

DIEGO ANDRES BOLIVAR SILVA

**BIOLOGIA REPRODUTIVA DE JOANINHA (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE):
COMPORTAMENTO E MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título *Doctor Scientiae*.

Orientador: José Lino Neto

Coorientador: Raul Narciso Carvalho Guedes

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2020

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

B689c
2020 Bolivar Silva, Diego Andres, 1990-
Biologia reprodutiva de joaninha (Coleoptera:
Coccinellidae) : comportamento e morfologia do sistema
reprodutor / Diego Andres Bolivar Silva. – Viçosa, MG, 2020.
54 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Lino Neto.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Joaninha (Inseto) - Comportamento. 2. Joaninha (Inseto)-
Reprodução. 3. Anatomia. 4. Histologia. I. Universidade Federal
de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa de
Pós-Graduação em Entomologia. II. Título.

CDD 22. ed. 595.769

DIEGO ANDRES BOLIVAR SILVA

BIOLOGIA REPRODUTIVA DE JOANINHA (COLEOPTERA: COCCINELLIDAE):
COMPORTAMENTO E MORFOLOGIA DO SISTEMA REPRODUTOR

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de fevereiro de 2020

Assentimento:



Diego Andres Bolivar Silva
Autor



José Lino Neto
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de aperfeiçoamento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia da UFV, em especial o coordenador, professor Dr. Simon Luke Elliot, e a secretária, Eliane, pela competência e profissionalismo.

A todos professores do Programa de Entomologia e Biologia Celular e Estrutural pelos ensinamentos durante as disciplinas, especialmente aqueles que muito contribuíram para minha formação.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Lino Neto, pelo aceite em me orientar, pelo aprendizado, ajuda, orientação, paciência, pelas dicas, pelos momentos de orientação acadêmica, emocional, pelo compartilhamento da sua sabedoria e ser uns dos melhores professores e pessoas que eu já conheci.

Ao Professor Dr. Raul Guedes, pela disponibilidade durante meu processo no mestrado e no doutorado.

Ao Professor Dr. Khalid pela sua ajuda durante o mestrado e doutorado, e todas suas orientações pessoais e acadêmicas.

Ao Professor Dr. Eugenio, pela disponibilidade do seu laboratório para me disponibilizar ajuda e insetos, pelo que me ensinou e me ajudou a madurecer como pessoa e profissional.

Aos professores membros da banca, Dr. Wagner Faria Barbosa, Dr. Luis Carlos Martinez Castrillón, Dra. Glenda Samara Dias Santos, e Professora Dra. Uyrá dos Santos Zama pela disponibilidade em contribuir com meu trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Ultraestrutura Celular, Camila, Glenda, Shaiane, por tornarem o ambiente do laboratório um lugar divertido onde além de aprender do acadêmico, também se aprende da vida.

A mis padres, Gilberto Bolívar y Myriam Silva porque sin ellos no hubiera llegado

donde estoy ahora, por su amor incondicional, su paciencia y sabiduría. Por enseñarme que la vida no es fácil, pero con amor y la unidad familiar se puede venir el mundo encima, pero se puede enfrentar con toda y superar cualquier obstáculo. Los amo infinitamente y todas las palabras se quedan cortas para expresar todo este Aleph de amor que siento por ustedes.

A mis hermanos Oscar Bolívar (toquer) y Sindy Bolívar (cara de pez 1), por todo y por más, simplemente no puedo imaginar una vida sin ustedes. Amor infinito para los dos. Son mi ejemplo por seguir.

A Paulo Londra, porque ha sido de las personas con más corazón que he conocido. Logró sin saberlo, entrar en mi corazón como parte de mi familia. Gracias por cada instante que compartió conmigo.

A mi primo Daniel Uribe y mis amigos Harol, Sebastian, Adrian, Carlos. Apoyo incondicional, ayuda anímica y combustible para días grises.

A Clara Mendoza, que me ayudó forjar mi carácter haciéndome sentir tan miserable y de tan poco valor que llegué al fondo del pozo de mí dolor, de mi locura y demencia. Gracias por enseñarme que a veces el amor que se entrega no es recíproco y que las personas pueden utilizarnos, succionarnos y alimentarse de los restos de nuestras ilusiones, esperanzas, de lo mínimo que queda, luego tomar vuelo y desaparecer, como lo hacen los cuervos.

RESUMO

BOLIVAR-SILVA, Diego Andrés, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Biologia reprodutiva de joaninha (Coleoptera: Coccinellidae): comportamento e morfologia do sistema reprodutor.** Orientador: José Lino Neto. Coorientador: Raul Narciso Carvalho Guedes.

A família Coccinellidae é um dos grupos mais importantes dentro dos coleópteros, possuem o maior número de espécies descritas. Este trabalho tem como objetivo fornecer informação importante para o grupo dos coccinélídeos em aspectos que vão desde a morfologia até o comportamento reprodutivo. Foi analisado os efeitos da maturação sexual para as populações resistentes e suscetíveis da espécie *E. connexa*. Também se realizou uma descrição detalhada da anatomia e histologia do sistema reprodutor masculino e feminino de *E. connexa*. Finalmente, se realizou uma descrição anatômica do sistema reprodutor da espécie nativa *Coleomegilla maculata* e a invasora *Harmonia axyridis*, com o fim de estabelecer semelhanças e diferenças entre e obter informação que contribui a explicar a sucesso adaptativo de *H. axyridis* na América. Os resultados sugerem que as populações resistentes de *E. connexa* possuem maturação sexual precoce e potencialmente maior sucesso reprodutivo. Para esta espécie também foi descrita a anatomia do sistema reprodutor masculino o qual apresenta glândulas acessórias como ocorre nos besouros em geral. Ainda, a média de 15 ovários por ovário, bem maior do que foi descrita para esta espécie. O maior número de folículos e ovários de *H. axyridis*, e a presença de glândulas no final do oviducto comum, indicaria uma vantagem na capacidade de colonizar ambientes e seu alto desempenho reprodutivo.

Palavras-chave: Comportamento. Reprodução. Resistente. Suscetível. Histologia. Anatomia.

ABSTRACT

BOLIVAR-SILVA, Diego Andrés, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Reproductive biology of ladybug (Coleoptera: Coccinellidae): behavior and morphology of the reproductive system.** Advisor: José Lino Neto. Co-advisor: Raul Narciso Carvalho Guedes.

The Coccinellidae family is one of the most important groups within the coleopterans, they have the largest number of described species. This work aims to provide important information to the coccinellid group in aspects ranging from morphology to reproductive behavior. The effects of sexual maturation on resistant populations of the *Eriopis connexa* species were analyzed. A detailed description of the anatomy and histology of the male and female reproductive system of *E. connexa* was also carried out. Finally, an anatomical description of the reproductive system of the native species *Coleomegilla maculata* and the invasive *Harmonia axyridis* was carried out, to establish similarities and differences between and obtain information that contributes to explain the adaptive success of *H. axyridis* in America. The results suggest that resistant populations of *E. connexa* have early sexual maturation and potentially greater reproductive success. For this species, the anatomy of the male reproductive system has also been described, which presents accessory glands as occurs in beetles in general. Still, the average of 15 ovarioles per ovary, much higher than that described for this species. The greater number of follicles and ovaries of *H. axyridis*, and the presence of glands at the end of the common oviduct, would indicate an advantage in the ability to colonize environments and their high reproductive performance.

Keywords: Behavior. Reproduction. Resistant. Sustainable. Histology. Anatomy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	8
REFERÊNCIAS	11
2 CAPITULO 1	12
Early sexual maturation can mitigate reproductive costs in <i>Eriopis connexa</i>	12
3 CAPÍTULO 2	28
Redescrição do sistema reprodutor masculino e feminino de <i>Eriopis Connexa</i> (Germar, 1823) (Coleoptera: Coccinellidae)	28
4 CAPÍTULO 3	44
Anatomia dos sistemas reprodutores <i>Coleomegilla maculata</i> e <i>Harmonia axyridis</i> (Coleoptera: Coccinellidae).....	44
5 CONCLUSÕES	54

1 INTRODUÇÃO GERAL

A família Coccinellidae é um dos grupos mais importantes dentro dos coleópteros, possuem o maior número de espécies descritas com aproximadamente 6000 espécies e ao redor de 360 gêneros ao redor do mundo (Nedvěd e Kovár, 2012). Entre as características anatômicas que distinguem o grupo, podem se agrupar pela combinação de: cinco pares de espiráculos abdominais, ponte tentorial ausente, ramos tentoriais anteriores separados, ramos tentorial anteriores separados, cavidades procoxais aberto posteriormente, segmento apical dos palpos maxilares nunca como agulha, fórmula tarsal 4 - 4 - 4 ou 3 - 3 - 3, segmento tarsal 2 geralmente fortemente dilatado, 4 - 4 - 4 ou 3 - 3 - 3, segmento tarsal 2 geralmente fortemente dilatado, entre outros (Nedvěd e Kovár, 2012).

