



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

ANDRÉA KARLA LEMOS DA SILVA SENA

**PERFIL NUTRICIONAL E FUNÇÃO REPRODUTIVA DO ESPERMATÓFORO EM
CRYPTOLAEMUS MONTROUZIERI (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)**

RECIFE
2025

ANDRÉA KARLA LEMOS DA SILVA SENA

**PERFIL NUTRICIONAL E FUNÇÃO REPRODUTIVA DO ESPERMATÓFORO EM
CRYPTOLAEMUS MONTROUZIERI (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal. Área de concentração: Biologia Animal.

Orientador: Dr. Wendel J. Teles Pontes
Coorientador: Franklin Magliano da Cunha

RECIFE
2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Sena, Andréa Karla Lemos da Silva.

Perfil nutricional e função reprodutiva do espermatóforo em *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae) / Andréa Karla Lemos da Silva Sena. - Recife, 2025.

45 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, 2025.

Orientação: Wendel J. Teles Pontes.

Coorientação: Franklin Magliano da Cunha.

Inclui referências e apêndice.

1. Joanelha predadora; 2. Comportamento sexual; 3. Recursos reprodutivos. I. Pontes, Wendel J. Teles. II. Cunha, Franklin Magliano da. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

ANDRÉA KARLA LEMOS DA SILVA SENA

**PERFIL NUTRICIONAL E FUNÇÃO REPRODUTIVA DO ESPERMATÓFORO
EM *CRYPTOLAEMUS MONTROUZIERI* (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal. Área de concentração: Biologia Animal.

Aprovado em: 28 /01/ 2025.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **WENDEL JOSE TELES PONTES**
Data: 04/02/2025 12:37:57-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Wendel J. Teles Pontes (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Documento assinado digitalmente
 **PEDRO IVO SIMÕES**
Data: 04/02/2025 08:09:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Pedro Ivo Simões (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Documento assinado digitalmente
 **MAURICIO SILVA DE LIMA**
Data: 04/02/2025 13:18:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Mauricio Silva Lima (Examinador Externo)
Universidade Federal de Alagoas - UFAL

AGRADECIMENTOS

Agradecer é expressar gratidão ou reconhecimento por algo recebido, por uma ação realizada ou por um benefício obtido. expressão usada para demonstrar apreço por uma gentileza, favor, presente ou qualquer ato que desperte um sentimento de gratidão. E eu sou eternamente grata a Deus por colocar em meu caminho pessoas maravilhosas nessa jornada que contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

Gostaria de começar agradecendo a minha família, que sempre me apoiou em tudo. Vocês sempre foram a minha maior motivação para não desistir. Amo muito cada um de vocês.

As melhores, Denielle Tomaz e Taiana Moura, muito obrigada por todas as sessões de terapia, por todo ombro amigo sempre disponíveis para me ouvir e por todos os nossos treinos e risadas.

Ao meu orientador por toda parceria e amizade, pelo voto de confiança e por comprar minhas loucuras científicas. Aos meus parceiros e amigos do LEA, sou eternamente grata a cada um por todo apoio e por todos os momentos que tivemos ao longo desses anos.

Ao laboratório de fisiologia vegetal, em especial ao Dr. Marciel Oliveira e aos alunos Gabriel Silva, Wanessa Carvalho, Mariana Santos e Marcela Albuquerque que me receberam e me ajudaram, vocês foram essenciais neste trabalho, sou muito grata por tudo.

Aos meus amigos que a vida acadêmica me deu, Tainá Santos, Carla Lima e Gabriel Faienstein, por mais que tenhamos uma vida corrida sempre bom saber que posso contar com vocês. Tenho aprendido muito com cada um e sei que vou levar esses ensinamentos para vida toda.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Animal (PPGBA), ao coordenador Pedro Numes por sempre estar disponível para nos ajudar.

agradeço aos professores do PPGBA que de alguma forma também contribuíram para este trabalho, e ao secretário da pós, Manuel Guimarães, sempre muito eficiente e rápido em resolver tudo que precisamos.

Por fim, agradeço aos membros da banca por aceitarem em contribuir para a melhoria desta dissertação.

“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso.”

- John Ruskin

RESUMO

Cryptolaemus montrouzieri, comumente conhecido como joaninha, é uma espécie de besouro cujos machos produzem ejaculados nutritivos, representando uma contribuição significativa dos machos para a aptidão reprodutiva das fêmeas. Apesar dessa relevância para sobrevivência dos insetos, poucos estudos investigam o conteúdo nutritivo transferido pelos machos e o seu papel na fecundidade e fertilidade das fêmeas. Em espécies com múltiplas cópulas, os machos produzem ejaculados cuja proporção de substâncias alocadas varia de acordo com a dieta adulta. Diante do exposto, avaliamos os nutrientes presentes nos espermatozoides de *C. montrouzieri* sob diferentes exposições de dieta. Foram analisados macronutrientes que incluem proteínas, lipídios, açúcares e glicogênio, por meio de métodos colorimétricos. Desta forma, comparamos as mudanças quantitativas nesses macronutrientes em machos alimentados com cochonilhas *Planococcus citri ad libitum* (grupo controle), em condições de restrição alimentar de cochonilhas *P. citri* e com uma alimentação não presa, a base de mel. O perfil de macronutrientes do grupo exposto a dietas controle com *P. citri ad libitum* é composta de espermatozoides com aproximadamente 49,62 µg/ml de lipídios, 5,18 µg/ml de glicogênio, 3,25 µg/ml de açúcares e 0,27 µg/ml de proteínas. Quando comparamos os macronutrientes dos espermatozoides produzidos por machos sob restrição alimentar ou alimentados com mel, não foi encontrada diferença significativa. Além disso, a fecundidade não foi afetada, mas houve uma redução significativa na fertilidade das fêmeas que acasalaram com machos alimentados com mel com uma média de 56% de eclosão, sendo o controle 65% e a restrição 74%.

Palavras-chave: comportamento sexual, joaninha predadora, recursos reprodutivos, proteínas

ABSTRACT

Cryptolaemus montrouzieri, commonly known as the mealybug destroyer, is a beetle species in which males produce nutrient-rich ejaculates, contributing significantly to female reproductive fitness. Despite the importance of these ejaculates for insect survival, few studies have investigated their nutritional composition and role in female fecundity and fertility. In polyandrous species, males allocate varying proportions of ejaculate components depending on adult diet. To address this gap, we analyzed the nutrient composition of *C. montrouzieri* spermatophores under different dietary conditions. Using colorimetric methods, we quantified macronutrients, including proteins, lipids, sugars, and glycogen. We then compared macronutrient allocation in males fed *Planococcus citri* mealybugs *ad libitum* (control), those subjected to dietary restriction of *P. citri*, and those provided a non-prey diet based on honey. Spermatophores from the control group, *P. citri ad libitum*, contained approximately 49.62 µg/ml of lipids, 5.18 µg/ml of glycogen, 3.25 µg/ml of sugars, and 0.27 µg/ml of proteins. No significant differences were observed in spermatophore macronutrient composition between males under dietary restriction and those fed honey. Additionally, while fecundity remained unaffected, female fertility was significantly reduced when mating with honey-fed males, with an average hatching rate of 56%, compared to 65% in the control and 74% under dietary restriction.

Keywords: sexual behavior, predatory ladybird, reproductive resources, proteins

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Um modelo representativo dos modos de transferência, estrutura e função do fluido seminal em insetos.....	18
Figura 2: Ciclo biológico e aparelho reprodutor de <i>C. montrozieri</i>	20
Figura 3: Metodologia Bradford (1976) para análise de proteínas.....	20
Figura 4: Método de extração para análise de Lipídios, Glicogênio e Açúcares.	20
Figura 5: Metodologia da análise bioquímica de Lipídios (B), Glicogênio(C) e Açúcares(A).....	21
Figura 6: Níveis de proteínas (A), lipídios (B), glicogênio (C) e açucares (D) em espermatóforos de <i>C. montrouzieri</i> em diferentes regimes alimentares.	23
Figura 7: Fecundidade (A) e fertilidade (B) de fêmeas de <i>C. montrouzieri</i> copuladas com machos submetidos a diferentes regimes alimentares.	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Presentes nupciais	13
2.2 Composição do espermatozóide e principais funções do fluido seminal	15
2.2.1 Fatores que afetam a produção dos espermatozóides.....	17
2.3 Biologia Reprodutiva de <i>Cryptolaemus montrouzieri</i> Mulsant, 1853.....	18
REFERÊNCIAS	10
3. OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo geral.....	15
3.2 Objetivos específicos	15
4. A COMPOSIÇÃO DE MACRONUTRIENTES DOS ESPERMATÓZÓIDES DE CRYPTOLAEMUS MONTROUZIERI VARIA DE ACORDO COM A ALIMENTAÇÃO DOS MACHOS?	16
4.1 INTRODUÇÃO	16
4.2 METODOLOGIA.....	18
4.2.1 Dieta dos adultos	18
4.2.2 Obtenção dos Espermatozóides	18
4.2.3 Análise Bioquímica dos Espermatozóides.....	19
4.2.3.1 Proteínas Totais.....	19
4.2.3.2 Lipídios, Açúcares e Glicogênio	20
4.2.4 Fecundidade e Fertilidade	21
4.2.5 Análise estatística	22
4.3 RESULTADOS.....	22
4.4 DISCUSSÃO	25
4.5 CONCLUSÃO.....	28
4.6 REFERÊNCIAS	29
APÊNDICE A – CURVA PADRÃO DAS ANÁLISES BIOQUÍMICAS	32

1. INTRODUÇÃO GERAL

A família Coccinellidae pertence a ordem Coleoptera e são comumente conhecidos como joaninhas (Omkar & Pervez, 2016). A família inclui aproximadamente 6.000 espécies descritas, alocadas em cerca de 360 gêneros e 42 tribos (Hodek & Honek, 2012). Os coccinelídeos são holometábolos, passando pelas etapas de ovo, larva, pupa e adulto. Quanto a alimentação, as joaninhas podem ser classificadas como especialistas, quando se alimentam de uma ou poucas presas, e generalistas, adaptando-se aos hábitos alimentares e a disponibilidade de presas do ambiente (Omkar & Pervez, 2016). Nesse sentido, a maioria das espécies de joaninhas são predadoras, e têm despertado interesse devido ao seu potencial para o controle biológico (Hodek et al., 2012; Pervez et al., 2020), incluindo estudos sobre modelos de interações ecológicas em razão das mudanças climáticas (Skirvin et al., 1997; Samways et al., 1999; Sloggett, 2021).

As joaninhas atingem a maturidade sexual logo após a emergência do adulto, porém em algumas espécies há diferenças no tempo de maturação entre machos e fêmeas (Yadav & Pervez, 2022). A maioria das joaninhas são protândricas, ou seja, os machos se tornam sexualmente ativos mais cedo que as fêmeas (Omkar & Pervez, 2005). Para as fêmeas, a maturidade sexual está relacionada ao desenvolvimento dos ovários, sendo a alimentação um importante modulador desse processo (Hodek et al. 2012). Para os machos, a maturidade sexual está diretamente relacionada ao sistema hormonal, cujos testículos amadurecem durante a fase de pupa, proporcionando aptidão ao acasalamento logo após a sua emergência (Hodek & Ceryngier, 2000).

O mecanismo de transferência de esperma desses insetos pode ser de forma direta ou indireta, através de espermatóforo (Omkar et al., 2006). Nesse sentido, acredita-se que os espermatóforos possam ser ofertados como presentes nupciais, já que a maioria das fêmeas após a transferência dos espermatozoides expelem os espermatóforos e se alimentam dele (Perry & Rowe, 2010), ou podem ser também absorvidos através do trato reprodutivo das fêmeas e contribuir para uma maior produção de ovos (Katakura et al., 1994). Foi verificado joaninhas da espécie *Adalia bipunctata* conseguem aumentar a sua produção de ovos quando consomem os espermatóforos transferidos pelos machos (Perry & Rowe, 2008). Para isso, as fêmeas costumam realizar múltiplas cópulas, beneficiando-se do ejaculado de vários parceiros (Pervez e Maurice, 2011; Bayoumy & Michaud, 2014). Por essas razões, o acasalamento e a transferência de espermatóforos podem implicar em custos significativos, podendo inclusive comprometer a longevidade desses insetos (Mishra & Omkar, 2006).

C. montrouzieri é uma espécie de joaninha nativa da Austrália, mais apresenta uma distribuição em mais de 64 países da América do Norte e do Sul, Caribe, África, Ásia, Oceania e Europa (Kairo, 2014). Essa espécie predadora é promissora no controle de pragas (Solangi et al., 2012), pois suas larvas e adultos são capazes de reduzir significativamente todos os estágios de cochonilhas (Hemiptera: Coccidae) em campo. No entanto, foram registradas outras 35 espécies que sob escassez de presas complementaram sua dieta (Kairo, 2022) sendo também capaz de suplementar sua alimentação com pólen ou néctar, cuja composição apresenta baixo teor nutritivo para a espécie podendo impactar o desempenho de suas funções biológicas (Giorgi et al., 2009). Consequentemente, fêmeas de *C. montrouzieri* submetidas a uma alimentação exclusiva de pólen, podem inibir o desenvolvimento dos ovários e comprometer a oviposição por não desenvolverem seus ovários (Marques et al., 2015), assim como ocorre em outras espécies de joaninhas predadoras quando consomem apenas alimentação alternativa (Lima et al., 2020).

