445.

CHUNG, Henry; CARROLL, Sean B. Wax, sex and the origin of species: Dual roles of insect cuticular hydrocarbons in adaptation and mating. **Bioessays**, [s.l.], v. 37, n. 7, p.822-830, 19 maio 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201500014>.

COLARES, Felipe et al. Polyandry and male mating history affect the reproductive performance of *Eriopis conexa* (Coleoptera: Coccinellidae). **Annals of the Entomological Society Of America**, [s.l.], v. 108, n. 5, p.736-742, 6 jul. 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/aesa/sav056>.

DAPPORTO, Leonardo; PALAGI, Elisabetta; TURILLAZZI, Stefano. Cuticular hydrocarbons of *Polistes dominulus* as a biogeographic tool: A study of populations from the Tuscan archipelago and surrounding areas. **Journal of Chemical Ecology**, [s.l.], v. 30, n. 11, p.2139-2151, nov. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/b:joec.0000048779.47821.38>.

DIERINGER, Gregg et al. Endothermy and floral utilization of *Cyclocephala caelestis* (Coleoptera: Scarabaeoidea; Melolonthidae): a cloud forest endemic beetle. **Acta Zoológica Mexicana**, México, n. 73, p.145-153, 1998. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.032763>.

DUCHINI, Paulo Gonçalves et al. White grubs (*Cyclocephala flavipennis*) damaging perennial winter pastures in the South Region of Brazil. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v.47, n.5, e20160662, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160662>.

ENDRÖDI, Sebo. **The Dynastinae of the world**. Springer, 1985. ISBN 906193138X.

ERB, Matthias. Plant defenses against herbivory: Closing the fitness gap. **Trends in Plant Science**, [s.l.], v. 23, n. 3, p.187-194, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2017.11.005>.

FALCÓN, Tiago et al. Exoskeleton formation in *Apis mellifera*: Cuticular hydrocarbons profiles and expression of desaturase and elongase genes during pupal and adult development. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s.l.], v. 50, p.68-81, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.04.006>.

FAN, Yongliang et al. Hydrocarbon synthesis by enzymatically dissociated oenocytes of the abdominal integument of the German Cockroach, *Blattella germanica*. **Naturwissenschaften**, [s.l.], v. 90, n. 3, p.121-126, 2003. <http://dx.doi.org/10.1007/s00114-003-0402-y>.

FINCK, Jonas et al. Divergence of cuticular hydrocarbons in two sympatric grasshopper species and the evolution of fatty acid synthases and elongases across insects. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 6: 33695, 28 set. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/srep33695>.

GEISELHARDT, Sven; OTTE, Tobias; HILKER, Monika. The role of cuticular hydrocarbons in male mating behavior of the mustard leaf beetle, *Phaedon cochleariae* (F.). **Journal of Chemical Ecology**, [s.l.], v. 35, n. 10, p.1162-1171, out. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-009-9704-7>.

GIBBS, Allen G. Water-proofing properties of cuticular lipids. **American Zoologist**, [s.l.], v. 98, n. 3, p.471-482, 1998.

GINZEL, Matthew D.; HANKS, Lawrence M. Role of host plant volatiles in mate location for three species of longhorned beetles. **Journal of Chemical Ecology**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.213-217, jan. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-005-6735-6>.

GOTTSBERGER, Gerhard; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, Ilse. Olfactory and visual attraction of *Erioscelis emarginata* (Cyclocephalini, Dynastinae) to the inflorescences of *Philodendron selloum* (Araceae). **Biotropica**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.23-28, mar. 1991. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/2388684>.

GWYNNE, Darryl T. Sexual conflict over nuptial gifts in insects. **Annual Review of Entomology**, [s.l.], v. 53, n. 1, p.83-101, jan. 2008. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.53.103106.093423>.

HOE, Yin Chen et al. Flowering mechanisms, pollination strategies and floral scent analyses of syntopically co-flowering *Homalomena* spp. (Araceae) on Borneo. **Plant Biology**, [s.l.], v. 18, n. 4, p.563-576, 1 fev. 2016. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/plb.12431>.

HOWARD, Ralph W.; BLOMQUIST, Gary J. Ecological, behavioral, and biochemical aspects of insect hydrocarbons. **Annual Review of Entomology**, [s.l.], v. 50, n. 1, p.371-393, jan. 2005. Annual Reviews.