Este grupo possui diversas características que permitem utilizá-los como um importante modelo para o controle biológico, além de serem um grupo que ocorre em diferentes habitats ao redor do planeta (Honk e Hodek, 1996). Espécies do gênero *Eriopis* Mulstant, 1850, as quais ocorrem naturalmente em regiões da América do Sul, se destacam devido a sua grande importância econômica, e são comumente usadas, devido a seu hábito predador, para o controle de pragas (Rodrigues et al., 2013a,b; Torres et al, 2015). Embora estes coccinelídeos sejam importantes para o manejo de pragas em culturas como algodão, soja ou cítricos (Dixon e Kindlmann, 1998), ocorrem também espécies invasoras se tornam invasivas e são uma ameaça para espécies nativas. Por exemplo, *Coccinella septempunctata* L. e *Harmonia axyridis* (Pallas), espécies introduzidas na América para o controle de pulgões, se tornaram colonizadoras agressivas de diferentes ambientes e conseguiram competir com populações de joaninhas americanas gerando um impacto negativo nestas espécies nativas (Koch et al, 2003).

Ao observar as relações filogenética do grupo, a monofila da família é bem suportada. Porém, existe uma ampla variação dependendo dos autores e das formas utilizadas para definir os grupos. Sasaji (1968) considerou seis subfamílias (Chilocorine, Coccidulinae, Coccinellinae, Epilachninae, Scymninae e Sticholotinae), enquanto Kovár (1996) reconheceu sete subfamílias, adicionando Ortaliinae. Já Seago et al. (2011) acharam que não há justificativa para distribuir os coccinelídeos em seis subfamílias como tradicionalmente tem sido e propuseram apenas duas:

Microweisinae Leng 1920 e Coccinellinae Latreille, 1807. De qualquer modo, desde o estabelecimento de Coccinellidae, diversos sistemas de classificação têm sido propostos, porém ainda não existe consenso sobre as relações entre suas principais linhagens (Ślipiński 2007; Seago et al. 2011). Um estudo robusto sobre a filogenia e suas relações ao nível de família que esteja suportado com dados tanto genéticos quanto morfológicos, permite entender estudos relacionados como são estratégias de histórias de vida, semioquímicos, comportamento reprodutivo, interações y aspetos ecológicos que apesar de terem bastantes trabalhos realizados, ficam curtos por falta da precisão neste ramo evolutivo (Dixon, 2000).

A descrição e caracterização da genitália de machos e fêmeas é uma ferramenta importante para estudos de filogenia e, em sua maioria em trabalhos taxonômicos. Essas estruturas são uma ferramenta importante para análises taxonômicas além de ajudar a compreender adaptações e ciclos de vida das espécies (Bilinski, 1998). De forma geral, a anatomia interna do sistema reprodutor deste grupo para os machos é conformada por formado por um par de testículos composto por folículos, estes testículos se ligam aos vasos deferentes e ao ducto ejaculatório e na parte posterior se une ao aedeagus. O sistema reprodutor feminino, é conformado por um par de ovários compostos por ovariolos, ligados ao oviducto comum. Possui também uma espermateca simples, pequena e com o ducto espermatecal curto. Para a espécie *Eriopis connexa*, já existe uma descrição do sistema reprodutor tanto para macho quanto para fêmea (Maffei et al. 2001), porém, é necessária uma descrição mais detalhada de cada sistema reprodutor no nível anatômico e histológico.

As espécies do gênero *Eriopis* Mulstant, 1850, ocorrem na América do Sul, sendo um grupo significativamente importante pela sua importância econômica e serem usadas em programas de controle biológico devido ao seu hábito predador (Rodrigues et al., 2013a, b; Torres et al., 2015). Dentro deste gênero, *Eriopis connexa* é uma espécie predadora de afídeos utilizada para o controle biológico em agroecossistemas. Devido ao uso de pesticidas, nesta espécie, foram geradas populações resistentes ao piretróide lambda-cialotrina. trabalhos relacionados com efeitos sob doses subletais, desenvolvimento, reprodução, taxas de mortalidade, número de ovos por postura e crescimento populacional já foram realizados (D'Ávila et al., 2018; Rodrigues et al., 2013a; Torres, 2012). Embora exista informação bem

documentada nesta população resistente, ainda não são conhecidos os efeitos da resistência na maturação sexual para esta população.

Este trabalho tem como objetivo fornecer informação importante para o grupo dos coccinélídeos em aspectos que vão desde a morfologia até o comportamento reprodutivo. Primeiro, analisar quais são os efeitos da maturação sexual para as populações resistentes da espécie *E. connexa* em termos de maturação da vesícula seminal, cópula e características morfológicas do espermatozoide. Adicionalmente, realizar uma descrição detalhada da anatomia e histologia do sistema reprodutor masculino e feminino de *E. connexa*, espécie importante no manejo de pragas. Finalmente, fazer uma descrição anatômica do sistema reprodutor da espécie nativa *Coleomegilla maculata* e a invasora *Harmonia axyridis*, com o fim de estabelecer semelhanças e diferenças entre elas e fornecer informação que contribui a explicar a sucesso adaptativo de *H. axyridis* na América.

REFERÊNCIAS

- D'Ávila V.A., Barbosa W.F., Reis L.C. 2018. Lambda-cyhalothrin exposure, mating behavior and reproductive output of pyrethroid-susceptible and resistant lady beetles (*Eriopis connexa*). *Crop Prot* 107, 41–47.
- Dixon, A.F.G., Kindlmann, P. 1998. Generation time ratio and the effectiveness of ladybirds as classical biological control agents. In: Zalucki, M.P., Drew, R.A.I., White, G.G. (Eds.), *Proceedings of the Australasian Applied Entomological Research Conference 1*, 314–320.
- Dixon, A.F.G. 2000. *Insect Predator-Prey Dynamics. Ladybirds and Biological Control*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Honk, I., Hodek, A., 1996. Distribution in habitats. In: Hodek, I., Honk, A. (Eds.). *Ecology of Coccinellidae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 95–141.
- Jaglarz, M.K., Bilinski, S.M. 1998. Organization of the egg chambers in Hydradephaga (Insecta, Coleoptera-Adephaga) and its phylogenetic significance. *Folia Biologica*. 46, 55–60.
- Koch, R.L., Hutchinson, W.D., Venette, R.C., Heimpel, G.E. 2003. Susceptibility of immature monarch butterfly, *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Nymphalidae: Danainae) to predation by *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Biol. Control* 28, 265–270.
- Maffei, E., Fragoso, D., Pompolo, S. & Serrão, J. (2001). Morphological and Cytogenetical Studies On the Female and Male Reproductive Organs of *Eriopis connexa* Mulsant (Coleoptera, Polyphaga, Coccinellidae). *Netherlands Journal of Zoology*, 5, 483–496.
- Nedvěd, O. & Kovář, I. (2012). *Phylogeny and Classification. Ecology and Behaviour of the Ladybird Beetles (Coccinellidae)*, First Edition. I. Hodek, H.F. van Emden, A. Honeřk. 1–12.
- Rodrigues, A.R.S., Spindola, A.F., Torres, J.B., Siqueira, H.A.A. & Colares, F. (2013a). Response of different populations of seven lady beetle species to lambda-cyhalothrin with record of resistance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 96, 53–60.
- Rodrigues, A.R.S., Torres, J.B., Siqueira, H.A.A. & Lacerda, D.P.A. (2013b). Inheritance of lambda-cyhalothrin resistance in the predator lady beetle *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Control* 64, 217–224
- Seago A.E., Giorgi J.A., Li J., Ślipiński A. (2011). Phylogeny, classification and evolution of ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae) based on simultaneous analysis of molecular and morphological data. *Mol. Phylogenetic Evolution*. 60, 137–351.
- Sasaji H. 1968. Phylogeny of the family Coccinellidae (Coleoptera). *Etizenia, Occasional Publications of the Biological Laboratory, Fukui University*, 35, 1–37.

2 CAPITULO 1

Early sexual maturation can mitigate reproductive costs in *Eriopsis connexa* (Germar, 1824) resistant to lambda-cyhalothrin.