Durante o desenvolvimento dos órgãos reprodutores, os machos de *C. montrouzieri* produzem grandes espermátóforos que exigem um tempo consideravelmente longo para serem produzidos (De Lima et al., 2022), e são absorvidos diretamente no trato reprodutivo das fêmeas após o acasalamento (Kaufmann, 1996). Desse modo, a dieta é um dos fatores mais importantes na qualidade do espermátóforo e na viabilidade dos seus espermatozoides, pois os nutrientes absorvidos nos estágios imaturos influenciam no sucesso do seu desenvolvimento (Chown & Nicolson, 2004; Reyes-Ramírez et al., 2021). Diante disso, acredita-se que a produção de grandes volumes de ejaculados em joaninhas está relacionada com a contribuição nutricional que as fêmeas precisam para a reprodução (Perry & Rowe, 2010; Perry & Crystal, 2013). Embora alguns estudos tenham avaliado o perfil reprodutivo entre machos de Coccinellidae sob diferentes tipos de dieta, cujas análises geralmente são realizadas através da medição dos espermátóforos (Perry & Rowe, 2010), estudos que investiguem o perfil químico desses ejaculados ainda são escassos, sabendo-se apenas que podem ser compostos por lipídios, proteínas e carboidratos (Fisher, 1959).

Por essas razões, testamos a influência de três diferentes tipos de dieta no desempenho dos espermátóforos de *C. montrouzieri*. Também levantamos a hipótese de que variações na qualidade e na quantidade de alimento ofertado aos machos na fase adulta comprometem o desempenho reprodutivo das fêmeas, afetando sua fecundidade e fertilidade. Para atingir esses objetivos, foi realizada uma análise entre espermátóforos de machos submetidos à diferentes tipos de dieta e sua influência na concentração dos macronutrientes de reserva energéticas.

2.REFERENCIAL TEÓRICO

Nas espécies com reprodução sexuada, a transferência de gametas pode se dar de forma indireta, onde os machos encapsulam os espermatozoides em estruturas que serão transferidas para as fêmeas, denominados de espermatóforos (Figura 1 A) (Gillott, 1996; Proctor, 1998). Acredita-se que os espermatóforos surgiram como uma forma de adaptação inicial à vida terrestre, protegendo os gametas masculinos até que estejam dentro do trato reprodutivo da fêmea (Davey,1960). Em insetos de ordens mais derivadas, a transferência de espermatozoides ocorre de forma direta, onde os machos desenvolveram um órgão reprodutor capaz de transferir os espermatozoides diretamente no receptáculo reprodutivo das fêmeas, onde a produção do espermatóforo ainda se conserva ou desaparece completamente (Figura 1 A) (Gillott, 1996; Proctor, 1998).

Embora a principal função do acasalamento seja a transferência de gametas, os ejaculados masculinos contêm outras substâncias que são produzidas por diversas partes do aparelho reprodutor masculino, como dos tecidos secretores do trato reprodutivo, vesículas seminais, ducto ejaculatório, bulbo ejaculatório, testículos e principalmente das glândulas reprodutivas acessórias (GRA) e transferidas para as fêmeas durante o acasalamento (Avila, 2011). Quando os machos transferem espermatóforos nutritivos para as fêmeas, essa contribuição pode ser considerada uma forma de “presente nupcial” (Lewis & South, 2012).

2.1 Presentes nupciais

Durante o cortejo ou cópula, os materiais fornecidos por um doador a um receptor aumenta a aptidão reprodutiva do receptor, que vão além dos gametas necessários para fecundação (Lewis et al., 2014), podendo ser ofertados alimentos, partes do corpo do macho, hemolinfa, secreções de glândulas salivares e fluidos seminais (Lewis & South, 2012). Embora sejam diversos, os presentes nupciais podem ser classificados segundo sua origem, como endógenos ou exógenos, como também segundo a forma como são absorvidos pelos receptores em oral e genital (Vahed, 1998).

Segundo a sua origem, os presentes nupciais podem ser endógenos, quando produzidos pelos doadores, ou exógenos, quando os doadores captam ou recolhem (Lewis et al., 2014). Os presentes exógenos são geralmente sementes ou presas que são capturados pelos doadores e oferecidos durante a corte ou cópula. Essas ações podem aumentar o sucesso do doador para o acasalamento, influenciando na duração da cópula e na transferência de espermatozoides, uma vez que os receptores avaliam

frequentemente o presente recebido antes do acasalamento e alimentam-se deles durante a cópula (Lewis et al., 2014). Em *Hylobittacus apicalis* (Mecoptera: Bittacidae), por exemplo, os machos capturam pequenos artrópodes e oferecem às fêmeas durante a corte. As fêmeas consomem a presa oferecida ao mesmo tempo que os machos realizam a cópula (Thornhill, 1980).

Por outro lado, os presentes endógenos são aqueles produzidos pelo próprio doador, que podem ser fornecidos através de hemolinfa, partes do corpo do doador e podem também ser frutos de glândulas secretoras, como as salivais ou reprodutoras (Gershman et al., 2013). Em diversas espécies de grilos (Tettigoniidae), os machos produzem spermatofilax, uma secreção nutritiva que é transferida durante a cópula, e utilizadas pelas fêmeas como alimento aumentando a produção de ovos (Wedell, 1993).

Quando os presentes nupciais são classificados da maneira como são absorvidos pelos receptores, podem ser agrupados em orais e genitais. Os presentes nupciais orais são aqueles que são consumidos via aparelho mastigador e absorvidos pelo trato digestivo das fêmeas, geralmente logo após a cópula. Incluem-se neste grupo muitos Micrópteros (Gwynne, 1984; Thornhill, 1976) diversas espécies de grilos (Gwynne, 1990; Wedell, 1993) e coleópteros (Fu et al., 2012). Os presentes nupciais genitais são aqueles que são absorvidos diretamente pelo trato reprodutivo das fêmeas, como as paredes internas da bursa copulatrix, cujo padrão ocorre em diversas espécies de Lepidoptera (Lewis et al., 2014). Os presentes nupciais endógenos glandulares podem fornecer nutrientes que de outra forma seriam escassos nas dietas dos receptores, incluindo macro e micronutrientes, água e produtos químicos de defesa (Lewis et al., 2014).

Na maioria dos táxons, o presente nupcial representa o esforço e a contribuição dos machos para o fitness reprodutivo das fêmeas (Liu et al., 2015). Estudos sobre a contribuição dos machos para o sucesso reprodutivo são amplamente documentados na literatura, em relação a diversas espécies de insetos (Wickler, 1986, 1994; Quinn & Sakaluk, 1986; Simmons & Parker, 1989; Jia et al., 2000; Gwynne, 2008; Lehmann et al., 2018; South & Lewis, 2011; Lewis et al., 2014; Pérez-Rodríguez et al., 2019; Perry, 2011). Muitos autores descrevem o presente nupcial como uma forma de investimento parental, para que as fêmeas produzam o maior número de descendentes viáveis possível (Trivers, 1972; Thornhill, 1976a). Esse comportamento também é descrito como um esforço de acasalamento, seja para motivar a fêmea a acasalar ou otimizar a transferência do ejaculado (Boldyrev, 1915; Thornhill, 1976b; Sakaluk, 1984). Para espécies onde o ambiente apresenta uma alta flutuação na disponibilidade de alimento e outras fontes nutritivas, os presentes nupciais podem suprir essa escassez como

mecanismo de seleção sexual e maximização de uma reprodução bem-sucedida (South & Lewis et al., 2011; Marshall, 1982).

Os experimentos desenhados para quantificar essa contribuição masculina recorrem principalmente a duas metodologias: observações indiretas, nas quais se examina o impacto pós-cópula na performance reprodutiva das fêmeas, considerando aspectos como longevidade e fecundidade (McLain et al., 1990; Wagner et al., 2001), ou observações diretas, por meio da quantificação de presentes nupciais oferecidos pelos machos. No caso de presentes nupciais transferidos durante a cópula, o método mais comum para mensurar a contribuição masculina é a análise do ejaculado. A medição de espermatozoides pode ser realizada por estimativas de volume, baseado na medição direta de comprimento e largura (He & Tsubaki, 1991; Royer & McNeil, 1993; Jiménez-Pérez & Wang, 2003), pesagem direta (Wedell, 1993; Sturm, 2014), ou de forma indireta, por meio da diferença de massa dos adultos antes e após a cópula (Lauwers & Van Dyck, 2006; Marcotte et al., 2007).

Embora pouco explorada, a composição química dos espermatozoides pode ser analisada para fornecer informações mais detalhadas sobre a qualidade e a quantidade dos compostos alocados para a reprodução (Scolari et al., 2016; Pérez-Rodríguez et al., 2019). A análise bioquímica do ejaculado se destaca pela maior precisão, permitindo não apenas quantificar, mas também avaliar qualitativamente as substâncias envolvidas na reprodução, proporcionando uma compreensão mais profunda do impacto dessas substâncias na fecundidade e longevidade das fêmeas.

2.2 Composição do espermatozoide e principais funções do fluido seminal

Em insetos, os machos produzem ejaculados complexos, que contém mais do que apenas espermatozoides (Wheller, 2009). A estrutura do espermatozoide e o mecanismo de transferência diferem entre as ordens de insetos (Happ, 2014). No geral, são sintetizados pelas glândulas reprodutoras masculinas (GRM) e consiste em uma secreção viscosa, que é moldada pelas estruturas internas do macho ou da fêmea após sua inserção no trato reprodutivo feminino (Klowden, 2001).

A atividade secretora das GRM e de outros tecidos associados ao sistema reprodutivo são controladas pelo sistema neuroendócrino (Herman, 1993). Para os insetos machos, as GRM produzem secreções essenciais que facilitam a transferência de espermatozoides e atuam na proteção dos gametas (Leopold, 1976). No entanto, em várias espécies, as secreções das GRM apresentam um papel multifuncional, que parece ser exclusiva de insetos, como modular a fisiologia e o comportamento das fêmeas (Gillott, 2003). Machos podem destinar diversas substâncias para a composição

do ejaculado. Sua composição pode incluir, proteínas e peptídeos seminais, carboidratos, lipídios, vitaminas e sais minerais, açúcares, ácidos nucleicos, compostos defensivos, água, aminoácidos, supressores de imunidade, células de imunidade, hormônios, ácido úrico, entre outros macros e micronutrientes (Figura 1 B) (Poiani, 2006; Perry et al., 2013; Hopkins et al., 2018).

O componente não espermático do fluido seminal cumpre três funções principais para os machos, a contribuição na capacitação espermática, influencia na competição espermática e a contribuição no processo de fertilização dos ovos (Figura 1C) (Poiane, 2006). A contribuição na capacitação espermática se dá através de proteínas e carboidratos secretadas nas GRA masculinas (Gillott, 1996). Em *Tenebrio militior* (Coleoptera: Tenebrionidae) proteínas estruturais presentes nos espermatóforos, como a trealase e açúcares como a trealose, desempenham um papel importante na ativação dos espermatozoides na bursa copulatrix das fêmeas (Yaginuma et al., 1996).

Durante a competição espermática machos podem produzir tampões ou inibidores da receptividade feminina (Gillott, 1996) e substâncias alospermicidas, que é a capacidade de inibir, neutralizar ou destruir os espermatozoides de outros machos dentro do trato reprodutivo da fêmea, como em algumas espécies de moscas *Cyrtodiopsis* (Fry & Wilkinson, 2004). O fluido seminal também pode auxiliar na motilidade dos espermatozoides, tornando-os mais rápido durante a competição espermática, principalmente nos casos em que a fêmea copula com mais de um macho em curto espaço de tempo (Brinkhead et al., 1999) (Figura 1 C).

Quando absorvidas, as substâncias transferidas na porção não espermáticas do fluido seminal podem provocar modificações fisiológicas e comportamentais nas fêmeas (Gillott, 2003), como afetar a fertilidade (Wedell et al., 2006), acelerar a maturação dos ovos (Fricke et al., 2010), aumentar a fecundidade (McLain et al., 1990) e suprimir a receptividade sexual (Green & Tregenza, 2009). Fluido seminal transferidos via espermatóforos também podem servir como fonte de alimento para as fêmeas (Gillott, 1996). Fêmeas também podem utilizar o ejaculado como uma forma de medir a qualidade de seu parceiro de acasalamento, sendo um fator determinante de boa nutrição (Andersson, 1994). Em diversos táxons, fêmeas se beneficiam ao acasalar várias vezes. No entanto, há efeitos negativos em alguns parâmetros biológicos. Fêmeas que receberam mais ejaculado por meio de acasalamentos poliândricos mostram maiores reduções no tempo de vida em comparação com fêmeas que acasalaram repetidamente com o mesmo macho (South & Lewis, 2011) (Figura 1 C).

2.2.1 Fatores que afetam a produção dos espermatozoides

Machos alocam substâncias variadas na composição do ejaculado, e a qualidade e quantidade dessas substâncias são fortemente dependentes de sua nutrição e seu estado fisiológico (Rowe & Houle 1996). A produção de componentes do ejaculado, como proteínas, lipídios, e carboidratos, tem um custo energético elevado e os machos parecem alocar seus recursos de forma estratégica, priorizando as oportunidades reprodutivas quando sua condição nutricional permite, e reduzindo o investimento quando os recursos são escassos (Jia, et al., 2000, Marshall & McNeil, 1989). No geral, machos bem nutridos produzem ejaculados enriquecidos o que lhe garante maior aceitação por parte das fêmeas e tempos de cópula mais longos, fatores essenciais para a fertilização bem-sucedida (Rowe & Houle 1996).