KAMIYA, Aline Cristiane et al. Mating behavior and evidence for male-produced aggregation pheromone in *Cyrtomon luridus* (Boheman) (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Insect Behavior**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.55-66, 19 dez. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10905-014-9481-1>.

KEPPNER, Eva M. et al. Beyond cuticular hydrocarbons: Chemically mediated mate recognition in the subsocial burying beetle *Nicrophorus vespilloides*. **Journal of Chemical Ecology**, [s.l.], v. 43, n. 1, p.84-93, 27 dez. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-016-0806-8>.

KNUDSEN, Jette T. et al. Diversity and distribution of floral scent. **The Botanical Review**, [s.l.], v. 72, n. 1, p.1-120, mar. 2006. Springer Nature. [http://dx.doi.org/10.1663/0006-8101\(2006\)72\[1:dadofs\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1663/0006-8101(2006)72[1:dadofs]2.0.co;2).

LANE, Sarah M. et al. Rival male chemical cues evoke changes in male pre- and post-copulatory investment in a flour beetle. **Behavioral Ecology**, [s.l.], v. 26, n. 4, p.1021-1029, 2015. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/beheco/arv047>.

LEAL, Walter Soares. Chemical ecology of phytophagous scarab beetles. **Annual Review of Entomology**, [s.l.], v. 43, n. 1, p.39-61, jan. 1998. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.39>.

LEONHARDT, Sara Diana et al. Ecology and evolution of communication in social insects. **Cell**, [s.l.], v. 164, n. 6, p.1277-1287, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.035>.

LUÇARDO, Milena; OLIVEIRA, Charles Martins de; FRIZZAS, Marina Regina. Scarabaeoidea (Insecta: Coleoptera) no Cerrado brasileiro. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 44, n. 4, p.652-659, abr. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782014000400013>.

MAIA, Artur Campos Dália et al. 2-Alkyl-3-methoxypyrazines are potent attractants of florivorous scarabs (Melolonthidae, Cyclocephalini) associated with economically exploitable Neotropical palms (Arecaceae). **Pest Management Science**, [s.l.], p.1-9, 25 mar. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.4895>.

MAIA, Artur Campos Dália et al. The cowl does not make the monk: scarab beetle pollination of the Neotropical aroid *Taccarum ulei* (Araceae). **Biological Journal of The Linnean Society**, [s.l.], v. 108, n. 1, p.22-34, 10 out. 2012. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8312.2012.01985.x>.

MAIA, Artur Campos Dália et al. Pollination of *Philodendron acutatum* (Araceae) in the Atlantic Forest of Northeastern Brazil: A Single scarab beetle species guarantees high fruit set. **International Journal of Plant Sciences**, [s.l.], v. 171, n. 7, p.740-748, set. 2010. University of Chicago Press. <http://dx.doi.org/10.1086/654846>.

MENZEL, Florian; SCHMITT, Thomas; BLAIMER, Bonnie B. The evolution of a complex trait: cuticular hydrocarbons in ants evolve independent from phylogenetic constraints. **Journal of Evolutionary Biology**, [s.l.], v. 30, n. 7, p.1372-1385, 10 jun. 2017. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/jeb.13115>.

MOORE, Matthew R.; JAMESON, Mary L. Floral Associations of Cyclocephaline Scarab Beetles. **Journal of Insect Science**, [s.l.], v. 13, n. 100, p.1-43, out. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1673/031.013.10001>.

MOORE, Patricia J. Reproductive physiology and behavior. **The evolution of Insect Mating Systems**. p 103-120. 2014.

OLIVEIRA, Charles Martins de; MORÓN, Miguel Angel; FRIZZAS, Marina Regina. *Aegopsis bolboceridus* (Coleoptera: Melolonthidae): an important pest on vegetables and corn in Central Brazil. **Florida Entomologist**, [s.l.], v. 91, n. 2, p.324-327, jun. 2008. Florida Entomological Society. [http://dx.doi.org/10.1653/0015-4040\(2008\)91\[324:abcmaj\]2.0.co;2](http://dx.doi.org/10.1653/0015-4040(2008)91[324:abcmaj]2.0.co;2).

OLIVEIRA, Harley Nonato de; ÁVILA, Crébio José. Ocorrência de *Cyclocephala forsteri* em *Acronomia aculeata*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, [s.l.], v. 41, n. 2, p.293-295, 6 abr. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.5216/pat.v41i2.8769>.