Early sexual maturation can mitigate reproductive costs in *Eriopsis connexa* (Germar, 1824) resistant to lambda-cyhalothrin.

Highlights

- Insecticide-resistance can affect reproduction in insects
- *Eriopsis connexa* overcomes the metabolic resistance cost by advancing reproductive maturation.
- Copulation frequency is greater in resistance populations than susceptible ones in earlier ages

Abstract

The appearance of insecticide-resistant insect populations is a consequence of the intense application of agrochemicals for pest control. The use of the pyrethroid lambda-cyhalothrin for pest control in crops carries a serious problem due to the exposure of natural predator populations to this compound. *Eriopsis connexa* is one of the most important species for aphid control and occurs naturally in several economically important crops such as cotton, soy and wheat. In Brazil, there are populations of *E. connexa* metabolically susceptible or resistant to lambda-cyhalothrin, and nothing is yet known about the effects of resistance on male sexual maturation of this species. The main aim of this work was to describe sperm anatomy and sexual maturation in adult males from lambda-cyhalothrin-resistant (Ec-R) and susceptible (Ec-S) populations of adult *E. connexa* to know the mechanisms that mitigate the reproductive costs due to resistance. The development of seminal vesicles and the sperm morphometry were evaluated at 1, 3, 5, 10 and 15 days after emergence of males from both populations. Mating and female preference assays were performed in males at different ages. Males of the Ec-R population had earlier development of seminal vesicles (by sperm arrival) than males of the Ec-S population. The sperm of both populations showed no difference in total or nucleus length. Newly emerged Ec-R males showed higher frequency of mating than Ec-S. No preference was observed for females to mate with Ec-R or Ec-S. The results suggest that, due to faster sexual maturation and higher frequency of early mating among Ec-R individuals, this population potentially presents greater reproductive success, therefore suitable for biological control of aphids.

Keywords: Coccinellidae, biological control, copulation, morphology, seminal vesicles.

Introduction

Natural enemies are considered of great importance for crop pest control (Cornell and Hawkins 1995; Symondson et al. 2002) and one of the most prominent species for natural control of several aphid species in a wide variety of crops belong to the family Coccinellidae (Obrycki et al. 2009). As with pest insects, repeated exposure to pesticides may also select resistant populations of natural enemies (Rodrigues et al. 2013a). In the world, 80 species of beetles have become resistant to one or more insecticides, 10 of them existing in Brazil (Mota-Sanchez and Wise, 2019).

Ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae) are usually used to pest control in a wide variety of crops (eg. rice, sorghum, soybeans and wheat) (Rodrigues et al., 2013; Costa et al., 2017; Obrycki et al., 2009). *Eriopis connexa* (Germar) is an important aphid predator and commonly used as a biological control agent in agroecosystems (Rodrigues et al., 2013b; Torres et al., 2015). Due to pesticide use in crops, resistant populations have been selected in this species, which include resistance to the lambda-cyhalothrin pyrethroid (Rodrigues et al., 2013a; Torres, 2012). The main regulating mechanism of this phenomenon in this species is the metabolic detoxification mediated by cytochrome P450 dependent-monoxygenase (Rodrigues et al., 2014). It has been reported that the reproductive performance of the susceptible population of *E. connexa* decreased under sublethal exposure to lambda-cyhalothrin, but the resistant population performance was less affected under this condition (D'Ávila et al., 2018). However, these authors noted that there is a reproductive cost associated with this trait when in the absence of the insecticide. Without the application of lambda-cyhalothrin, females from the resistant population had lower number of eggs, reproduction rate and longevity than the susceptible ones, which displays adaptive costs. However, a controversial study did not show an adaptive cost for these features (Santos et al., 2016).

Despite the existing literature information on behavior, biology, reproductive system morphology and sperm for *E. connexa* (Maffei et al., 2001; Dallai et al., 2018; D'Ávila et al., 2018), there are no studies yet for reproductive maturation between insecticide-resistant and susceptible populations. Thus, the aim of this study was to analyze whether there are natural differences in the reproductive development and

sexual maturity (development in VS size) of males from both insecticide- resistant and susceptible populations.

Material and methods

Insects

The resistant (Ec-R) and susceptible (Ec-S) populations of *E. connexa* were obtained, respectively, from field collection in Viçosa (20°45'S and 42°51'W, Minas Gerais State, December 2008), and in cotton crops in Frei Miguelinho (07°55'S and 35°51'W, Pernambuco State, July 2009). Topical application of lambda-cyhalothrin based on the lethal concentration 50% (LC₅₀) was used to characterize both Ec-R and Ec-S populations (Rodrigues et al., 2013b), which were kept separately in the Laboratório de Ecofisiologia e Ecotoxicologia at the Universidade Federal de Viçosa (UFV) under controlled conditions of temperature (25 ± 2 °C), relative humidity (70 ± 5%), and photoperiod (12:12 h L:D). Insects were fed *ad libitum* with *Anagasta* (Lepidoptera: Pyralidae) eggs and a mixture of sugar and water was also eventually provided to adults to increase reproduction (Rodrigues et al., 2013c; Rodrigues et al., 2016). To keep insecticide-resistance in Ec-R, this population was periodically exposed to lambda-cyhalothrin (Torres et al., 2015). In the bioassays, the insects were sexed using the shape of abdomen, which is larger in females (Maffei, 2001).

Development of seminal vesicles

The age at which sperm arrives in the seminal vesicles (SV) and the variation in his area over sexual maturity were evaluated in adult males at 1, 3, 5, 10 and 15 days after emergence. Five individuals were used per each age in both populations, totaling 100 SV. Which were fixed in 2.5% glutaraldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2 for 24 h. They were then photographed with a camera (AxioCam MRc) attached to a stereoscope (Zeiss Discovery V-20). The measurements of the VS area were obtained by calibrating the scale in the program, then solid lines were placed on the edge of the SV and the area was verified by the number of pixels within that area.

This measurement was made with ImageJ 1.51k software (available in <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Spermatozoa

Six adult insects from each population were dissected in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) and the SV were extracted and disrupted to obtain a sperm solution, which was used to measure the total length of sperm and nuclei. Drops of the solution were placed on histological slides and the sperm spread by smear technique. Before the slides dried completely, they were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, for 10 min, and then were washed with distilled water and left at room temperature to dry completely. Finally, slides were stained with Giemsa for 15 minutes and washed, respectively, in running water and distilled water; then they were dried at room temperature. Images were obtained using an Olympus BX-60 (40x objective) light microscope with an attached Olympus Q-Color3 digital camera. For each individual, 50 sperm without any observable damage were measured using ImageJ 1.51k software.

To obtain the nuclei length, some slides were stained with 0.2 mg/ml of 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) for 20 min, and then washed in distilled water and the coverslips mounted with 50% sucrose in water. Nuclei of 40 sperm were photographed using epifluorescent illumination (BP360–370 excitation filter) under the microscope copled with a digital camera as describe above. The measurements were obtained also using the ImageJ software.

Mating tests

Mating bioassays were carried out to assess the performance of males from both Ec-R or Ec-S populations in the time spent to search for their sexual partner and the duration of copulation with Ec-S females. Thus, Each Ec-S or Ec-R adult male was placed with an sexually mature Ec-S female (10 days emergency) in a arena made of Petri dish (9 cm diameter and 2 cm high), which was covered with filter paper disc at the bottom and PTFE teflon (DuPont, Wilmington, DE, USA) at the internal side

(Morales et al., 2013). Ten males at 3, 5 and 10 days after emergence were used from both Ec-R and Ec-S populations.

The mating behavior of each couple in the arena was digitally recorded for two hours using a CCD camcorder (Guedes et al., 2009). The parameters evaluated were: (1) the time elapsed between the release of couples in the arena and the beginning of the mating, this period is defined as pre-copulation, and (2) the duration of the mount, which was considered to be over when the male descended from the female's abdomen. Mount attempts were not considered. After mating, each female was separated from the male and kept isolated until the first oviposition under controlled conditions described above; then the eggs were maintained in petri dishes until the emergence of the first larvae confirming the success of the copulation.

Preference tests

The preference of either Ec-S or Ec-R female for mating males from both Ec-S and Ec-R populations was also tested. The preference test was carried out by placing a female (from either Ec-S or Ec-R population) together with males from both populations (one from Ec-R population and another from Ec-S one) in a Petri dish arena as described above. Males from each population were marked with blue or red ink to identify them. Pre-tests were made to check the interference of the ink with partner or mount behaviors and no interference was detected. Colors were swapped between Ec-R and Ec-S males in half of the arenas for females from both populations. The mating preference experiment was also recorded using a CCD camcorder (Guedes et al., 2009). Twenty repetitions were used for each test setup, and the recording was completed when the first mount ended. The success of the copulas was verified by monitoring the egg laying and the hatching of the first larvae as it was done in mating tests.