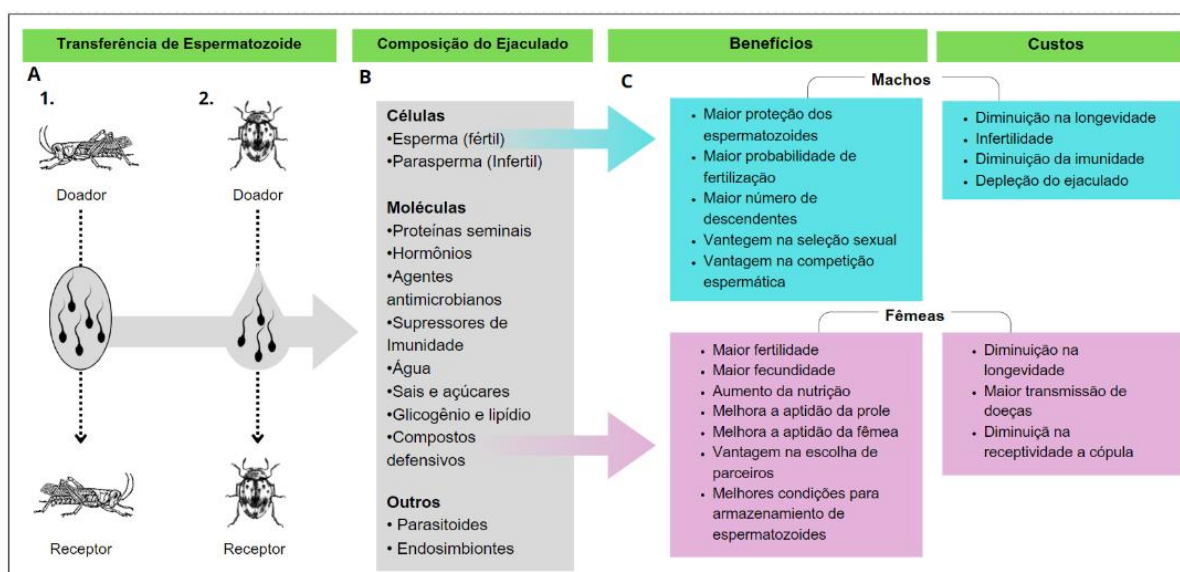
A frequência de acasalamento, é mais um fator que podem afetar a seleção de substâncias no fluido seminal (Kelly & Jennions, 2011). Em situações em que há alta competição espermática, ou seja, quando as fêmeas acasalam com múltiplos machos, os machos tendem a aumentar a quantidade de esperma e outros componentes do ejaculado como forma de assegurar maior probabilidade de fertilização (Aluja et al., 2009). Em espécies altamente poliândricas, a quantidade de proteínas nos espermatozoides é significativamente maior do que em espécies monândricas ou monogâmicas, representando uma grande parte de sua composição (Blanco et al., 2009; Bissoondath & Wiklund, 1995). Quando macho oferece presentes nupciais, como secreções glandulares, a composição do ejaculado pode variar de acordo com o tamanho ou a qualidade desses presentes (Wedell, 1994).

A disponibilidade e oferta de alimentos é uma questão central nos sistemas de acasalamento onde os machos oferecem presentes nupciais para as fêmeas (Albo, 2014). Machos são capazes de ajustar a qualidade de seus presentes nupciais de acordo com as características de futuras parceiras. Por exemplo, machos de *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) modificam a composição do fluido seminal em resposta ao status de acasalamento das fêmeas (Frick et al., 2010). Machos investem em ejaculados maiores com fêmeas virgens e pela sua qualidade fenotípica, como tamanho do corpo (Kelly & Jennions, 2011).

As diferentes dietas que um macho tem acesso afetam diretamente a qualidade dos ejaculados produzidos. Por exemplo, em *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), machos alimentados com dietas ricas em proteínas produziram espermatozoides majoritariamente formados por conteúdo proteico. No entanto, quando a dieta foi modificada pela retirada de proteínas, consistindo apenas de carboidratos, observou-se uma redução de 35% na quantidade de proteínas alocadas (Reyes-Ramírez et al.,

2021). Embora haja uma vasta literatura que mostra como a qualidade dos recursos alimentares impactam o sucesso reprodutivo das fêmeas (Marshall, 1982; Boggs, 1990; Guo et al., 2021; Badisco, 2013; Smykal & Raikhel, 2015; Fricke et al., 2010), estudos sobre como esses recursos são utilizados e manejados pelos machos em seus ejaculados, especialmente em espécies que produzem espermatóforos, não fornecem detalhes suficientes para o entendimento de como este mecanismo funciona.

Figura 1: Um modelo representativo dos modos de transferência, estrutura e função do fluido seminal em insetos.



Fonte: a autora

(A) transferência de espermatozoide: a seta tracejada representa a introdução de espermatozoide na fêmea. (1) a forma em oval representa os espermatozoides que são encapsulados em espermatóforos. (2) a forma de gota representa a transferência direta, onde os espermatozoides são transferidos diretamente no trato reprodutivo das fêmeas. (B) componentes que podem ser alocados no fluido seminal. (C) custos e benefícios associados a transferência de substâncias adicionais no fluido seminal, os efeitos podem ocorrer pré ou pós cópula.

2.3 Biologia Reprodutiva de *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant, 1853

Cryptolaemus montrouzieri é uma joaninha predadora com hábitos generalistas que consome diversas espécies de insetos (Kairo et al., 2013). Apresenta o desenvolvimento holometábolo e sob condições ideais, completam seu ciclo em 27 a 30 dias (Figura 02 A) (Mani, 2008). Machos e fêmeas atingem a maturidade sexual em períodos diferentes, machos se desenvolvem e atingem a maturidade sexual antes das fêmeas o que faz com que o período de pré-acasalamento dure em torno de 5 a 7 dias, tempo estimado para maturação ovariana nas fêmeas (Ferraz dos Santos, 2023). *C. montrouzieri* é uma espécie que apresenta alta frequência de cópula (Félix et al., 2022), e podem acasalar com vários machos diferentes, (Jayanthi et al., 2013), sendo a transferência de espermatozoide indireta com produção de espermatóforos (Kaufman, 1996).

Liu et al. (2016) descreveram o sistema reprodutor de *C. montrouzieri*, apresentando as diferenças estruturais entre machos e fêmeas. No macho, o sistema é composto por duas glândulas acessórias, um par de testículos esbranquiçados em formato de cacho de uvas, um par de vasos deferentes, uma vesícula seminal, um ducto ejaculatório, um órgão copulador (edéago) e um órgão auxiliar chamado tégmen. Os ductos deferentes conectam os testículos à vesícula seminal, onde os espermatozoides são coletados e, durante a cópula, são transferidos à fêmea pelo órgão copulador (Figura 02 B1). No sistema reprodutor feminino, há um par de ovários contendo entre 10 e 14 ovários por lado, um par de ovidutos laterais, um oviduto mediano, uma câmara genital e uma espermateca. A espermateca, estrutura semicircular e quitinizada, armazena os espermatozoides após a cópula, e os ovidutos laterais se unem ao oviduto mediano, que se abre na vagina (Figura 02 B2).

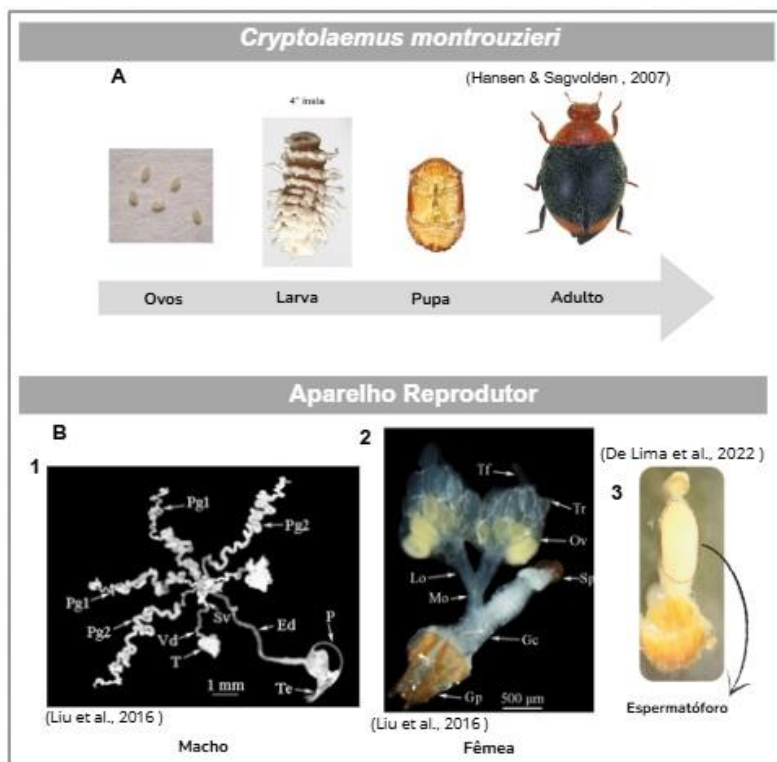
Estudos recentes têm descrito os mecanismos de funcionamento da biologia reprodutiva de *C. montrouzieri*. Essa espécie produz espermatóforos (Kaufman, 1996) que são transferidos inicialmente para o saco de fertilização da fêmea, para em seguida serem supridos com espermatozoides (Figura 02 B3) (De Lima et al., 2022). A maturação ovariana é altamente dependente da qualidade alimentar, especialmente uma fonte rica em proteínas, uma vez que fêmeas adultas expostas a dietas exclusivas de mel ou pólen, não produziram ovos (Marques et al., 2014, Ferraz dos Santos et al., 2023).

A alimentação na fase adulta é fundamental para a reprodução, afetando tanto machos quanto fêmeas, uma vez que, quando há redução nas oportunidades de cópula, a taxa de consumo de presas é reduzida (Felix et al., 2022). A presença constante dos machos estimula a produção de ovos, em comparação com fêmeas com poucas ou uma única cópula (De Lima et al., 2022, Felix et al., 2022), o que sugere que provavelmente machos sejam capazes de passar substâncias nutritivas ou estimulantes de oviposição através da cópula. Esses resultados sugerem fortemente que machos de *C. montrouzieri* recorrem à alimentação na fase adulta para produzir seus espermatóforos.

Nesse sentido, estudos sobre o perfil bioquímico e os efeitos da alimentação na alocação de macronutrientes via espermatóforos em *C. montrouzieri* ainda são escassos, limitando-se muitas vezes a efeitos indiretos nas fêmeas, como a fertilidade e a fecundidade nas fêmeas (De Lima et al., 2022; Felix et al., 2022) ou a estudos sobre a sua biologia reprodutiva ou efeitos da alimentação no seu desenvolvimento (Silva-Junior & Pontes, 2024; Ferraz dos Santos et al., 2023; Xie et al., 2015) e muitos estudos sobre seus efeitos predatórios (BIBI et al., 2023; Kairo et al., 2013). Mediante ao exposto, o presente trabalho busca preencher essa lacuna ao investigar diretamente o

perfil bioquímico e os efeitos da alimentação na alocação de macronutrientes via espermátóforos em *C. montrouzieri*, contribuindo para uma compreensão mais detalhada dos mecanismos reprodutivos da espécie.

Figura 2: Ciclo biológico e aparelho reprodutor de *C. montrouzieri*.



Fonte: a autora

(A) Ciclo de vida de *C. montrouzieri*: fase de ovo, larva que é subdividida em 4 instas, pupa e adulto. (B) (1) Aparelho reprodutor masculino - **Ed**: Ducto Ejaculatório; **P**: Pênis/Edeago; **Pg1**: Glândula Paragônica 1; **Pg2**: Glândula Paragônica 2; **Sv**: Vesícula Seminal; **T**: Testículo; **Te**: Tegmen; **Vd**: Ducto Deferente. (2) Aparelho reprodutor feminino - **Tr**: Traqueia; **Ge**: Câmara Genital; **Gp**: Placa Genital; **Lo**: Oviduto Lateral; **Mo**: Oviduto Mediano; **Ov**: Ovariolo; **Sp**: Filamento Terminal. (3) Bursa copulatrix, área destacada representa um espermátóforo transferido após 30 minutos de cópula.

REFERÊNCIAS

- ALBO, M. J.; TOFT, S.; BILDE, T. Sexual selection, ecology, and evolution of nuptial gifts in spiders. In: Sexual Selection. **Academic Press**. p. 183-200. 2014.
- ANDERSSON, M. Sexual Selection. **Princeton University Press**, 1994.
- AVILA, F. W. et al. Insect seminal fluid proteins: identification and function. **Annual review of entomology**, v. 56, n. 1, p. 21–40, 2011.
- ALUJA, M. et al. Male and female condition influence mating performance and sexual receptivity in two tropical fruit flies (Diptera: Tephritidae) with contrasting life histories. **Journal of Insect Physiology**, v. 55, n. 12, p. 1091–1098. 2009.
- BAYOUMY, M. H.; MICHAUD, J. P. Female fertility in *Hippodamia convergens* (Coleoptera: Coccinellidae) is maximized by polyandry, but reduced by continued male presence. **European Journal of Entomology**, v. 111, n. 4, p. 513–520, 2014.
- BADISCO, L.; VAN WIELENDAALE, P.; VANDEN BROECK, J. Eat to reproduce: a key role for the insulin signaling pathway in adult insects. **Frontiers in Physiology**, v. 4, 2013.
- BIBI, R. et al. Consumption of Citrus mealybug, *Planococcus citri* by two predators, *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant and *Chrysoperla carnea* (Stephens), under controlled conditions. **International journal of tropical insect science**, v. 43, n. 1, p. 83–91, 2022.
- BIRKHEAD, T. R.; et al. Sperm mobility determines the outcome of sperm competition in the domestic fowl. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 266, p. 1759–1764, 1999.
- BISSOONDATH, C. J.; WIKLUND, C. Protein content of spermatophores in relation to monandry/polyandry in butterflies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 37, n. 6, p. 365–371, 1995.
- BLANCO, C. A.; et al. Size and chemical composition of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) spermatophores. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 102, n. 4, p. 629–637, 2009.
- BOLDYREV, B. T. Contributions à l'étude de la structure des spermatophores et des particularités de la copulation chez Locustidae et Gryllodea. **Horae Societatis Entomologicae Rossicae**, v. 41, n. 6, p. 1–245, 1915.
- BOGGS, C. L. A general model of the role of male-donated nutrients in female insects' reproduction. **The American Naturalist**, v. 136, n. 5, p. 598–617, 1990.
- CHOWN, S.; NICOLSON, S. Insect physiological ecology: mechanisms and patterns. Oxford: **Oxford University Press**, 2004.
- DAVEY, K. G. The evolution of spermatophores in insects. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London*, v. 35A, p. 107–113, 1960.
- DE LIMA, C. H.; NÓBREGA, R. L.; FERRAZ, M. L.; PONTES, W. J. Mating duration and spermatophore transfer in *Cryptolaemus montrouzieri* (Coccinellidae). **Biologia**, v. 77, n. 1, p. 149–155, 2022.
- FÉLIX, K. E. S.; et al. No sex, no job: sexual abstinence reduces feeding rates of *Cryptolaemus montrouzieri*. **Bulletin of Insectology**, v. 75, n. 2, p. 293–298, 2022.
- FISHER, T.W. Occurrence of spermatophore in certain species of *Chilocorus*. **Pan-Pacif. Ent.** 35: 205–208. 1959.
- FRICKE, C.; et al. Female nutritional status determines the magnitude and sign of responses to a male ejaculate signal in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 23, p. 157–165, 2010.
- FRY, C. L.; WILKINSON, G. S. Sperm survival in female stalk-eyed flies depends on seminal fluid and meiotic drive. **Evolution**, v. 58, p. 1622–1626, 2004.
- FU, Xinhua; SOUTH, Adam; LEWIS, Sara M. Sexual dimorphism, mating systems, and nuptial gifts in two Asian fireflies (Coleoptera: Lampyridae). **Journal of Insect Physiology**, v. 58, n. 10, p. 1485–1492, 2012.