OTTE, Tobias; HILKER, Monika; GEISELHARDT, Sven. Phenotypic plasticity of cuticular hydrocarbon profiles in insects. **Journal of Chemical Ecology**, [s.l.], v. 44, n. 3, p.235-247, 22 fev. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-018-0934-4>.

PASK, Gregory M. et al. Specialized odorant receptors in social insects that detect cuticular hydrocarbon cues and candidate pheromones. **Nature Communications**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.1-11, 17 ago. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-00099-1>.

PELLEGRINO, Ana Cristina et al. Weather forecasting by insects: Modified sexual behaviour in response to atmospheric pressure changes. **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 10, e75004, 2 out. 2013. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0075004>.

PEREIRA, Juliana et al. *Philodendron adamantinum* (Araceae) lures its single cyclocephaline scarab pollinator with specific dominant floral scent volatiles. **Biological Journal of the Linnean Society**, [s.l.], v. 111, n. 3, p.679-691, 12 fev. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/bij.12232>.

PICHERSKY, Eran; GERSHENZON, Jonathan. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. **Current opinion in Plant Biology**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.237-243, jun. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1369-5266\(02\)00251-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1369-5266(02)00251-0).

RATCLIFFE, Brett C.; CAVE, Ronald D. **The Dynastine Scarab beetles of Honduras, Nicaragua and El Salvador (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae)**. Bulletin of the University of Nebraska State Museum, v.21, 424p. 2006.

RATCLIFFE, Brett C.; CAVE, Ronald D.; CANO, Enio B. **The dynastine scarab beetles of Mexico, Guatemala, and Belize (Coleoptera: Scarabaeidae: Dynastinae)**. University of Nebraska State Museum, 2013.

REFSNIDER, Jeanine M.; JANZEN, Fredric J. Putting eggs in one basket: Ecological and evolutionary hypotheses for variation in oviposition-site choice. **Annual Review of Ecology, Evolution, And Systematics**, [s.l.], v. 41, n. 1, p.39-57, dez. 2010. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102209-144712>.

RICKLEFS, Robert E. A. **Economia da Natureza**. 6. ed. Editora Guanabara Koogan. 2010.

RODRIGUES, Sérgio Roberto et al. Morphology of immature stages and mating behavior in *Liogenys fusca* (Blanchard) (Coleoptera, Melolonthidae, Melolonthinae). **Revista Brasileira de Entomologia**, [s.l.], v. 60, n. 4, p.284-289, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbe.2016.06.005>.

RODRIGUES, Sérgio Roberto et al. Ocorrência de larvas de Scarabaeidae fitófagos (Insecta: Coleoptera) em diferentes sistemas de sucessão de culturas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiania/go, v. 41, n. 1, p.87-93, jan/mar 2011.

RODRIGUES, Sérgio Roberto; GOMES, Elias Soares; BENTO, José Maurício Simões. Sexual dimorphism and mating behavior in *Anomala testaceipennis*. **Journal of Insect Science**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.1-5, 1 jan. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jisesa/ieu072>.

ROUAULT, Jacques-deric et al. Relations between cuticular hydrocarbon (HC) polymorphism, resistance against desiccation and breeding temperature: A model for HC evolution in *D. melanogaster* and *D. Simulans*. **Genetica**, [s.l.], v. 120, n. 1-3, p.195-212, mar. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/b:gene.0000017641.75820.49>.

SANTOS, Geanne Karla Novais. Semioquímicos e perfil de hidrocarbonetos cuticulares em espécies de besouros antófilos da tribo Cyclocephalini. **Tese de Doutorado**, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco. 2018.

SCHOOLMEESTERS P. **Scarabs: World Scarabaeidae Database** (version Jul 2017). In: Roskov Y., Abucay L., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., De Wever A., Nieukerken E. van, Zarucchi J., Penev L., eds. (2018). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 26th February 2018. Digital

resource at www.catalogueoflife.org/col. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-8858.

SEYMOUR, Roger S.; WHITE, Craig R.; GIBERNAU, Marc. Endothermy of dynastine scarab beetles (*Cyclocephala colasi*) associated with pollination biology of a thermogenic arum lily (*Philodendron solimoesense*). **Journal of Experimental Biology**, [s.l.], v. 212, n. 18, p.2960-2968, 28 ago. 2009. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.032763>.

SHIMOMURA, Kenji et al. Identification of cuticular compounds collected from *Callosobruchus rhodesianus* (Pic) eliciting heterospecific mating behavior with male *Callosobruchus maculatus* (F.). **Chemoecology**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.65-73, 28 fev. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00049-017-0231-7>.