Statistical analysis

Normality was evaluated for variables of SV area, and lengths of sperm and nucleus. Subsequently, the SV area data were subjected to the t-test and sperm and

nuclei lengths were submitted to the Mann-Whitney test. The pre-copulation time was analyzed using the Log-Rank test, and Kaplan-Meier estimators were used to obtain survival curves. Female preference data was analyzed using χ^2 test. All the analyzes were carried out in the SigmaPlot 12.5 program (Systat, San Jose, California, USA), except to female preference data, for which was used the procedure Proc Genmod in SAS software (SAS Institute, Cary, NC, USA). All statistical analyses were performed considering a significant level of 0.05.

Results

Development of seminal vesicles (SV)

In *E. connexa*, SV showed elongated shape, flattened ends and minimal amount of sperm (pearly area) on the 1st day after adult emergence. However, a progressive increase in the amount of sperm and in the SV were observed from the 1st day after emergence (Fig. 1). On the 3rd day after emergence, Ec-R males had SV considerably larger than Ec-S ones ($t_{38} = 3.234$, $P = 0.003$; Fig. 2). There was no significant difference in SV size between Ec-S and Ec-R males on the 1st ($U = 135.5$, $N_{20} = N_{20}$, $P = 0.083$), 5th ($t_{38} = 1.600$, $P = 0.118$), 10th ($U = 137$, $N_{20} = N_{20}$, $P = 0.091$) and 15th day ($t_{38} = 1.330$, $P = 0.118$) after emergence (Fig. 2).

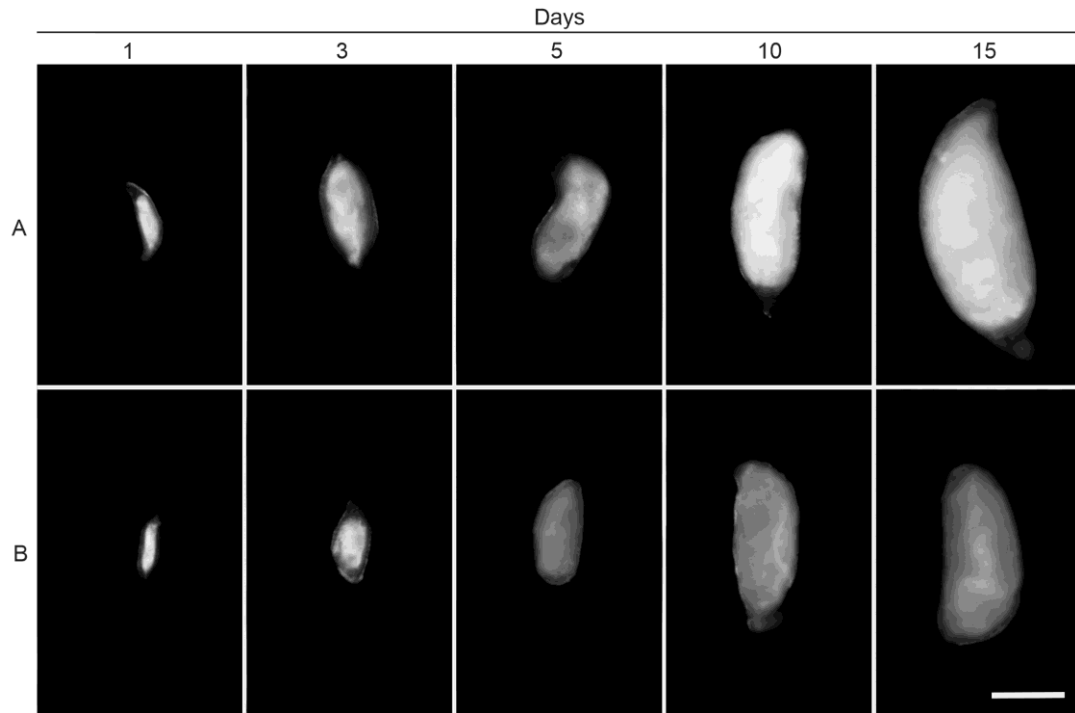


Fig. 1: Seminal vesicle (SV) development of males of *Eriopis connexa* on de 1, 3, 5, 10 and 15th day after emergence. A and B indicate SV of males from resistant and susceptible populations, respectively. Bar: 500µm.

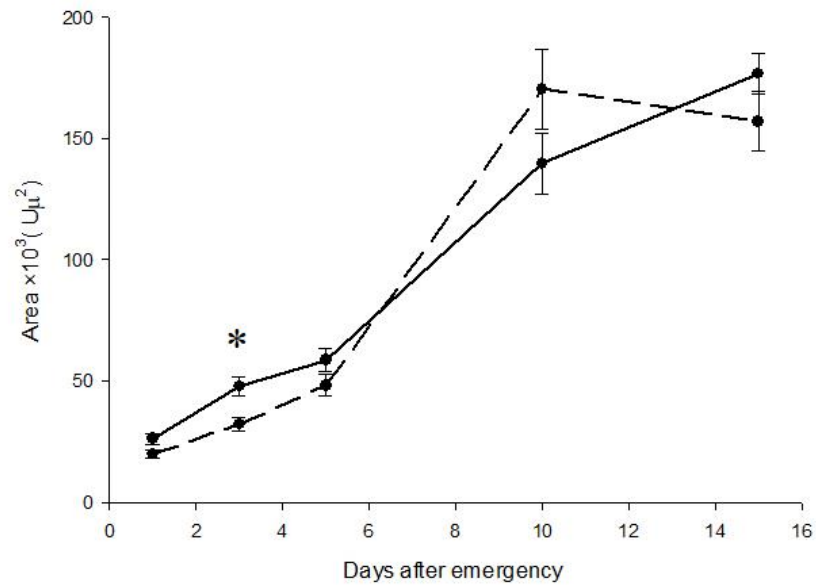


Fig. 2: Progressive increase of area of the seminal vesicle in resistant (continuous line) and susceptible (dashed) populations of *Eriopis connexa*. Asterisk indicates significant difference by t-test ($P < 0.05$). Filled circles and vertical lines indicate mean and standard error, respectively.

Sperm morphometry

Both populations presented elongated and thin sperm (Fig. 3A) with mean lengths of $106 \pm 24.4 \mu\text{m}$, $N = 339$ and $106.6 \pm 5.1 \mu\text{m}$, $N = 355$ for Ec-R and Ec-S, respectively. There was no significant difference in the length of these cells ($U = 59661$, $N_{339} = N_{355}$, $P = 0.847$) between both populations. Similarly, the nuclei of the spermatozoa were thin, elongated, and parallel to the flagellar components for both populations (Fig. 3B). The nucleus comprised around $\frac{3}{4}$ of the total sperm length, although no significant difference between both populations was detected ($U = 11685$, $N_{160} = N_{160}$, $P = 0.178$). Regarding morphology, no difference was observed between sperm from both populations when stained with Giemsa or DAPI.