- GERSHMAN, S.; HUNT, J.; SAKALUK, S. K. Food fight: sexual conflict over free amino acids in the nuptial gifts of male decorated crickets. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 26, p. 693–704, 2013.
- GIORGI J.A.; VANDENBERG N.J.; MCHUGH J.V.; FORRESTER J.A.; ŚLIPIŃSKI S.A.; MILLER K.B.; SHAPIRO L.R & WHITING M.F. **The evolution of food preferences in Coccinellidae**. *Biological control: theory and applications in pest management*, v. 51, n. 2, p. 215–231, 2009
- GILLOTT, C. Male insect accessory glands: Functions and control of secretory activity. **Invertebrate reproduction & development**, v. 30, n. 1–3, p. 199–205, 1996.
- GILLOTT, C. Male accessory gland secretions: Modulators of female reproductive physiology and behavior. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 163-184, 2003.
- GUO, J.-W. et al. Male nutritional status does not impact the reproductive potential of female *Cnaphalocrocis medinalis* moths under conditions of nutrient shortage. **Insect science**, v. 29, n. 2, p. 467–477, 2022.
- GREEN, K; TREGENZA, T. The influence of male ejaculates on female mate search behaviour, oviposition and longevity in crickets. **Animal Behaviour**, v. 77, n. 4, p. 887-892. 2009.
- GWYNNE, D. T. Nuptial feeding behaviour and female choice of mates in *harpobittacus similis* (MECOPTERA: BITTACIDAE). **Australian journal of entomology**, v. 23, n. 4, p. 271–276, 1984.
- GWYNNE, D. T. The katydid spermatophore: evolution of a parental investment. In: BAILEY, W. J.; RENTZ, D. C. F. *The Tettigoniidae: Biology, Systematics and Evolution*. Bathurst: **Crawford House Press**, 1990. p. 27–40.
- GWYNNE, D. T. Sexual conflict over nuptial gifts in insects. **Annual review of entomology**, v. 53, n. 1, p. 83–101, 2008.
- HE, Y.; TSUBAKI, Y. Effects of spermatophore size on female remating in the armyworm, *Pseudaletia separata*, with reference to larval crowding. **Journal of Ethology**, v. 9, n. 2, p. 47-50. 1991.
- HERMAN, W. S. Endocrinology of the monarch butterfly. **Natural History Museum Los Angeles County Science Series**, v. 38, 1993. p. 143-146.
- HODEK, I.; CERNYNGIER, P. Sexual activity in Coccinellidae (Coleoptera): a review. **European Journal of Entomology**, v. 97, 2000. p. 449–456.
- HODEK, I.; HONEK, A.; VAN EMDEN, H. F. *Ecology and behaviour of the ladybird beetles (Coccinellidae)*. Chichester: **Wiley-Blackwell**, 2012.
- HOPKINS, B. R.; AVILA, F. W.; WOLFNER, M. F. Insect male reproductive glands and their products. Em: **Encyclopedia of Reproduction**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 137–144.
- HAPP, G. M. Structure and Development of Male Accessory Glands in Insects. In: M.S. Kaulenas. *Insect Accessory Reproductive Structures*. **Springer Science & Business Media**, 6 Dec. 2012.
- JAYANTHI, P. D. K.; SANGEETHA, P.; VERGHESE, A. Influence of Polyandry on Clutch Size of the Predatory Coccinellid, *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae). **Florida Entomologist**, v. 96, n. 3, p. 1073-1076, 2013.
- JIA, Lei; SOKOLOWSKI, Mary Beth; SMITH, Robert L. Nutritional condition influences investment by male in nuptial feeding gifts. **Ecological Entomology**, v. 25, n. 2, p. 115-120, 2000.
- JIMÉNEZ-PÉREZ, A.; WANG, Q. Effect of mating delay on the reproductive performance of *Cnephasia jactatana* (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 96, n. 3, p. 592-598. 2003.
- KAIRO, M. T. K.; et al. *Cryptolaemus montrouzieri* (Mulsant) (Coccinellidae: Scymninae): a review of biology, ecology, and use in biological control with particular reference to potential impact on non-target organisms. **CAB Reviews**, v. 8, n. 005, p. 1-20, 2013.
- KATAKURA, H. Sperm transfer in the potato ladybird *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Coleoptera, Coccinellidae, Epilachninae). **Entomological Review**, v. 53, n. 4, p. 652-657, 1985.

- KATAKURA, H.; NAKANO, S.; HOSOGAI, T.; KAHONO, S. Female internal reproductive organs, modes of sperm transfer, and phylogeny of Asian Epilachninae (Coleoptera: Coccinellidae). **Journal of Natural History**, v. 28, n. 3, p. 577-583, 1994.
- KAUFMANN, T. Dynamics of sperm transfer, mixing, and fertilization in *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae) in Kenya. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 89, n. 2, p. 238-242, 1996.
- KLOWDEN, M. J. Spermatophore. In: RESH, V. H.; CARDE, R. T. (eds.). Encyclopedia of insects. San Diego: **Academic Press**, 2003. p. 1027-1030.
- KELLY, C. D.; JENNIONS, M. D. Sexual selection and sperm quantity: meta-analyses of strategic ejaculation. **Biological Reviews**, v. 86, p. 863-884, 2011.
- KLOWDEN, M. J. Sexual receptivity in *Anopheles gambiae* mosquitoes: absence of control by male accessory gland substances. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, p. 661-666, 2001.
- LAUWERS, K.; VAN DYCK, H. The cost of mating with a non-virgin male in a monandrous butterfly: experimental evidence from the speckled wood, *Pararge aegeria*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 60, p. 69-76. 2006.
- LEOPOLD, R. A. The Role of Male Accessory Glands in Insect Reproduction. **Annual Review of Entomology**, v. 21, n. 1, p. 199-221, 1976.
- LEWIS, S. M.; et al. Emerging issues in the evolution of animal nuptial gifts. **Biology Letters**, v. 10, p. 1-5, 2014.
- LEWIS, S. M.; SOUTH, A. The evolution of animal nuptial gifts. **Advances in the Study of Behavior**, v. 44, p. 53-97, 2012. doi: 10.1016/B978-0-12-394288-3.00002-2.
- LIMA, M. S. DE; PONTES, W. J. T.; NÓBREGA, R. DE L. Pollen did not provide suitable nutrients for ovary development in a ladybird *Brumoides foudrasii* (Coleoptera: Coccinellidae). **Diversitas Journal**, v. 5, n. 3, p. 1486-1494, 2020.
- LIU, ZW; ZHANG, C; QIU, BL; WANG, XM. Reproductive system structure and oogenesis of *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coccinellidae: Coleoptera). **Chinese Journal of Applied Entomology**, v. 53, n. 2, p. 381-389, 2016.
- LIU, X. et al. Is diversification in male reproductive traits driven by evolutionary trade-offs between weapons and nuptial gifts? **Proceedings. Biological sciences**, v. 282, n. 1807, p. 20150247, 2015.
- MARQUES, C. E. M.; et al. Evaluation of *Ferrisia dasyllirii* (Cockerell) (Hemiptera: Pseudococcidae) and Non-Prey Foods on the Development, Reproduction, and Survival of *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae). **Coleopterists Bulletin**, v. 69, p. 343-348, 2015.
- MANI, M. Polyhouse efficacy of *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant for the suppression of *Planococcus citri* (Risso) on grapes and *Ferrisia virgata* (Cockerell) on guava. **Journal of Insect Science**, v. 21, p. 202-204, 2008.
- MARCOTTE, M.; DELISLE, J.; MCNEIL, J.N. Effects of different male remating intervals on the reproductive success of *Choristoneura rosaceana* males and females. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 2, p. 139-145. 2007.
- MARSHALL, L. D.; McNEIL, J. N. Spermatophore mass as an estimate of male nutrient investment: a closer look in *Pseudaletia unipuncta* (Haworth) (Lepidoptera: Noctuidae). **Functional Ecology**, v. 3, n. 5, p. 605-612, 1989.
- MARSHALL, L. D. Male nutrient investment in the Lepidoptera: what nutrients should males invest? **The American Naturalist**, Chicago, v. 120, n. 2, p. 273-279, Aug. 1982.
- MISHRA, G.; OMKAR. Ageing trajectory and longevity trade-off in an aphidophagous ladybird, *Propylea dissecta* (Coleoptera: Coccinellidae). **European Journal of Entomology**, v. 103, p. 33-40, 2006.
- MCLAIN, D. K.; LANIER, D. L.; MARSH, N. B. Effects of female size, mate size, and number of copulations on fecundity, fertility, and longevity of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 83, n. 6, p. 1130-1136. 1990.

OMKAR, S. K. S.; PERVEZ, A. Ladybird Beetles. In: OMKAR. Ecofriendly Pest Management for Food Security. London: **Academic Press**, 2016. Cap. 9, p. 281–310.

OMKAR; PERVEZ, A. Mating behavior of an aphidophagous ladybird beetle, *Propylea dissecta* (Mulsant). **Journal of Insect Science**, v. 12, p. 37–44, 2005.

PERRY, J. C.; ROWE, L. Condition-dependent ejaculate size and composition in a ladybird beetle. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 277, n. 1700, p. 3639–3647, 2010.

PERRY, J. C.; ROWE, L. Ingested spermatophores accelerate reproduction and increase mating resistance but are not a source of sexual conflict. **Animal behaviour**, v. 76, n. 3, p. 993–1000, 2008.

PERRY, J. C. Mating stimulates female feeding: testing the implications for the evolution of nuptial gifts. **Journal of Evolutionary Biology**, [s.l.], v. 24, n. 8, p. 1727–1736, Aug. 2011.

PERRY, J. C.; SIROT, L.; WIGBY, S. The seminal symphony: how to compose an ejaculate. **Trends in ecology & evolution**, v. 28, n. 7, p. 414–422, 2013.

PERVEZ, A.; MAURICE, N. Polyandry affects the reproduction and progeny of a ladybird beetle, *Hippodamia variegata* (Goeze). **European Journal of Environmental Sciences**, v. 1, n. 1, p. 19–23, 2011.

PERVEZ, A.; OMKAR; HARSUR, M. M. Coccinellids on Crops: Nature's Gift for Farmers. In: CHAKRAVARTY, A. K. Innovative Pest Management Approaches for the 21st Century: Harnessing Automated Unmanned Technologies. Singapore: **Springer International Publisher**, 2020. p. 429–460.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, J.C. et al. Spermatophore production and sperm quality of the river prawn *Macrobrachium americanum* Spence Bate, 1868 fed with different diets. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 11, p. 3117–3129. 2019.

POIANI, A. Complexity of seminal fluid: a review. **Behavioral ecology and sociobiology**, v. 60, n. 3, p. 289–310, 2006.

PROCTOR, H. C. Indirect sperm transfer in arthropods: Behavioral and evolutionary trends. **Annual Review of Entomology**, v. 43, p. 153–174, 1998.

QUINN, J. S.; SAKALUK, S. K. Pre-zygotic male reproductive effort in insects: why do males provide more than sperm? **Florida Entomologist**, v. 69, p. 84–94, 1986.

REYES-RAMÍREZ, A.; ROCHA-ORTEGA, M.; CÓRDOBA-AGUILAR, A. Dietary macronutrient balance and fungal infection as drivers of spermatophore quality in the mealworm beetle. **Current Research in Insect Science**, v. 1, p. 100009, 2021.

ROYER, L.; MCNEIL, J. N. Male investment in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae): impact on female longevity and reproductive performance. **Functional Ecology**, p. 209–215. 1993.

ROWE, L.; HOULE, D. The lek paradox and the capture of genetic variance by condition dependent traits. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v. 263, p. 1415–1421, 1996.

SILVA-JUNIOR, A. O.; TELES-PONTES, W. J. Larvae of *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae) prioritize secretion of protective wax over daily consumption and growth. **Neotropical entomology**, v. 53, n. 3, p. 641–646, 2024.