SILK, Peter J. et al. Unsaturated cuticular hydrocarbons enhance responses to sex pheromone in spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. **Journal of Chemical Ecology**, [s.l.], v. 43, n. 8, p.753-762, ago. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-017-0871-7>.

SMADJA, Carole; BUTLIN, Roger K. On the scent of speciation: the chemosensory system and its role in premating isolation. **Heredity**, [s.l.], v. 102, n. 1, p.77-97, 6 ago. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.2008.55>.

SOUZA, Thamyrys Barbosa. Aspectos biológicos, descrição dos imaturos e comportamento de cópula de *Cyclocephala distincta* Burmeister (Coleoptera: Dynastinae, Cyclocephalini). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil. 2013.

SOUZA, Thamyrys B. et al. Biology and management of the masked chafer *Cyclocephala distincta* Burmeister (Melolonthidae, Dynastinae, Cyclocephalini). **Revista Brasileira de Entomologia**, [s.l.], v. 59, n. 1, p.37-42, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbe.2015.02.004>.

SOUZA, Thamyrys B. de et al. The life of *Cyclocephala celata* Dechambre, 1980 (Coleoptera: Scarabaeidae). **Journal of Natural History**, [s.l.], v. 48, n. 5-6, p.275-283, 18 jul. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00222933.2013.791886>.

SPIEGEL, Carolina N. et al. The *Lutzomyia longipalpis* complex: a brief natural history of aggregation-sex pheromone communication. **Parasites & Vectors**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-15, 14 nov. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1866-x>.

STEIGER, Sandra; SCHMITT, Thomas; SCHAEFER, H. Martin. The origin and dynamic evolution of chemical information transfer. **Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 278, n. 1708, p.970-979, 22 dez. 2010. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2010.2285>.

SYMONDS, Matthew R. E.; ELGAR, Mark A. The mode of pheromone evolution: evidence from bark beetles. **Proceedings of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 271, n. 1541, p.839-846, 22 abr. 2004. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2003.2647>.

THOMAZINI, Marcílio José. A comunicação química entre os insetos: obtenção e utilização de feromônios no manejo de pragas. **Embrapa Florestas - livro técnico-científico (ALICE)**. 2009.

THORNHILL, Randy; J. ALCOCK, John. **The evolution of insect mating systems**. Harvard University Press, Cambridge, 576p. 1983.

TURLINGS, Ted C.J.; ERB, Matthias. Tritrophic interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: mechanisms, ecological relevance, and application potential. **Annual Review of Entomology**, [s.l.], v. 63, n. 1, p.433-452, 7 jan. 2018. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043507>.

ULLAH, Mohammad Shaef et al. Copulation duration, sperm transfer and reproduction of the two closely related phytoseiid mites, *Neoseiulus womersleyi* and *Neoseiulus longispinosus* (Acari: Phytoseiidae). **Experimental and Applied Acarology**, [s.l.], v. 71, n. 1, p.47-61, 9 dez. 2017. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-016-0101-y>.

VALADARES, Lohan; NASCIMENTO, Daniela; NASCIMENTO, Fabio. Foliar substrate affects cuticular hydrocarbon profiles and intraspecific aggression in the leafcutter ant *Atta sexdens*. **Insects**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.141-151, 12 fev. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/insects6010141>.

VILLALTA, Irene et al. Origin and distribution of desert ants across the Gibraltar Straits. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [s.l.], v. 118, p.122-134, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2017.09.026>.

VUTS, József et al. Semiochemistry of the Scarabaeoidea. **Journal of Chemical Ecology**, [s.l.], v. 40, n. 2, p.190-210, 29 jan. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-014-0377-5>.

WYATT, Tristram D. **Pheromones and Animal Behavior: Chemical Signals and Signatures**. Cambridge: Cambridge University Press, 2014. 406 p.

XUE, Huai-jun et al. Contact pheromones of 2 sympatric beetles are modified by the host plant and affect mate choice. **Behavioral Ecology**, [s.l.], v. 27, n. 3, p.895-902, 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/beheco/arv238>.

ZIEGLER, Anna B.; BERTHELOT-GROSJEAN, Martine; GROSJEAN, Yael. The smell of love in *Drosophila*. **Frontiers in Physiology**, [s.l.], v. 4, p.1-5, 2013. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2013.00072>.