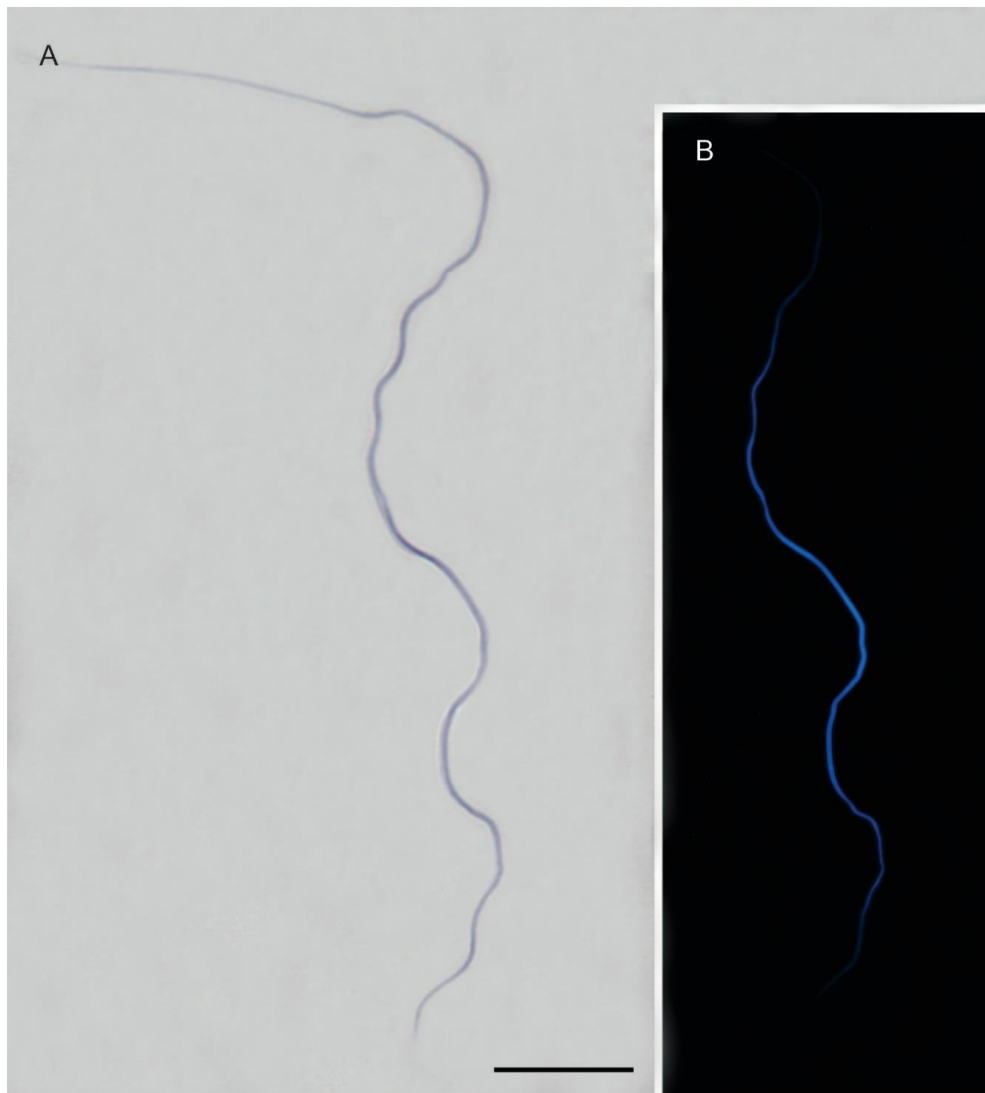


Fig. 3: Sperm from a resistant population of *Eriopsis connexa*. No significant difference was observed in either the total (A) or nuclear (B) length of spermatozoa (Mann-

Whitney test; $P > 0.05$) between resistant and susceptible populations. A- Giemsa stain. B. DAPI stain. Bars: 10 μ m

Mating tests

Hatched eggs were observed in every couple that succeeded in copulating. On the 3rd day after adult emergence, Ec-R males showed higher number of mates (14) than Ec-S ones (9) ($St = 4.278$, $df = 1$, $P = 0.039$) (Fig. 4A). All 5-day old Ec-R males copulated but only 14 Ec-S 5-day old ones had success (Fig. 4B). From 10 days after adult emergence, all formed couples had success in copulating for both Ec-R and Ec-S populations (Fig. 4C, D, E and F) no significant difference was detected ($St \leq 2.907$, $df = 1$, $P \geq 0.088$). Regarding the duration of mating with males of the same age, although Ec-S had less succeed in mating compared to Ec-R, adults of Ec-S that mated with females had the same mount duration as Ec-R and no difference was observed between these two populations (Fig. 4D, E and F).

Mating Preference

When Ec-R females were placed to choose between Ec-R and Ec-S males, nine of them mated with Ec-R males and 11 with Ec-S ones but, no significant difference was detected ($\chi_1^2 = 0.4$, $P = 0.53$). When Ec-S females were placed to choose between Ec-R and Ec-S males, 11 of them mated with Ec-R males and 9 with Ec-S ones and no difference was detected ($\chi_1^2 = 0.2$, $P = 0.66$).

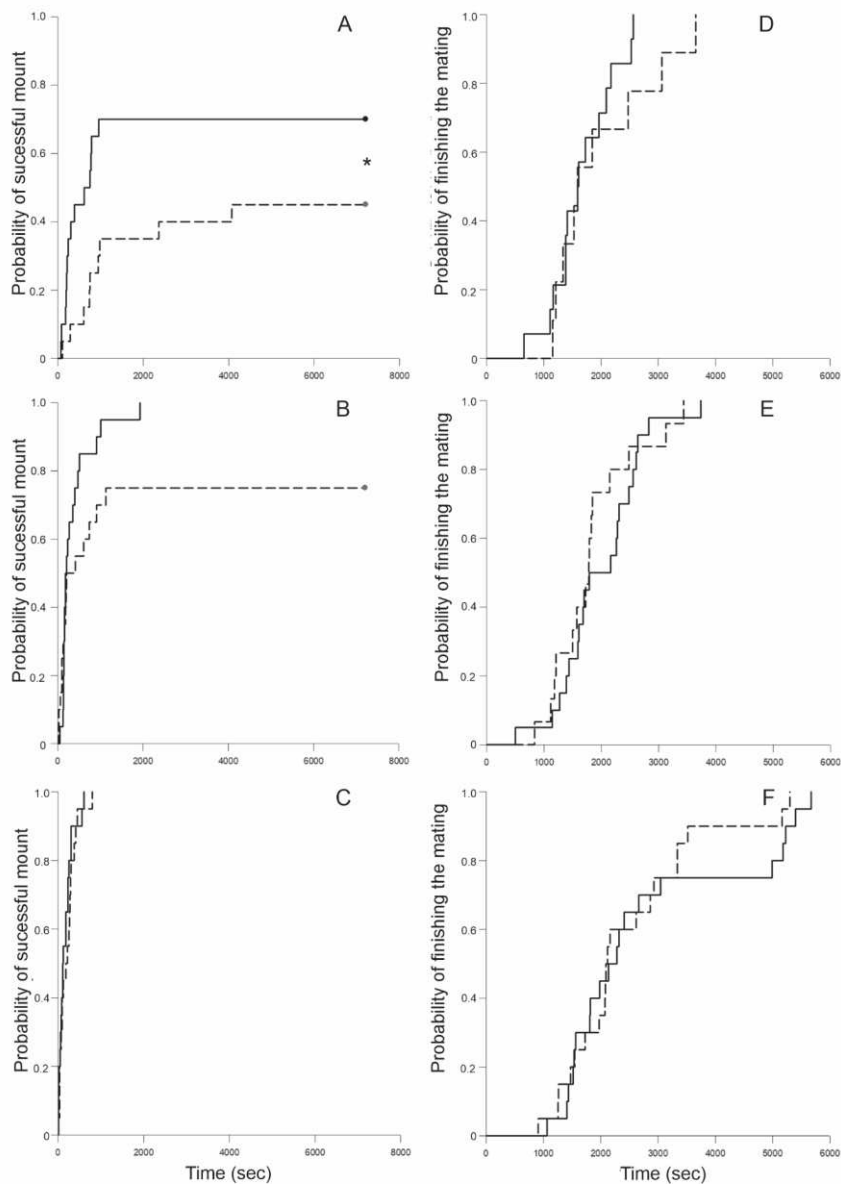


Fig. 4: Probability and duration of mount and copulation (sec) with sexually mature females of *Eriopsis connexa*. (A and D), (B and E) and (C and F) indicate, respectively, males on the 3rd, 5th and 10th day after emergence. Solid and dashed lines indicate, respectively, resistant and susceptible populations. Asterisk indicates significant difference between survival curves by Log-Rank test ($P < 0.05$).

Discussion

The SV of *E. connexa* males were immature in newly emerged individuals (one day old), which can be noted by the minimal quantity of sperm and the considerably reduced size. However, this structure progressively increased until its complete sexual

maturity at 10 days. This vesicular growth is certainly due to the increase of sperm stored and accumulation of secretion in the lumen vesicles.

Development was differentiated depending on population origin. Three-day-old Ec-R males showed similar size of the SV to 5-day-old Ec-S ones. The earlier development of SV in Ec-R males than Ec-S ones may contribute to the anticipation of sexual maturity and consequently lead to a faster population increase when the insecticide application is absent as observed by Rodrigues et al. (2016). However, other authors observed, also without applying insecticide, that the population of Ec-R had a smaller population size than Ec-S (D'Ávila et al., 2018), reflected in the smaller number of individuals and longevity.