SCOLARI, F. et al. The spermatophore in *Glossina morsitans morsitans*: insights into male contributions to reproduction. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 20334. 2016.

SKIRVIN, D.J., PERRY, J.N. HARRINGTON, R. The effect of climate change on an aphid-coccinellid interaction. **Global Change Biology**, 3:1–11, 1997

SMYKAL, V.; RAIKHEL, A. S. Nutritional control of insect reproduction. **Current Opinion in Insect Science**, v. 11, p. 31–38, out. 2015.

SAKALUK, S. K. Male crickets feed females to ensure complete sperm transfer. **Science**, v. 223, p. 609–610, 1984.

FERRAZ DOS SANTOS, M. L.; RODRIGUES-PEDROSA, J.; PONTES, W. J. T. The pre-oviposition period is associated with ovary maturation in *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant, 1850

(Coleoptera: Coccinellidae). **Invertebrate reproduction & development**, v. 67, n. 3–4, p. 129–134, 2023.

SAMWAYS, M.J., OSBORN, R., HASTINGS, H., HATTINGH, V. Global climate change and accuracy of prediction of species' geographical ranges: establishment success of introduced ladybirds (Coccinellidae, Chilocorus spp.) worldwide. **Journal of Biogeography**, 26: 795-812, 1999.

SOUTH, Adam; LEWIS, Sara M. The influence of male ejaculate quantity on female fitness: a meta-analysis. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 86, n. 2, p. 299-309, 2011.

SIMMONS, L. W.; PARKER, G. A. Nuptial feeding in insects: mating effort versus paternal investment. **Ethology**, v. 81, p. 332–343, 1989.

SOLANGI, G. S.; LOHAR, M. K.; ABRO, G. H.; BURIRO, A. S. Biology and release of exotic predator *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant on mealybug *Phenacoccus solenopsis* Tinsley at Tandojam. **Sarhad Journal of Agriculture**, v. 28, n. 3, p. 429-435, 2012.

SLOGGETT, J.J. Aphidophagous ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae) and climate change: a review. *Insect Conservation and Biodiversity*, 14:709-722, 2021.

STURM, R. Comparison of sperm number, spermatophore size, and body size in four cricket species. **Journal of Orthoptera Research**, p. 39-47. 2014.

THORNHILL, R. Sexual selection and paternal investment in insects. **American Naturalist**, v. 110, p. 153–163, 1976a.

THORNHILL, R. Sexual selection and nuptial feeding behaviour in *Bittacus apicalis* (Insecta: Mecoptera). **American Naturalist**, v. 110, p. 529–548, 1976b.

THORNHILL, R. Mate choice in *Hylobittacus apicalis* (Insecta: Mecoptera) and its relation to some models of female choice. **Evolution**, v. 34, p. 315-325, 1980.

TRIVERS, R. L. Parental investment and sexual selection. In: CAMPBELL, B. Sexual selection and the descent of man, 1871–1971. Chicago: **Aldine Publishing Company**, 1972. p. 136–179.

VAHED, K. The function of nuptial feeding in insects: a review of empirical studies. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 73, n. 1, p. 43–78, 1998.

XIE, J. et al. Nutrition-dependent phenotypes affect sexual selection in a ladybird. **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 13111, 2015.

WAGNER JR, W. E. et al. Females receive a life-span benefit from male ejaculates in a field cricket. **Evolution**, v. 55, n. 5, p. 994-1001. 2001.

WEDELL, N. Mating effort or paternal investment? Incorporation rate and cost of male donations in the wartbiter. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 32, p. 239–246, 1993a.

WEDELL, N. Spermatophore size in bushcrickets: comparative evidence for nuptial gifts as a sperm protection device. **Evolution**, v. 47, n. 4, p. 1203-1212. 1993b.

WEDELL, N. et al. Sexual conflict and life histories. **Animal behaviour**, v. 71, n. 5, p. 999–1011. 2006.

WHEELER, D.E. Accessory glands. In: Encyclopedia of Insects. **Academic Press**, 2009. p. 1-2.

WICKLER, W. On nuptial gifts and paternity. **Ethology**, v. 98, p. 165–170, 1994.

WICKLER, W. Mating costs versus paternal investment: A reply to Gwynne. **Ethology**, v. 71, p. 78–79, 1986.

YADAV, M.; PERVEZ, A. Reproductive behavior of predatory ladybugs (Coleoptera: Coccinellidae): a review. **International Journal of Tropical Insect Science**, v. 42, p. 3083–3095, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42690-022-00846-y>. Acesso em: 20 set. 2022.

YAGINUMA, T.; et al. Trehalase in the spermatophore from the bean-shaped accessory gland of the male mealworm beetle, *Tenebrio molitor*: Purification, kinetic properties and localization of the enzyme. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 166, p. 1–10, 1996.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os espermatozóides de *C. montrouzieri* expostos a diferentes tipos de dieta e suas contribuições na reprodução das fêmeas

3.2 Objetivos específicos

- Testar diferenças no perfil bioquímico de lipídios, açúcares e proteínas em espermatozóides transmitidos por machos adultos de *C. montrouzieri* alimentados *ad libitum*, com alimentação restrita ou com mel.
- Avaliar efeitos sobre a fecundidade e fertilidade de fêmeas acasaladas com machos submetidos a diferentes tipos de alimentação.

4. A COMPOSIÇÃO DE MACRONUTRIENTES DOS ESPERMATÓFOROS DE *CRYPTOLAEMUS MONTROUZIERI* VARIA DE ACORDO COM A ALIMENTAÇÃO DOS MACHOS?

4.1 INTRODUÇÃO

Pesquisas sobre as contribuições masculinas para a reprodução são abundantes na literatura, e são comuns entre diversas espécies de insetos. A quantificação das contribuições do macho geralmente é feita de duas maneiras: por meio de observações indiretas dos efeitos pós-cópula no desempenho reprodutivo das fêmeas, como fertilidade e fecundidade (McLain et al., 1990; Wagner et al., 2001), ou por observações diretas, medindo os presentes nupciais fornecidos pelos machos. No caso dos presentes nupciais repassados via cópula, a maneira mais comum de quantificar a contribuição do macho é através da medição do ejaculado. Espermátóforos podem ser avaliados estimando seu volume (He & Tsubaki, 1991; Royer & McNeil, 1993; Jiménez-Pérez & Wang, 2003), podem ser pesados (Wedell, 1993; Sturm, 2014), medindo a diferença de peso dos adultos antes e depois da cópula (Lauwers & Van Dyck, 2006; Marcotte et al., 2007) ou analisando sua composição química (Scolari et al., 2016; Pérez-Rodríguez et al., 2019). A análise bioquímica do ejaculado é mais precisa, pois avalia tanto a quantidade quanto a qualidade das substâncias alocadas para a reprodução e seu impacto na reprodução das fêmeas.

O perfil bioquímico do ejaculado pode variar devido a fatores como a frequência de cópulas. Em espécies poliândricas, a quantidade de proteínas alocadas nos espermátóforos é significativamente maior do que em espécies monândricas ou monogâmicas, representando grande parte de sua composição (Blanco et al., 2009; Bissoondath & Wiklund, 1995; Marshall, 1985). A fração não proteica é geralmente menor e pode incluir peptídeos, glicogênio, açúcares, lipídios, compostos defensivos, aminoácidos, supressores imunológicos e células imunológicas (Poiani, 2006; Perry et al., 2013; Hopkins et al., 2018). Componentes não espermáticos dos espermátóforos podem induzir mudanças fisiológicas e comportamentais nas fêmeas após a absorção (Gillott, 2003), como afetar a fertilidade (Wedell et al., 2006), acelerar a maturação dos ovos (Fricke et al., 2010), aumentar a fecundidade (McLain et al., 1990) e suprimir a receptividade sexual (Green & Tregenza, 2009).

A proporção de compostos alocados nos ejaculados, também é influenciada por alterações na dieta adulta. Por exemplo, *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) alimentado com dietas ricas em proteínas produziu espermátóforos com maior conteúdo proteico, enquanto uma dieta exclusivamente à base de carboidratos resultou em uma

redução de 35% na alocação de proteínas (Reyes-Ramírez et al., 2021). Várias espécies do gênero *Poecilimon* (Orthoptera: Gryllidae) produzem espermátóforos com teores de proteínas que chegam a 27% em peso úmido quando consomem exclusivamente sementes, mas mostram uma perda significativa na alocação de proteínas nos espermátóforos após a ingestão de uma dieta menos rica, reduzindo em até 4% a proporção de proteínas alocadas (Wedell, 1994). Tornando assim a disponibilidade de alimentos uma questão central nos sistemas de acasalamento onde os machos contribuem nutritivamente para a reprodução das fêmeas (Albo, 2014).

Em Coccinellidae, muitas espécies realizam cópulas múltiplas (Omkar et al., 2005), estimulando as fêmeas a depositarem mais ovos com o aumento da frequência de cópulas (Omkar & Mishra, 2005). A cópula é energeticamente custosa para os machos, exigindo compensação por meio da ingestão alimentar (Perry & Tse, 2013). Embora os estudos sobre as contribuições masculinas geralmente sejam baseados na medição dos espermátóforos (Perry & Rowe, 2010), o perfil químico dos ejaculados produzidos por Coccinellidae ainda é pouco compreendido, com conhecimento limitado à presença de lipídios, proteínas e carboidratos em indivíduos alimentados com sua presa principal (Fisher, 1959).

Em *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae), as fêmeas exibem alta frequência de cópulas (Jayanthi et al., 2013), e a dieta das fêmeas afeta a reprodução, impactando a maturação ovariana (Santos et al., 2023) e a oviposição (Marques et al., 2015). Da mesma forma, oportunidades reduzidas de cópula resultam em menores taxas de consumo em ambos os sexos, devido à diminuição das demandas reprodutivas para produção de ovos ou dos espermátóforos (Félix et al., 2022). Considerando que a dieta dos adultos afeta o desenvolvimento ovariano em fêmeas, levantamos a hipótese de que ela também influencia a alocação de nutrientes nos espermátóforos produzidos pelos machos.

Para testar essa hipótese, quantificamos os macronutrientes no espermátóforo de *C. montrouzieri* quando alimentados com sua presa principal. Em seguida, testamos a hipótese de que as proporções desses macronutrientes mudariam em machos submetidos à restrição alimentar e em machos alimentados exclusivamente com mel (um alimento suplementar com baixo teor proteico frequentemente testado para joaninhas em condições laboratoriais; ver Sun et al., 2024; Schuldiner-Harpaz & Coll, 2016). Realizamos uma análise bioquímica quantitativa dos macronutrientes utilizando métodos colorimétricos. Finalmente, testamos a hipótese de que a fecundidade e fertilidade das fêmeas seriam reduzidas ao acasalar com machos criados sob restrição alimentar ou alimentados com mel.

4.2 METODOLOGIA

Os adultos foram obtidos na colônia de *Cryptolaemus montrouzieri* estabelecida no Laboratório de Entomologia Aplicada (LEA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os indivíduos foram mantidos sob condições constantes de temperatura e umidade relativa (25 ± 1 °C, $40 \pm 10\%$) e fotoperíodo de 12 horas. Larvas e adultos da colônia de *C. montrouzieri* foram alimentados com fêmeas de *Planococcus citri* (Hemiptera: Pseudococcidae). As colônias de *P. citri* foram mantidas em laboratório e alimentadas com abóboras da variedade "jacarezinho" (*Cucurbita moschata*) adquiridas comercialmente. As larvas de *C. montrouzieri* no último ínstar foram separadas e colocadas individualmente em placas de Petri (8 cm x 1,5 cm). Após a emergência dos adultos (< 24h), os indivíduos foram sexados, e as fêmeas e os machos foram separados individualmente para uso nos experimentos.

4.2.1 Dieta dos adultos

As fêmeas utilizadas nos experimentos foram mantidas com alimentação padrão de fêmeas adultas da cochonilha *P. citri*, *ad libitum*. Os machos foram submetidos a diferentes tratamentos alimentares: 1) Controle: na qual foram alimentados com fêmeas adultas de *P. citri*, *ad libitum*. 2) Restrição Alimentar: duas fêmeas adultas de *P. citri*, a cada dois dias, determinados em testes preliminares para encontrar a quantidade mínima de presa necessária para garantir a sobrevivência dos machos adultos até o final dos experimentos. 3) Mel: não baseados em presas, onde os machos foram alimentados apenas com mel comercial (Apinário Zumbi dos Palmares®; 70Kcal e 18 g de carboidratos por porção de 20 g, com quantidades não significativas de proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans, fibras alimentares e sódio) a 30%, embebido em algodão hidrófilo.

4.2.2 Obtenção dos Espermatóforos

Os machos foram alimentados com as respectivas dietas por um período de 7 dias antes do início dos experimentos. Após o período de alimentação, os machos de diferentes tratamentos foram pareados com fêmeas em recipientes cilíndricos de acrílico (1,9 cm x 3,4 cm) e colocados para copular. Foi considerado uma cópula completa quando o macho inseriu seu edéago na fêmea e permaneceu na posição de cópula por pelo menos 15 minutos antes de se retirar voluntariamente. Caso a cópula não ocorresse durante o período de observação (6 horas consecutivas), os adultos eram separados e pareados novamente após 24 horas. Este procedimento foi repetido três vezes. Fêmeas que não copularam foram descartadas. Ao fim das cópulas completas, parte das fêmeas foram dissecadas para remoção e avaliação bioquímica dos

espermatozóides e outra parte foi isolada novamente em placas de petri para acompanhar a fertilidade e a fecundidade

Para determinar se as dietas poderiam afetar o volume de espermatozóides produzidos pelos machos, foi analisada uma amostra de espermatozóides provenientes de machos alimentados com cochinilhas *ad libitum*, o controle ($0,85 \pm 0,18 \text{ mm}^3$) ($n=8$), submetidos à restrição alimentar ($1,12 \pm 0,19 \text{ mm}^3$) ($n=8$) e alimentados com mel ($1,11 \pm 0,25 \text{ mm}^3$) ($n=3$) (de acordo com De Lima et al., 2022) e comparados. Não foram encontradas diferenças significativas no volume dos espermatozóides entre os tratamentos (teste de Kruskal-Wallis $H_{(2)} = 0,8492$; $P = 0,6745$).

4.2.3 Análise Bioquímica dos Espermatozóides

Para a análise bioquímica quantitativa dos espermatozóides, foram analisadas proteínas totais, utilizando o protocolo de Bradford (1976), e lipídios, glicogênio e açúcares totais, pelo método de Van Handel (1985). Os protocolos foram ajustados para permitir que houvesse leitura, uma vez que são estruturas pequenas e os espermatozóides de *C. montrouzieri* apresentam um volume médio de $3,4 \text{ mm}^3$ (De Lima et al. 2022). Experimentos preliminares foram realizados para encontrar o número mínimo de espermatozóides necessários para leituras precisas. Um *pool* de cinco espermatozóides foi utilizado para cada análise. Cada pool foi considerado uma repetição e cada tratamento teve 10 repetições, totalizando 50 espermatozóides por tratamento.

4.2.3.1 Proteínas Totais

A curva padrão para as análises de proteínas foi padronizada com albumina sérica bovina (BSA) conforme descrito no protocolo de Bradford (1976) (figura 3). As amostras foram analisadas utilizando um espectrofotômetro Kasuaki®, calibrado a uma absorbância de 595 nm e o teor de proteína foi calculado segundo a curva de calibração padrão previamente estabelecida (Apêndice A).

Figura 3: Metodologia Bradford (1976) para análise de proteínas.



Fonte: a autora, criado em BioRender

4.2.3.2 Lipídios, Açúcares e Glicogênio

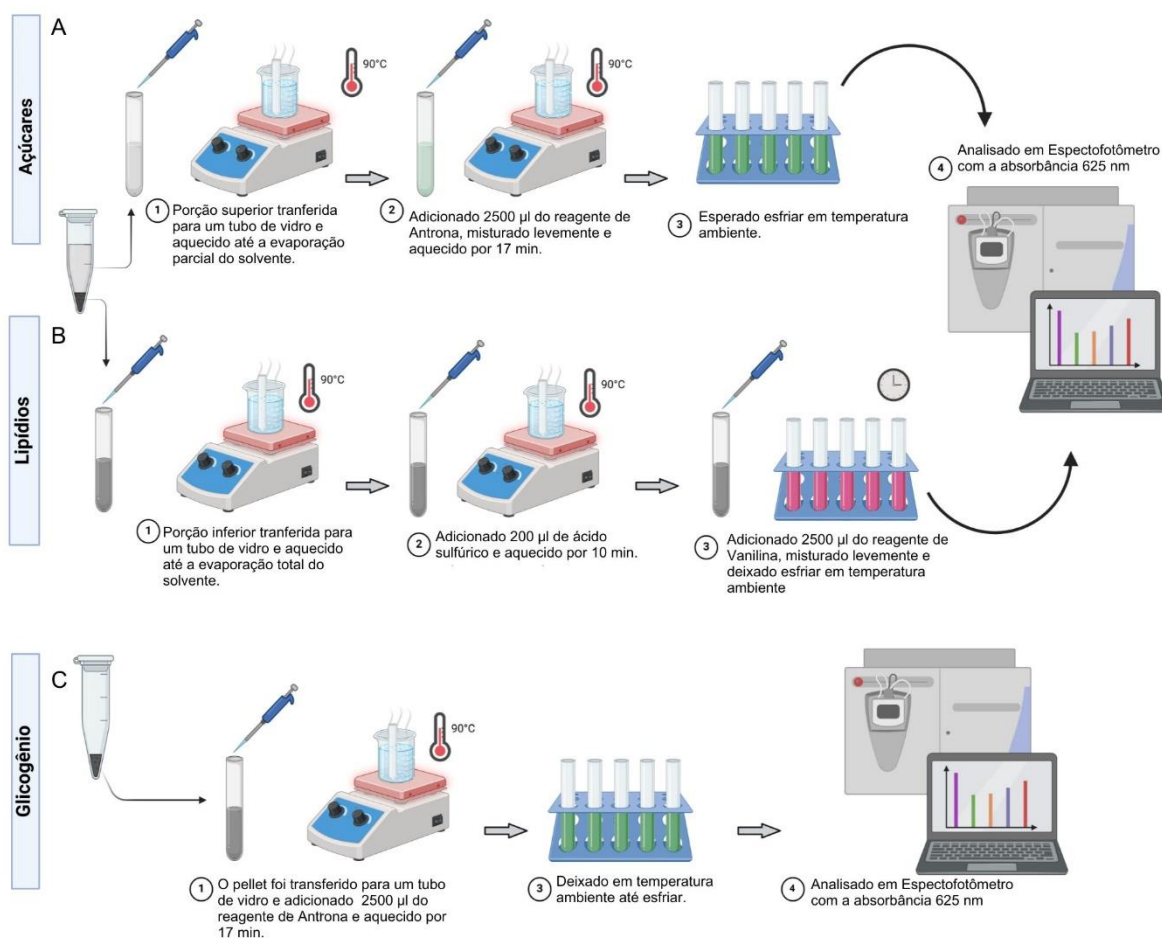
Inicialmente foram realizadas as extrações para separação dos componentes para as análises bioquímicas (Figura 4) e em seguida as quantificações de lipídios (Figura 5B), glicogênio (Figura 5C) e açúcares (Figura 5 A) conforme descrito no protocolo de Van Handel (1985). A curva de calibração para a análise de lipídios foi padronizada com óleo de soja comercial, e a curva de calibração para a análise de glicogênio e açúcares foi padronizada com glicose anidra em água deionizada (Apêndice A).

Figura 4: Método de extração para análise de Lipídios, Glicogênio e Açúcares.



Fonte: a autora, criado em BioRender

Figura 5: Metodologia da análise bioquímica de Lipídios (B), Glicogênio(C) e Açúcares(A).



Fonte: a autora, criado em BioRender

4.2.4 Fecundidade e Fertilidade

Para analisar se a dieta do macho afeta a fecundidade e a fertilidade das fêmeas, machos de cada tratamento (n=30) foram pareados em recipientes cilíndricos de acrílico (1,9 cm x 3,4 cm) e colocados para copular. Após a cópula, os machos foram descartados e as fêmeas foram individualizadas em placas de Petri de acrílico (60 x 15 mm) para ovipositar. A contagem dos ovos começou 24 horas após a cópula. O número de ovos foi contado diariamente por 10 dias para avaliar a fecundidade e estes foram transferidos para novas placas de Petri. As massas de ovos diários foram monitoradas por até cinco dias após a postura, registrando-se a emergência das larvas para avaliar a fertilidade. Ovos que não eclodiram durante este período foram considerados inférteis.

4.2.5 Análise estatística

Os dados foram analisados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk e quanto à homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett. Dados com distribuição normal e variância homogênea foram analisados por ANOVA. Dados que não atenderam a esses critérios foram analisados com ferramentas estatísticas não paramétricas. As quantidades médias de proteínas, lipídios, glicogênio e açúcares entre os tratamentos foram comparadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes. As variações nas quantidades de nutrientes em relação às dietas (controle, restrição e mel) foram comparadas por meio de ANOVA unidirecional para dados homogêneos, seguido pelo teste post-hoc de Tukey, e Kruskal-Wallis para dados heterogêneos (como o glicogênio).

Enquanto os dados de fecundidade atenderam aos critérios de normalidade e foram analisados por ANOVA, seguido pelo teste post-hoc de Tukey. Os dados de fertilidade não atenderam ao pressuposto de normalidade e, portanto, foram analisados utilizando o Modelo Linear Generalizado (GLM) com distribuição de Poisson para dados de contagem. As análises foram realizadas nos softwares estatísticos R (versão 4.1.3) e SPSS (versão 20).

4.3 RESULTADOS

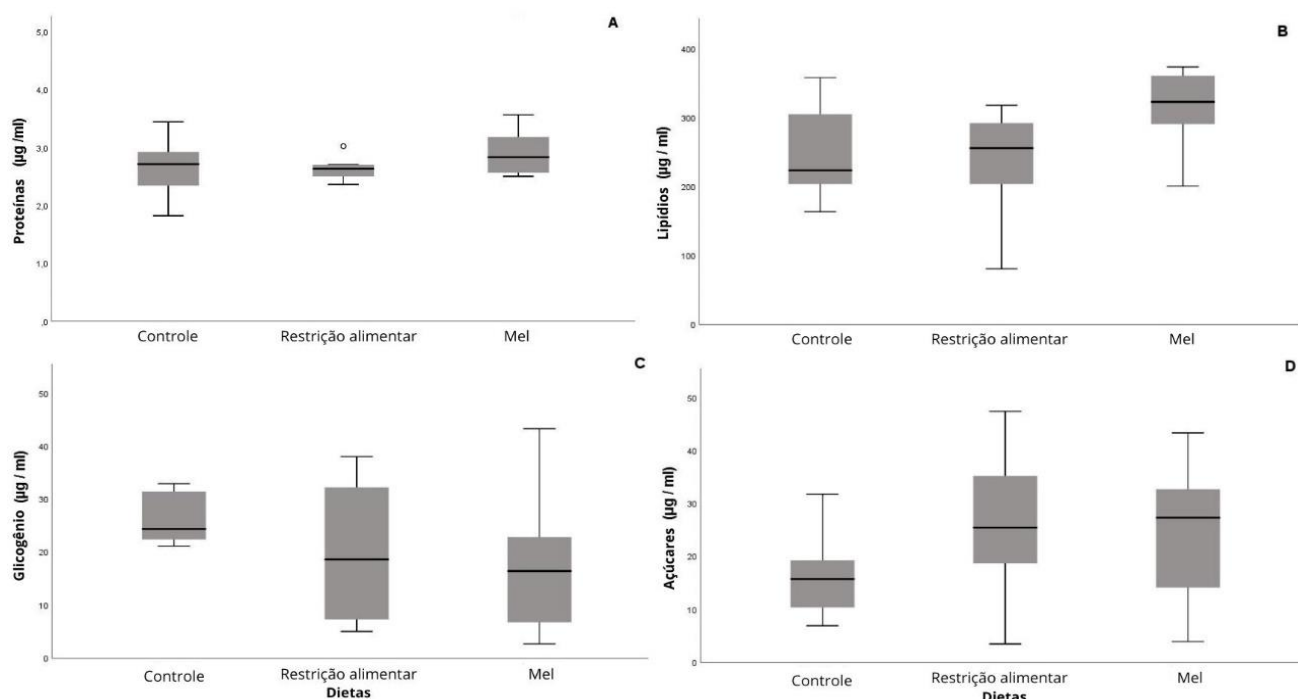
O perfil bioquímico do *pool* de espermatozoides controle de *C. montrouzieri* alimentados com *P. citri ad libitum* foi composto por $248,13 \pm 21,74$ µg/ml de lipídios, $25,93 \pm 1,40$ µg/ml de glicogênio, $16,28 \pm 2,42$ µg/ml de açúcares e $1,37 \pm 0,07$ µg/ml de proteínas, indicando que um único espermatozoide deve apresentar 49,62µg/ml de lipídios, 5,18 µg/ml de glicogênio, 3,25 µg/ml de açúcar e 0,27 µg/ml de proteínas.

A análise comparativa dos espermatozoides de machos submetidos a dietas restritas, pobres em proteínas, e alimentados com mel não revelou diferenças significativas. Machos em dieta restrita alocaram $1,29 \pm 0,05$ µg de proteínas, enquanto machos alimentados com mel alocaram $1,54 \pm 0,13$ µg ($H_{(2)} = 3,026$; $P = 0,2$) (Figura 6 A). Os lipídios foram os compostos mais abundantes, com machos em dieta restrita produzindo $310,27 \pm 20,07$ µg e machos alimentados com mel produzindo $241 \pm 23,60$ µg ($H_{(2)} = 4,942$; $P = 0,8$) (Figura 6 B). Os níveis de glicogênio foram de $20,01 \pm 4,02$ µg para machos em dieta restrita e $17,185 \pm 3,75$ µg para machos alimentados com mel ($F_{(2, 27)} = 1,849$; $P = 0,176$) (Figura 6 C). A alocação de açúcares foi de $25,46 \pm 4,46$ µg para machos em dieta restrita e $25,30 \pm 4,03$ µg para machos alimentados com mel ($F_{(2, 24)} = 2,532$; $P = 0,1005$) (Figura 6 D).

Nos testes de fecundidade e fertilidade, todos os machos submetidos aos diferentes tratamentos dietéticos foram capazes de transferir espermatozoides viáveis. A fecundidade média das fêmeas que acasalaram com machos em dietas restritas ou alimentados com mel não foi significativamente diferente daquelas que acasalaram com machos bem alimentados (GLM $\chi^2 = 33,14$; $P = 0,56$) (Figura 7A). No entanto, as fêmeas que acasalaram com machos alimentados com mel apresentaram menor fertilidade ($H_{(2)} = 10,56$; $P = 0,005$) em comparação às fêmeas que acasalaram com machos alimentados com *P. citri*, independentemente da quantidade oferecida. A fertilidade das fêmeas que acasalaram com machos em dietas restritas não diferiu significativamente daquelas que acasalaram com machos alimentados com *P. citri* ($P = 0,54$; Figura 7B).