The present study showed that although the SV are small in size and with a very small amount of sperm for both Ec-S and Ec-R at the first days after the emergence of males, 3-day old males are still able to mate with adult females from both populations and manage to fertilize the eggs. Therefore, males are already able to transfer sperm during copulation and consequently reproduce even in stages of incomplete maturation and low sperm volume in the SV. However, the lower frequency of mating of 3-day-old males (from both populations) shows that despite having sperm capable to fertilize, mounts are not performed by all males, which includes unsuccessful attempts. It is important to observe the difference in the number of mating by Ec-R (at 3- and 5-days-old) which allowed better reproductive performance compared to Ec-S. The progressive increase in mating with advancing age for coccinellids is probably explained by receptive mediation to visual cues such as hardening or incomplete body pigmentation, or responses to chemical cues (Omkar et al., 2013). Despite the differences observed for mating success, there was no difference between Ec-R and Ec-S for mating duration at any male age. Interestingly, D'Avila et al. (2018) reported that Ec-R populations tend to decrease copulation duration when not exposed to insecticides.

Although there was no apparent difference in the nucleus or total lengths of the sperm of both Ec-R and Ec-S populations, differences in ultrastructural and / or chemical conformation of sperm are not discarded.

Resistance in populations is usually associated with an adaptive cost, which can be observed in falling reproductive performance (Berticat et al., 2002; Stratonovitch et al., 2014). This is due to the use of resource that could be directed to reproduction;

however, it is reallocated for the maintenance or survival of the organism. This occurs even in the absence of insecticides, as individuals continue to express defense mechanisms against the insecticide (Guedes et al., 2005). However, in this work, it appears that the reproductive cost for EC-R was mitigated due to the early maturation of the SV that may favored the higher frequency of mating in ages of incomplete sexual maturity under the absence of lambda-cyhalothrin exposure. Increased reproductive success for resistant populations without insecticide applications has also been found in *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera, Tenebrionidae) (Lomnicki and Jasienski, 2000). This gain or mitigation of reproductive costs can be explained by modifications in genes that improve reproductive performance or by non-harmful resistance genes that could modify performance in sperm competence (Arnaud and Haubruge, 2007) or become males more attractive for females (Lewis and Austad, 1994). Our results showed that, at least in *E. connexa*, there is no difference in the attractiveness of males to females in any of the populations. However, it can be said that Ec-R males have a better reproductive performance, considering precocity in the production of sperm and frequency of copulation.

In conclusion, sexual maturation is earlier in the Ec-R population, evidenced by the early maturation of the SV and the greater number of mating at younger ages, which probably increases its reproductive potential compared to Ec-S, as reported by Rodrigues et al. (2016). Studies with this same population, showing that exist a cost in reproductive performance (D'Avila, 2018), this cost can be mitigated by the precocious sexual maturity of males in the resistant population of ladybugs to pyrethroids. This precociousness can favor the permanence in the field of this population even without the use of insecticides.

Acknowledgments

The financial support provided by the CAPES Foundation, the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), and the Minas Gerais State Foundation for Research Aid (FAPEMIG) was also greatly appreciated.

References

Arnaud L, Haubruge E (2007) Insecticide resistance enhances male reproductive success in a beetle. *Evolution* 56:2435–2444. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb00169.x>

Berticat C, Boquien G, Raymond M, Chevillon C (2002) Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genet Res* 79:41–47. <https://doi.org/10.1017/s001667230100547x>

Cornell HV, Hawkins BA (1995) Survival Patterns and Mortality Sources of Herbivorous Insects: Some Demographic Trends. *Am Nat* 145:563–593

Costa JF, Matos CHC, Oliveira CRF de, et al (2017) Functional and numerical responses of *Stethorus tridens* Gordon (Coleoptera: Coccinellidae) preying on *Tetranychus bastosi* Tuttle, Baker & Sales (Acari: Tetranychidae) on physic nut (*Jatropha curcas*). *Biol Control* 111:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.04.015>

Dallai R, Lino-Neto J, Dias G, et al (2018) Fine structure of the ladybird spermatozoa (Insecta, Coleoptera, Coccinellidae). *Arthropod Struct Dev* 47:286–298. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2018.04.001>

D'Ávila VA, Barbosa WF, Reis LC, et al (2018) Lambda-cyhalothrin exposure, mating behavior and reproductive output of pyrethroid-susceptible and resistant lady beetles (*Eriopis connexa*). *Crop Prot* 107:41–47. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.01.009>

Dortas Maffei EM, De Brito Fragoso D, Graças Pompolo SD, Eduardo Serrão J (2001) Morphological and Cytogenetical Studies On the Female and Male Reproductive Organs of *Eriopis connexa* Mulsant (Coleoptera, Polyphaga, Coccinellidae). *Neth J Zool* 51:483–496

Guedes NMP, Guedes RNC, Ferreira GH, Silva LB (2009) Flight take-off and walking behavior of insecticide-susceptible and - resistant strains of *Sitophilus zeamais* exposed to deltamethrin. *Bull Entomol Res* 99:393–400

Guedes RNC, Oliveira EE, Guedes NMP, et al (2005) Cost and mitigation of insecticide resistance in the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Physiol Entomol* 31:30–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2005.00479.x>

Hodek I, Ceryngier P (2000) Sexual activity in Coccinellidae (Coleoptera): a review. *EJE* 97:449–456

Morales JA, Cardoso DG, Della Lucia TMC, Guedes RNC (2013) Weevil x Insecticide: Does 'Personality' Matter? *PLOS ONE* 8:e67283

Obrycki JJ, Harwood JD, Kring TJ, O'Neil RJ (2009) Aphidophagy by Coccinellidae: Application of biological control in agroecosystems. *Trophic Ecol Coccinellidae* 51:244–254

Omkar, Sahu J, Kumar G (2013) Age specific mating incidence and reproductive behavior of the ladybird beetle, *Anegleis cardoni* (Weise) (Coleoptera: Coccinellidae). *J Asia-Pac Entomol* 16:263–268. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2013.03.003>

Parker GA (1970) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biol Rev* 45:525–567. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1970.tb01176.x>

Rodrigues ARS, Ruberson JR, Torres JB, et al (2013a) Pyrethroid resistance and its inheritance in a field population of *Hippodamia convergens* (Guérin-Méneville) (Coleoptera: Coccinellidae). *Pestic Biochem Physiol* 105:135–143. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.01.003>

Rodrigues ARS, Siqueira HAA, Torres JB (2014) Enzymes mediating resistance to lambda-cyhalothrin in *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae). *Pestic Biochem Physiol* 110:36–43

Rodrigues ARS, Spindola AF, Torres JB, et al (2013b) Response of different populations of seven lady beetle species to lambda-cyhalothrin with record of resistance. *Ecotoxicol Environ Saf* 96:53–60

Rodrigues ARS, Torres JB, Siqueira HAA, Lacerda DPA (2013c) Inheritance of lambda-cyhalothrin resistance in the predator lady beetle *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae). *Biol Control* 64:217–224. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.11.018>

Rodrigues AS, Botina L, Nascimento CP, et al (2016) Ontogenic behavioral consistency, individual variation and fitness consequences among lady beetles. *Behav Processes* 131:32–39

Santos DS, Rodrigues ARS, Torres JB, Lira R (2016) Performance of *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae) resistant to lambda-cyhalothrin after extended recovery from knockdown. *Neotrop Entomol* 45:718–724. <https://doi.org/10.1007/s13744-016-0422-x>

Stratonovitch P, Elias J, Denholm I, et al (2014) An Individual-Based Model of the Evolution of Pesticide Resistance in Heterogeneous Environments: Control of *Meligethes aeneus* Population in Oilseed Rape Crops. *PLOS ONE* 9:e115631. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115631>

Symondson WOC, Sunderland KD, Greenstone MH (2002) Can Generalist Predators be Effective Biocontrol Agents? *Annu Rev Entomol* 47:561–594. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145240>

Torres JB (2012) Insecticide Resistance in Natural Enemies - Seeking for Integration of Chemical and Biological Controls. *J Biofertilizers Biopestic* 3:. <https://doi.org/10.4172/2155-6202.1000e104>

Torres JB, Rodrigues ARS, Barros EM, Santos DS (2015) Lambda-Cyhalothrin Resistance in the Lady Beetle *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae) Confers Tolerance to Other Pyrethroids. *J Econ Entomol* 108:60–68. <https://doi.org/10.1093/jee/tou035>

Uzakah RP (2017) Age at sexual maturity of male and female banana weevils, *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera: Curculionidae). *Acta Zool* 99:2–8. <https://doi.org/10.1111/azo.12190>

3 CAPÍTULO 2

**Redescrição do sistema reprodutor masculino e feminino de *Eriopis Connexa*
(Germar, 1823) (Coleoptera: Coccinellidae)**

Redescrição do sistema reprodutor masculino e feminino de *Eriopis Connexa* (Germar, 1823) (Coleoptera: Coccinellidae)

Diego Andres Bolivar Silva¹; Paulo Henrique Rezende¹; Pedro Felipe Seguro de Toledo¹; José Lino-Neto²

¹Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa-MG, Brasil.

²Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa-MG, Brasil.

E-mail: dabolivars@ufv.br

Resumo

Neste trabalho redescrevemos a morfologia do sistema reprodutor masculino e feminino de *Eriopis connexa*, uma espécie de joaninha de alto interesse econômico devido ao seu uso como predador de pragas em diversas culturas. A microscopia de luz mostrou que o sistema reprodutor masculino (SRM) desta espécie possui um par de testículos, cada um formado por 12 a 17 folículos e conectado ao ducto ejaculatório através do ducto deferente. Os folículos são preenchidos por cistos espermáticos nas diferentes fases da espermatogênese. Ainda no SRM, dois pares de glândulas acessórias distintos que desembocam juntos na extremidade anterior do ducto ejaculatório foram observados. As fêmeas de *E. connexa* possuem dois ovários, cada um composto por 12 a 17 ovariolos conectados ao oviducto lateral, o qual, juntamente com o outro oviducto lateral, desemboca no oviducto comum. Este último também está conectado a espermateca, com sua glândula, por meio do ducto espermatecal. Histologicamente se observou que os ovariolos são meroísticos telotróficos. Nossos resultados mostraram que, diferentemente do que foi descrito, o SRM de *E. connexa* possui glândulas acessórias como ocorre nos besouros em geral. Ainda, a média de 15 ovariolos por ovário é maior do que tem sido observada em muitos Coleoptera, inclusive bem maior do que foi descrita para esta espécie.

Palavras-chave: testículo, ovários, glândulas acessórias, espermatozoides, espermateca, joaninhas.

Abstract

In this work, we redescribed the morphology of the male and female reproductive system of *Eriopis connexa*, a species of ladybugs of high economic interest due to its use as a pest predator of several cultures. Light microscopy showed that the male reproductive system (MRS) of this species has a pair of testis, each consisting of 12 to 17 follicles and connected to the ejaculatory duct through the vas deferens. The follicles are filled with spermatid cysts at different stages of spermatogenesis. In the MRS, were observed two pairs of distinctive accessory glands that arrive in the anterior portion of the ejaculatory duct. *E. connexa* females have two ovaries, each composed of 12 to 17 ovarioles connected to the lateral oviduct, which, together with the other ovary, leads to the common oviduct. This oviduct is also connected to the spermatheca, with its gland, through the spermathecal duct. It was observed that the ovarioles are telotrophic meroistic. Our results showed that, unlike the previously described, the *E. connexa* MRS has accessory glands, as it occurs in beetles in general. Additionally, the average of 15 ovarioles per ovary is greater than observed in many Coleoptera, indeed, it is greater than previously described for this species.

Keywords: testis, ovaries, accessory glands, sperm, spermatheca, ladybugs.

Introdução

A família Coccinellidae abrange ao redor de 6000 espécies descritas e distribuídas em 360 gêneros ao redor do mundo (Nedvěd and Kovár, 2012). Uma classificação recente dividiu o grupo em sete subfamílias: Coccinellidae monofilética, Coccidulinae, Epilachninae, Scymninae e Chilocorinae parafiléticas (Magro et al., 2010). Esta classificação foi baseada em caracteres morfológicos externos como padrões de cores, forma das pernas, antenas e genitália (Seago et al., 2011), além de análises moleculares (Giorgi et al., 2009), composição cromossômica, enzimática e de proteínas (Majerus, 2016). Vários estudos têm concluído que os coccinélídeos são um grupo monofilético, contudo as relações dentro da família ainda estão completamente indeterminadas (Magro et al., 2010).

Dentre os coccinélídeos, as espécies do gênero *Eriopis* Mulsant, 1850, ocorrem na América do Sul, e se destacam por sua importância econômica, por serem comumente usadas em programas de controle biológico devido ao seu hábito predador (Rodrigues et al., 2013a,b; Torres et al., 2015). A morfologia externa já foi descrita com detalhe para espécies que ocorrem no Chile e Peru (Bustamante et al., 2007; González, 2014). De forma geral, as espécies desse gênero possuem o pronoto

preto com franjas laterais brancas e duas manchas brancas ou amareladas, e élitros com fundo preto e sete manchas amarelas. *Eriopis connexa* é uma espécie predadora de afídeos e frequentemente utilizada no manejo de pragas em agroecossistemas. Algumas espécies de regiões que abrangem uma ampla zona geográfica têm sido catalogadas como *E. connexa* devido à similitude do aparelho genital (González, 2014).

A caracterização da genitália de machos e fêmeas tem sido usada para estudos de filogenia e, principalmente, taxonomia. Segundo Bilinski (1998), essas estruturas constituem uma ferramenta importante para análises taxonômicas além de ajudar a compreender adaptações e ciclos de vida das espécies. A morfologia do sistema reprodutor masculino (SRM) e feminino (SRF) de *E. connexa* foi previamente estudada por Maffei et al. (2001). Esses autores descreveram que o SRM é formado por um par de testículos composto por folículos dispostos em série, nos quais se observam células germinativas nas diferentes fases da espermatogênese. Os testículos se ligam aos vasos deferentes e estes ao ducto ejaculatório na região posterior que se une ao aedeagus. Sobre o SRF descreveram que apresenta um par de ovários compostos por ovariolos que estão ligados na porção apical pelos filamentos terminais e basalmente se unem ao oviducto comum. Ainda, spermateca é simples, pequena e com o ducto spermatecal curto.

Contudo, ao observarmos a anatomia do sistema reprodutor de machos e fêmeas desse coccinelídeo notamos diferenças conspícuos entre o que encontramos e a descrição já existente. Devido a que esta espécie é de importância ecológica e económica, além de esclarecer e detalhar de forma mais específica o SRM e SRF, neste trabalho, redescrevemos esses dois sistemas apontando as diferenças observadas e, também disponibilizamos informações histológicas das partes que os compõem.

Material e métodos

População

Os espécimes desse estudo foram obtidos da população obtida a partir de coleta no campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, estado de Minas

Gerais, em julho de 2017. A população foi mantida no Laboratório de Fisiologia Animal da UFV sob condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C), umidade relativa ($70 \pm 5\%$) e fotoperíodo (12:12 h (L: D)). Ela foi alimentada *ad libitum* com ovos de *Anagasta* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) (Rodrigues et al. 2013c, 2016). Mistura de açúcar e água foi também ministrada eventualmente durante a fase adulta para favorecer a reprodução (Rodrigues et al. 2013c). Os machos e fêmeas foram identificados de acordo com o tamanho do abdômen: fêmeas possuem o abdômen mais largo por causa do desenvolvimento dos ovários (Maffei, 2001).

Anatomia do sistema reprodutor masculino e feminino

Os sistemas reprodutores de machos e fêmeas adultos de *E. connexa* (dez de cada sexo) foram dissecados em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, e fixados por 24 h em solução de glutaraldeído a 2,5% no mesmo tampão. Posteriormente, eles foram fotografados com uma câmera AxioCam MRc acoplada a um microscópio estereoscópico Zeiss Discovery V-20. Em seguida, o número de folículos por testículo para os machos e de ovariolos por ovário para as fêmeas foram contados. A descrição da anatomia geral do sistema reprodutor foi realizada tanto para machos quanto para fêmeas e, então, ilustrada utilizando o programa Corel Draw. As glândulas acessórias foram mensuradas utilizando o software ImageJ 1.51k (disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Histologia do sistema reprodutor feminino e masculino

Para obter os cortes histológicos de testículo, glândulas acessórias, ovariolos e glândula espermatecal, os sistemas reprodutores de três indivíduos de cada sexo foram dissecados e fixados durante 24 h em solução glutaraldeído 2,5% em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2. As amostras foram então lavadas no tampão e fixadas em tetróxido de ósmio a 1% por 2 h, em seguida, desidratadas em soluções crescentes de etanol (30, 50, 70 e 90%, 10 min cada, e duas vezes a 100%, 5 min cada). As estruturas foram colocadas em historesina (historesin Leica) sem o catalisar e deixadas durante 24 h para a infiltração, em seguida, elas foram emblocadas na mesma resina com o catalizador para a polimerização. Os cortes histológicos (~1,5

µm) foram obtidos em um micrótomo rotativo RM 2255 (Leica Corporation, Wetzlar, Germany) utilizando navalhas de vidro. Os cortes foram transferidos para lâminas histológicas, corados com solução Giemsa (Merck KGaA) durante 20 min e, posteriormente, lavados com água corrente. As observações histológicas e as respectivas imagens foram feitas utilizando um microscópio de luz Olympus BX-60 com uma câmera Olympus Q-Color 3 digital acoplada. As imagens dos testículos, ovariolos, e glândula espermatecal foram editadas e montadas utilizando o programa Adobe Photoshop CS5.