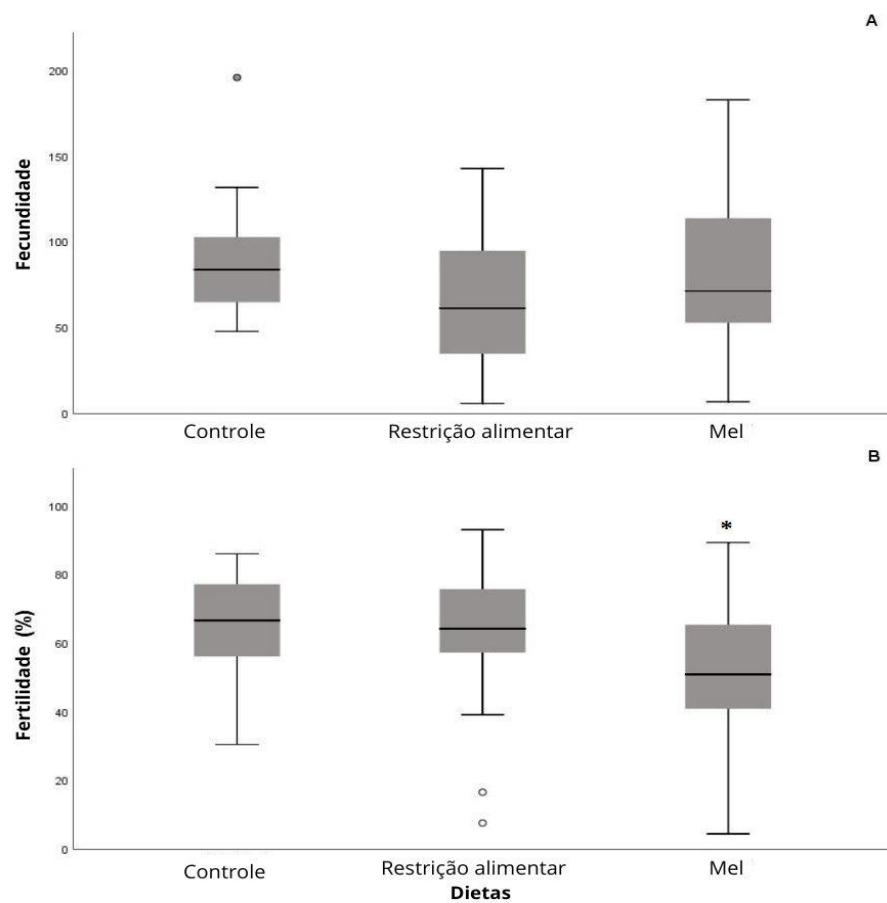
Durante as observações das cópulas, notava-se que as fêmeas demonstraram maior resistência ao acasalamento com machos em restrição alimentar, e os machos alimentados com mel mostraram-se menos ativos em iniciar a cópula, necessitando de mais tentativas para alcançar um acasalamento bem-sucedido.

Figura 6: Níveis de proteínas (A), lipídios (B), glicogênio (C) e açúcares (D) em espermatóforos de *C. montrouzieri* em diferentes regimes alimentares.



Fonte: a autora

Figura 7: Fecundidade (A) e fertilidade (B) de fêmeas de *C. montrouzieri* copuladas com machos submetidos a diferentes regimes alimentares.



Fonte: a autora

4.4 DISCUSSÃO

O perfil bioquímico dos espermatozoides de *C. montrouzieri* revela que os lipídios são o componente mais abundante (representando 85% do volume total), quase dez vezes mais que o glicogênio, a segunda substância mais abundante (8,9%). Em contraste, tanto os açúcares quanto as proteínas são os componentes menos abundantes (5,5% e 0,46%, respectivamente). Dado o papel essencial das proteínas na vitelogênese e na maturação dos ovos na maioria das espécies de insetos (Zhai et al., 1984; Cordero, 1995; Perry & Rowe, 2008), era esperado que elas fossem o principal composto do ejaculado transferido nos espermatozoides. No entanto, em *C. montrouzieri*, os lipídios se destacam como os componentes predominantes no espermatozoide.

Em espécies altamente poliândricas, o conteúdo de proteínas nos espermatozoides pode ser até 15 vezes maior do que em espécies com menores frequências de cópula (Bissoondath & Wiklund, 1995). Entre os besouros, a concentração de proteínas nos espermatozoides de *C. montrouzieri* (0,27 µg/ml) é inferior à de *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) (84,56 ± 5,99 µg/ml) (Murphy & Krupke, 2011) e *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) (255,4 ± 18,2 µg/mm²) (Reyes-Ramírez et al., 2021), ambos conhecidos por transferirem presentes nupciais (Murphy & Krupke, 2011; Drnevich et al., 2001).

Todavia os lipídios representam o maior macronutriente alocado nos espermatozoides para as fêmeas e estão associados à produção de hormônios importantes, incluindo ecdisteróides e hormônio juvenil (Cohen, 2015), sendo cruciais para o desenvolvimento embrionário e a produção de ovos em coccinelídeos (Sloggett & Lorenz, 2008). Com o glicogênio, os lipídios participam de sínteses importantes que desempenham um papel essencial durante as primeiras etapas da clivagem na embriogênese (Fraga et al., 2013) e podem ser uma valiosa fonte energética a ser alocados em espermatozoides, representando uma forma de investimento dos machos (Marshall, 1982). No entanto, em *C. montrouzieri*, as presas são ricas em lipídios e acessíveis nas fases larval e adulta, tornando essa explicação menos plausível.

Os açúcares são utilizados em vias metabólicas para produzir energia em forma de ATP (adenosina trifosfato) e construir moléculas essenciais, participando indiretamente na reprodução. Embora os açúcares possam servir como uma fonte imediata de energia, sua alocação para os espermatozoides como presente nupcial parece improvável, visto que a alocação de lipídios seria mais vantajosa para a reprodução (Marshall, 1982). Proteínas, lipídios e glicogênio são importantes na formação dos ovos nas coccinelídeos (Sloggett & Lorenz, 2008), mas dados experimentais sobre sua alocação nos

espermátóforos e seu papel no desenvolvimento e maturação dos ovos ainda são escassos.

Substâncias produzidas na glândula acessória e alocadas para os espermátóforos podem ter funções não diretamente relacionadas à contribuição nutricional para as fêmeas ou à formação dos ovos, mas podem atuar como sinalizadores que aceleram a produção de ovos (Perry & Rowe, 2008), os quais também podem contribuir para o movimento dos espermatozoides até a espermateca (Katakura, 1985; Obata, 1987). Embora a hipótese de que o conteúdo não espermático auxilia no movimento dos espermatozoides ainda não tenha sido testada experimentalmente, ela parece plausível para *C. montrouzieri*.

Uma vez que nos tratamentos em que os adultos se alimentaram exclusivamente de mel produziram espermátóforos cuja composição de macronutrientes não diferiu significativamente dos produzidos por machos alimentados com *P. citri*, supõe-se que mesmo com uma dieta quase exclusivamente composta por carboidratos, isso não afete a alocação de lipídios, glicogênio e açúcares nos espermátóforos. Isso sugere que a alocação de recursos nos espermátóforos não está ligada nem à quantidade nem à qualidade da dieta consumida pelos machos, indicando que a composição nutricional dos espermátóforos independe do consumo de dietas ricas em carboidratos (honey) ou quando a disponibilidade da dieta é escassa.

O fato de não termos identificado diferença significativa na proporção dos macronutrientes, em especial de proteínas, dos espermátóforos de *C. montrouzieri* com os tipos de dietas testadas na fase adulta podem sugerir que os recursos para sua produção não estejam ligados à alimentação na fase adulta. É possível que, na primeira cópula, adultos consigam formar seus espermátóforos baseados em recursos consumidos somente na fase larval, como ocorre em Lepidoptera (Watanabe & Hirota, 1999). Sabe-se que em *C. montrouzieri* há um comprometimento no desenvolvimento e tamanho do adulto quando há restrição alimentar na fase larval (Xie et al., 2017), e que um desgaste energético continuado na fase larval também compromete o tempo de desenvolvimento e o tamanho do adulto (Silva-Júnior e Pontes, 2024). Se não há restrição alimentar ou desgaste energético durante a fase larval, é possível que essas reservas possam ser usadas para a alocação de recursos na produção dos primeiros espermátóforos, sem utilizar recursos na fase adulta. Contudo, não há ainda evidências de que isso ocorra em Coccinellidae.

Foi observado uma diminuição significativa na fertilidade quando os machos foram alimentados exclusivamente com mel. As proteínas são essenciais para a produção de esperma. Assim, uma dieta composta exclusivamente por alimentos pobres em

proteínas pode ser insuficiente para sustentar a produção adequada de esperma necessária para uma alta fertilidade. A ingestão de proteínas garantida pelo consumo de presas, mesmo em pequenas quantidades, parece assegurar uma produção mínima capaz de fertilizar os ovos, como observado no tratamento de restrição alimentar. Além disso, outros impactos na fertilidade pode estar associado ao consumo de mel durante a fase adulta. Por exemplo: 1) pode afetar a formação do esperma, comprometendo a espermatogênese (Guo & Reinhardt, 2020), 2) pode afetar o desenvolvimento e a maturação da glândula acessória, comprometendo a viabilidade do espermatozoide (Xu et al., 2015), 3) pode influenciar a decisão da fêmea em usar esse espermatozoide (Angelard et al., 2008), e 4) pode afetar a capacidade de fertilização do espermatozoide ou comprometer a viabilidade do embrião (Bunning et al., 2015).

Em populações naturais, tanto os adultos quanto as larvas de *C. montrouzieri* consomem principalmente cochonilhas, que usualmente se encontram de forma abundante e possuem baixa dispersão (Satar & Karacaoğlu, 2017). Teorias preveem que, em ambientes com grandes flutuações nos recursos alimentares e outros recursos nutricionais para a sobrevivência e reprodução das fêmeas, ejaculatórios nutritivos evoluíram como um mecanismo de seleção sexual e para maximizar a reprodução bem-sucedida (South & Lewis et al., 2011; Marshall, 1982). As fêmeas se beneficiariam desses ejaculados ao reduzir os custos de forrageamento para recursos e locais de oviposição (Arnqvist & Nilsson, 2000; Vahed et al., 1998). No entanto, as fêmeas de *C. montrouzieri* não precisam forragear por longas distâncias para acessar uma fonte abundante de nutrientes adequados à reprodução. Mesmo com uma redução no recurso primário devido às flutuações naturais nas populações de presas ou predação por inimigos naturais, *C. montrouzieri* ainda possui uma grande variedade de presas para sustentar seu desenvolvimento (Kairo et al., 2013).

4.5 CONCLUSÃO

Os espermátóforos de *C. montrouzieri* possuem baixo teor de proteínas totais, sendo os lipídios o principal macronutriente alocados em espermátóforos durante a cópula. A dieta do macho na fase adulta não alterou significativamente a composição dos espermátóforos. A fecundidade das fêmeas permaneceu consistente, independentemente da dieta do macho, com uma fertilidade significativamente mais baixa observada ao acasalar com machos alimentados com mel. É possível que a contribuição dos machos não seja via nutrientes alocados em espermátóforos, sendo necessário mais estudos experimentais para testar outras hipóteses associadas a contribuição dos machos na reprodução das fêmeas.

4.6 REFERÊNCIAS

- ALBO, M. J.; TOFT, S.; BILDE, T. Sexual selection, ecology, and evolution of nuptial gifts in spiders. In: Sexual Selection. San Diego: **Academic Press**, 2014. p.183-200.
- ANGELARD, C.; MONTCHAMP-MOREAU, C.; JOLY, D. Female-driven mechanisms, ejaculate size and quality contribute to the lower fertility of sex-ratio distorter males in *Drosophila simulans*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, 2008.
- ARNQVIST, G.; NILSSON, T. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. **Animal Behaviour**, v. 60, n. 2, 2000.
- BISSOONDATH, C. J.; WIKLUND, C. Protein content of spermatophores in relation to monandry/polyandry in butterflies. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 37, n. 6, p. 365-371, 1995.
- BLANCO, C. A.; et al. Size and chemical composition of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) spermatophores. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 102, n. 4, p. 629-637, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BIORENDER, 2024 disponível em: <https://BioRender.com/k12a700>
- BUNNING, H.; et al. Protein and carbohydrate intake influence sperm number and fertility in male cockroaches, but not sperm viability. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1802, p. 20142144, 2015.
- COHEN, A. C. Insect diets: science and technology. **Boca Raton**: CRC Press, 2003.
- CORDERO, C. Ejaculate substances that affect female insect reproductive physiology and behavior: honest or arbitrary traits? **Journal of Theoretical Biology**, v. 174, n. 4, p. 453-461, 1995.
- DE LIMA, C. H.; NÓBREGA, R. L.; FERRAZ, M. L.; PONTES, W. J. Mating duration and spermatophore transfer in *Cryptolaemus montrouzieri* (Coccinellidae). **Biologia**, v. 77, n. 1, p. 149-155, 2022.
- DRNEVICH, J. M.; PAPKE, R. S.; RAUSER, C. L.; et al. Material benefits from multiple mating in female mealworm beetles (*Tenebrio molitor* L.). **Journal of Insect Behavior**, v. 14, p. 215–230, 2001.
- FÉLIX, K. E. S.; et al. No sex, no job: sexual abstinence reduces feeding rates of *Cryptolaemus montrouzieri*. **Bulletin of Insectology**, v. 75, n. 2, p. 293-298, 2022.
- FISHER, T. W. Mass culture of *Cryptolaemus* and *Leptomastix* - natural enemies of citrus mealybug. 1963.
- FRAGA, A.; et al. Glycogen and glucose metabolism are essential for early embryonic development of the red flour beetle *Tribolium castaneum*. **PloS One**, v. 8, n. 6, p. e65125, 2013.
- FRICKE, C.; BRETMAN, A.; CHAPMAN, T. Female nutritional status determines the magnitude and sign of responses to a male ejaculate signal in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 23, n. 1, p. 157-165, 2010.
- GILLOTT, C. Male accessory gland secretions: Modulators of female reproductive physiology and behavior. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 163-184, 2003.
- GREEN, K.; TREGENZA, T. The influence of male ejaculates on female mate search behaviour, oviposition and longevity in crickets. **Animal Behaviour**, v. 77, n. 4, p. 887-892, 2009.

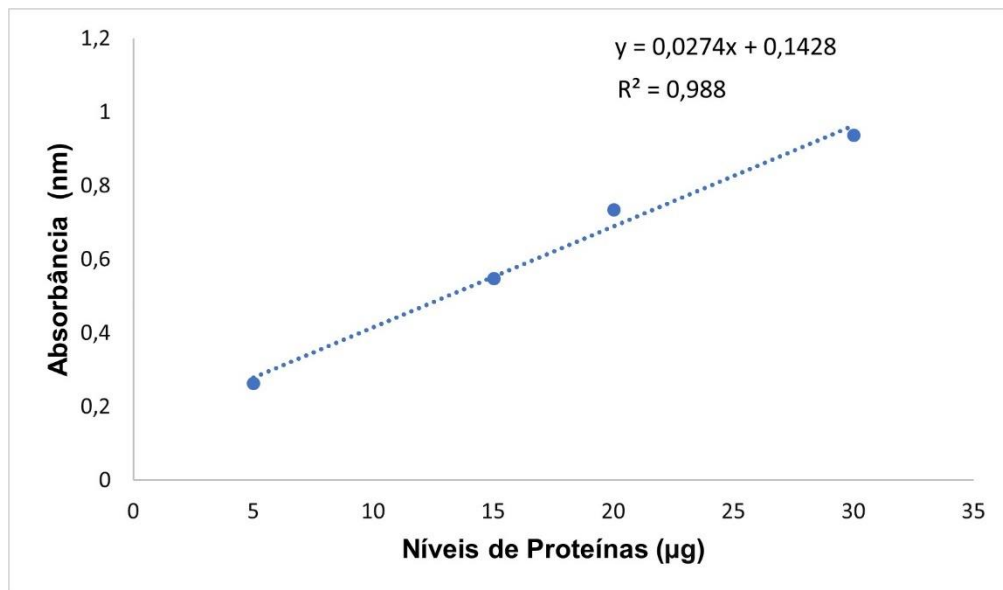
- GUO, R.; REINHARDT, K. Dietary polyunsaturated fatty acids affect volume and metabolism of *Drosophila melanogaster* sperm. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 33, n. 4, p. 544-550, 2020.
- HE, Y.; TSUBAKI, Y. Effects of spermatophore size on female remating in the armyworm, *Pseudaletia separata*, with reference to larval crowding. **Journal of Ethology**, v. 9, n. 2, p. 47-50, 1991.
- HOPKINS, B. R.; AVILA, F. W.; WOLFNER, M. F. Insect male reproductive glands and their products. In: **Encyclopedia of Reproduction**. v. 6, p. 137-144, 2018.
- JAYANTHI, P. D. K.; SANGEETHA, P.; VERGHESE, A. Influence of polyandry on clutch size of the predatory coccinellid, *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae). **Florida Entomologist**, v. 96, n. 3, p. 1073-1076, 2013.
- JIMÉNEZ-PÉREZ, A.; WANG, Q. Effect of mating delay on the reproductive performance of *Cnephasia jactatana* (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 96, n. 3, p. 592-598, 2003.
- KAIRO, M. T. K.; PARAISO, O.; GAUTAM, R. D.; PETERKIN, D. D. *Cryptolaemus montrouzieri* (Mulsant) (Coccinellidae: Scymninae): A review of biology, ecology, and use in biological control with reference to potential impact on non-target organisms. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, 2013.
- KATAKURA, H. Sperm transfer in the potato ladybird *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Coleoptera, Coccinellidae, Epilachninae). **Entomological Review**, v. 53, n. 4, p. 652-657, 1985.
- KAUFMANN, T. Dynamics of sperm transfer, mixing, and fertilization in *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae) in Kenya. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 89, n. 2, p. 238-242, 1996.
- LAUWERS, K.; VAN DYCK, H. The cost of mating with a non-virgin male in a monandrous butterfly: experimental evidence from the speckled wood, *Pararge aegeria*. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 60, p. 69-76, 2006.
- MARCOTTE, M.; DELISLE, J.; MCNEIL, J. N. Effects of different male remating intervals on the reproductive success of *Choristoneura rosaceana* males and females. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 2, p. 139-145, 2007.
- MARQUES, C. E. M.; et al. Evaluation of *Ferrisia dasyllirii* (Cockerell) (Hemiptera: Pseudococcidae) and non-prey foods on the development, reproduction, and survival of *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae). **The Coleopterists Bulletin**, v. 69, n. 2, p. 343-348, 2015.
- MURPHY, A. F.; KRUPKE, C. H. Mating success and spermatophore composition in Western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). **Environmental Entomology**, v. 40, n. 6, p. 1585-1594, 2011.
- MARSHALL, L. D. Male nutritional investment in Lepidoptera: What nutrients should males invest? **The American Naturalist**, v. 120, n. 2, p. 273-279, 1982.
- MARSHALL, L. D. Protein and lipid composition of *Colias philodice* and *C. eurytheme* spermatophores and their changes over time (Pieridae). **Journal of Research on the Lepidoptera**, v. 24, p. 21-30, 1985.
- MCLAIN, D. K.; LANIER, D. L.; MARSH, N. B. Effects of female size, mate size, and number of copulations on fecundity, fertility, and longevity of *Nezara viridula* (Hemiptera: Pentatomidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 83, n. 6, p. 1130-1136, 1990.

- OBATA, S. Mating behavior and sperm transfer in the ladybird beetle, *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). **Applied Entomology and Zoology**, v. 32, n. 1, p. 139-142, 1997.
- OMKAR; MISHRA, G.; SINGH, K. Effects of different wavelengths of light on the life attributes of two aphidophagous ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae). **European Journal of Entomology**, v. 102, n. 1, p. 33-37, 2005.
- OMKAR; MISHRA, G. Mating in aphidophagous ladybirds: costs and benefits. **Journal of Applied Entomology**, v. 129, n. 8, p. 432-436, 2005.
- PÉREZ-RODRÍGUEZ, J. C.; et al. Spermatophore production and sperm quality of the river prawn *Macrobrachium americanum* Spence Bate, 1868 fed with different diets. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 11, p. 3117-3129, 2019.
- PERRY, J. C.; ROWE, L. Ingested spermatophores accelerate reproduction and increase mating resistance but are not a source of sexual conflict. **Animal Behaviour**, v. 76, n. 3, p. 993-1000, 2008.
- PERRY, J. C.; TSE, C. T. Extreme costs of mating for male two-spot ladybird beetles. **Plos One**, v. 8, n. 12, p. e81934, 2013.
- PERRY, J. C.; ROWE, L. Condition-dependent ejaculate size and composition in a ladybird beetle. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 277, n. 1700, p. 3639-3647, 2010.
- POIANI, A. Complexity of seminal fluid: a review. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 60, p. 289-310, 2006.
- REYES-RAMÍREZ, A.; ROCHA-ORTEGA, M.; CÓRDOBA-AGUILAR, A. Dietary macronutrient balance and fungal infection as drivers of spermatophore quality in the mealworm beetle. **Current Research in Insect Science**, v. 1, p. 100009, 2021.
- ROYER, L.; MCNEIL, J. N. Male investment in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae): impact on female longevity and reproductive performance. **Functional Ecology**, p. 209-215, 1993.
- SANTOS, M. L. F.; RODRIGUES-PEDROSA, J.; PONTES, W. J. T. The pre oviposition period is associated with ovary maturation in *Cryptolaemus montrouzieri* Mulsant, 1850 (Coleoptera: Coccinellidae). **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 67, n. 3-4, p. 129-134, 2023. SATAR, S.
- KARACAOĞLU, M. Bioecological characteristics of *Planococcus citri* Risso, 1813 (Hemiptera: Pseudococcidae) under constant and alternating temperatures. **Turkish Journal of Entomology**, v. 41, n. 2, 2017.
- SCOLARI, F. et al. The spermatophore in *Glossina morsitans morsitans*: insights into male contributions to reproduction. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 20334, 2016.
- SILVA-JUNIOR, A. O.; TELES-PONTES, W. J. Larvae of *Cryptolaemus montrouzieri* (Coleoptera: Coccinellidae) Prioritize Secretion of Protective Wax Over Daily Consumption and Growth. **Neotropical Entomology**, v. 53, p. 641-646, 2024.
- SCHULDINER-HARPAZ, T.; COLL, M. Estimating the effect of plant-provided food supplements on pest consumption by omnivorous predators: lessons from two coccinellid beetles. **Pest Management Science**, v. 73, n. 5, p. 976-983, 2016.
- SLOGGETT, J. J.; LORENZ, M. W. Egg composition and reproductive investment in aphidophagous ladybird beetles (Coccinellidae: Coccinellini): egg development and interspecific variation. **Physiological Entomology**, v. 33, n. 3, p. 200-208, 2008.
- SOUTH, A.; LEWIS, S. M. The influence of male ejaculate quantity on female fitness: a meta-analysis. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 86, n. 2, p. 299-309, 2011.

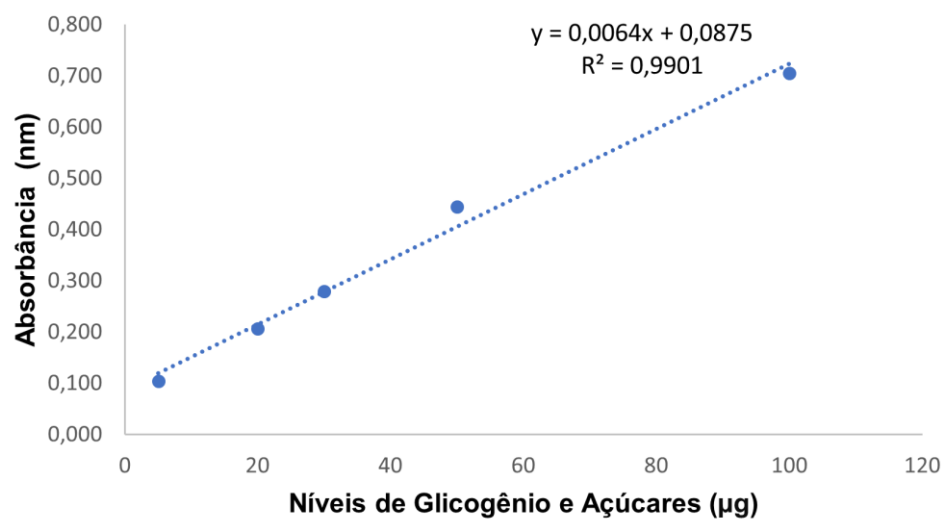
- STURM, R. Comparison of sperm number, spermatophore size, and body size in four cricket species. **Journal of Orthoptera Research**, p. 39-47, 2014.
- SUN, Y. X.; CHEN, M. J.; HAO, Y. N.; WANG, S. S.; ZHANG, C. L. Canola bee pollen is an effective artificial diet additive for improving larval development of predatory coccinellids: a lesson from *Harmonia axyridis*. **Pest Management Science**, v. 80, n. 6, p. 2920-2928, 2024.
- VAHED, K. The function of nuptial feeding in insects: a review of empirical studies. **Biological Reviews**, v. 73, n. 1, p. 43-78, 1998.
- VAN HANDEL, E. et al. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 1, n. 3, p. 302-304, 1985.
- WAGNER JR, W. E. et al. Females receive a life-span benefit from male ejaculates in a field cricket. **Evolution**, v. 55, n. 5, p. 994-1001, 2001.
- WATANABE, M.; HIROTA, M. Effects of sucrose intake on spermatophore mass produced by male swallowtail butterfly *Papilio xuthus* L. **Zoological Science**, v. 16, n. 1, p. 55-61, 1999.
- WEDELL, N. Spermatophore size in bushcrickets: comparative evidence for nuptial gifts as a sperm protection device. **Evolution**, v. 47, n. 4, p. 1203-1212, 1993.
- WEDELL, N. Variation in nuptial gift quality in bush crickets (Orthoptera: Tettigoniidae). **Behavioral Ecology: Official Journal of the International Society for Behavioral Ecology**, v. 5, n. 4, p. 418-425, 1994.
- WEDELL, N. et al. Sexual conflict and life histories. **Animal Behaviour**, v. 71, n. 5, p. 999-1011, 2006.
- XIE, J. et al. An artificial diet containing plant pollen for the mealybug predator *Cryptolaemus montrouzieri*. **Pest Management Science**, v. 73, n. 3, p. 541-545, 2017.
- XU, J.; ANCIRO, A. L.; PALLI, S. R. Nutrition regulation of male accessory gland growth and maturation in *Tribolium castaneum*. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 10567, 2015.
- ZHAI, Q.; POSTLETHWAIT, J. H.; BODLEY, J. W. Vitellogenin synthesis in the lady beetle *Coccinella septempunctata*. **Insect Biochemistry**, v. 14, n. 3, p. 299-305, 1984.

APÊNDICE A – CURVA PADRÃO DAS ANÁLISES BIOQUÍMIAS

1- Curva padrão para análises de proteínas



2- Curva Padrão para análise de Glicogênio e Açúcares



3- Curva Padrão para análise de Lipídios.