Resultados

Anatomia do sistema reprodutor masculino (SRM)

O SRM de *E. connexa* é formado por um par de testículos, cada testículo possuindo em média 15,8 (12 a 17) folículos organizados lateralmente que se juntam, através de curtos ductos eferentes, na extremidade anterior do ducto deferente (1B) com 7,2 mm de comprimento médio. As extremidades anteriores dos dois ductos deferentes tornam-se dilatadas, devido ao acúmulo dos espermatozoides à medida que os machos amadurecem sexualmente, formando as vesículas seminais. Nestas, os espermatozoides ficam armazenados e individualizados (não em feixes) até serem transferidos para as fêmeas durante as cópulas. A maior parte dos ductos deferentes mostrou-se delgada e desembocando na extremidade anterior do ducto ejaculatório (Fig. 1A). Nessa mesma região também chegam as extremidades posteriores dos dois pares das longas e finas glândulas acessórias (Fig. 1C). Um dos dois pares de glândulas apresentou cor clara (Fig. 1A) e comprimento médio de 7,5 mm. Já o outro par era mais longo, 9,6 mm em média, e a cor foi mais escura. Quando submetidas à fixação pelo tetróxido de ósmio (que tem afinidade para lipídios), as glândulas mais claras e menores se tornaram de cor marrom (ga, Fig. 1C), enquanto as glândulas brancas adquiriram coloração preta (gb, Fig. 1C). O ducto ejaculatório (Fig. 1A) mostrou-se delgado, rígido, medindo em média 5,10 mm de comprimento e terminando posteriormente no aedeagus, o qual é fino, esclerotizado e em forma de 'J' (Fig. 1D).

Anatomia do sistema reprodutor feminino (SRF)

O SRF de *E. connexa* mostrou um par de ovários, cada ovário formado por em média 15,4 (12 a 17) ovariolos e circundados por uma rede extensiva de traqueíolos. Os ovariolos eram alongados, e ligados na porção apical por curtos filamentos terminais. Os ovariolos de cada ovário se juntavam, por suas extremidades posteriores, a um oviducto lateral. Por sua vez, os dois oviductos laterais se uniam ao oviducto comum (Fig. 1E). Na região mediana do oviducto comum, a espermateca (órgão de armazenamento de espermatozoides em fêmeas) está conectada por meio do ducto espermatecal. A espermateca se mostrou marrom, por ser esclerotizada internamente, curvada e de aspecto rugoso (Fig. 1F). Em sua base se observou duas conexões; uma com a glândula espermatecal e a outra com o infundibulum, o qual apresentou forma de “T” e sua porção basal conectada ao ducto espermatecal (Fig. 1F).

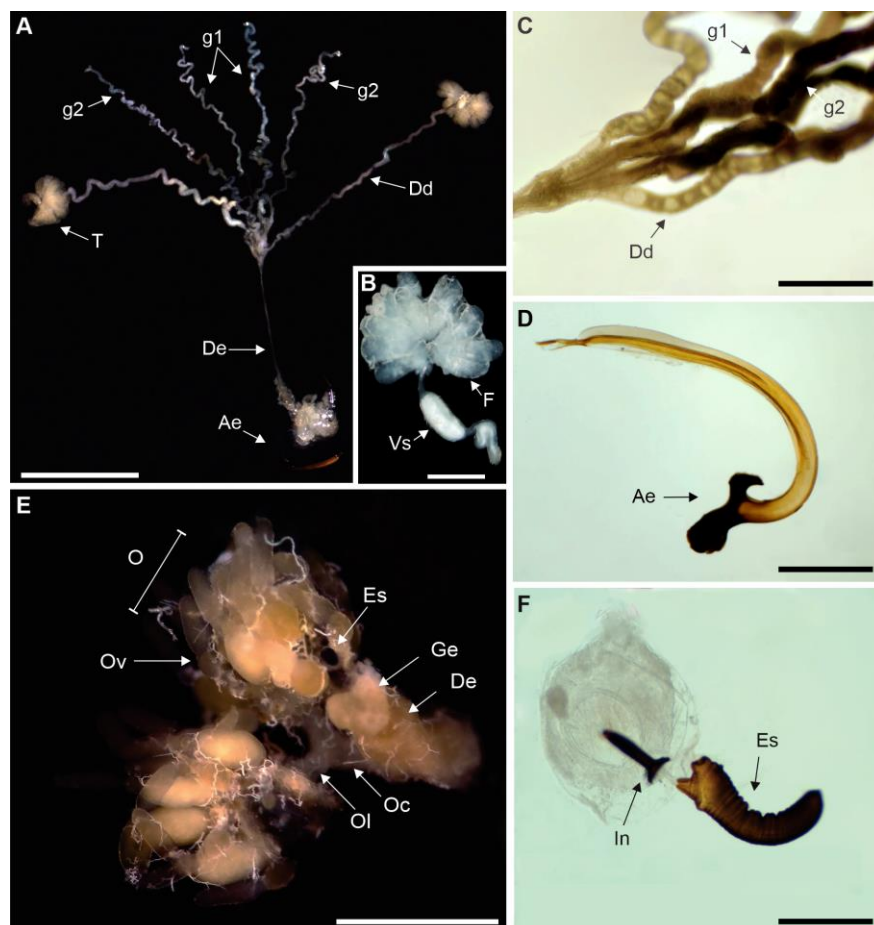


Figura 1. SRM e SRF de *E. connexa*. **A:** SRM exibindo um par de testículos (T), ductos deferentes (Dd), dois pares de glândulas acessórias (G1 e G2), ducto ejaculatório (De) e aedeagus (Ae). **B:** detalhe do testículo mostrando os folículos e a vesícula seminal (Vs). **C:** observa-se a diferença de cor nas glândulas acessórias (G1 e G2) quando submetidas a ósmio. **D:** Aedeagus (Ae) em detalhe mostrando o formato em forma de “J”. **E:** SRF exibindo um par de ovários(O), ovariolos (Ov), oviductos laterais (Ol), oviducto comum (Oc), ducto espermatecal (De), glândula espermatecal (Ge) e espermateca (Es). **F:** observa-se a espermateca rugosa e sua junção basal à glândula espermatecal (Ge) e ao infundibulum (In). Barras: A, E=2 mm; C-F=0,5 mm. B=500 μ m.

Histologia do sistema reprodutor masculino

Cada testículo é coberto por um epitélio o qual emite septos individualizando os folículos que são preenchidos por cistos nos diferentes estágios da espermatogênese (Fig. 2A-C). Na região apical dos folículos se observou cistos com espermatogônias e espermatócitos e, conforme se aproximou da região basal, espermátides nas diferentes fases das espermiogênese foram observadas. Finalmente, na base do folículo e no ducto deferente foram encontrados espermatozoides totalmente diferenciados (Fig. 2A, F). A contagem de células por cisto resultou em uma média de 450 espermatozoides por cisto, o que indica nove ciclos de divisões celulares por cisto a partir da espermatogônia inicial. Também foi possível observar a degeneração de espermátides no meio deste processo (Fig. 2E). Em corte transversal, as glândulas acessórias apresentaram formato oval e uma alta quantidade de grânulos de secreção (Fig. 2H, I). Observou-se ainda diferenças entre os dois tipos de glândulas, sendo que as glândulas mais escuras, por ser marcada fortemente pelo tetróxido de ósmio, provavelmente apresentam maior quantidade de lipídios em seu conteúdo (Fig. 2H, I). A região delgada dos ductos deferentes mostrou uma camada de tecido epitelial simples, formado por células cúbicas com vesículas citoplasmáticas ao redor do núcleo (Fig. 2G). Na luz desses ductos, alguns grãos de secreções e esporadicamente espermatozoides foram observados (Fig. 2B, G). Antes de desembocar no ducto ejaculatório, as extremidades dos dois ductos deferentes se mostraram inseridas em um tecido conjuntivo e em posição diametralmente oposta (Fig. 2B). As extremidades posteriores das quatro glândulas acessórias também se mostraram inseridas no mesmo tecido conjuntivo, contudo elas formam um quadrado

(duas de um lado e duas do outro) mais central e entre os dois ductos deferentes (Fig. 2B).

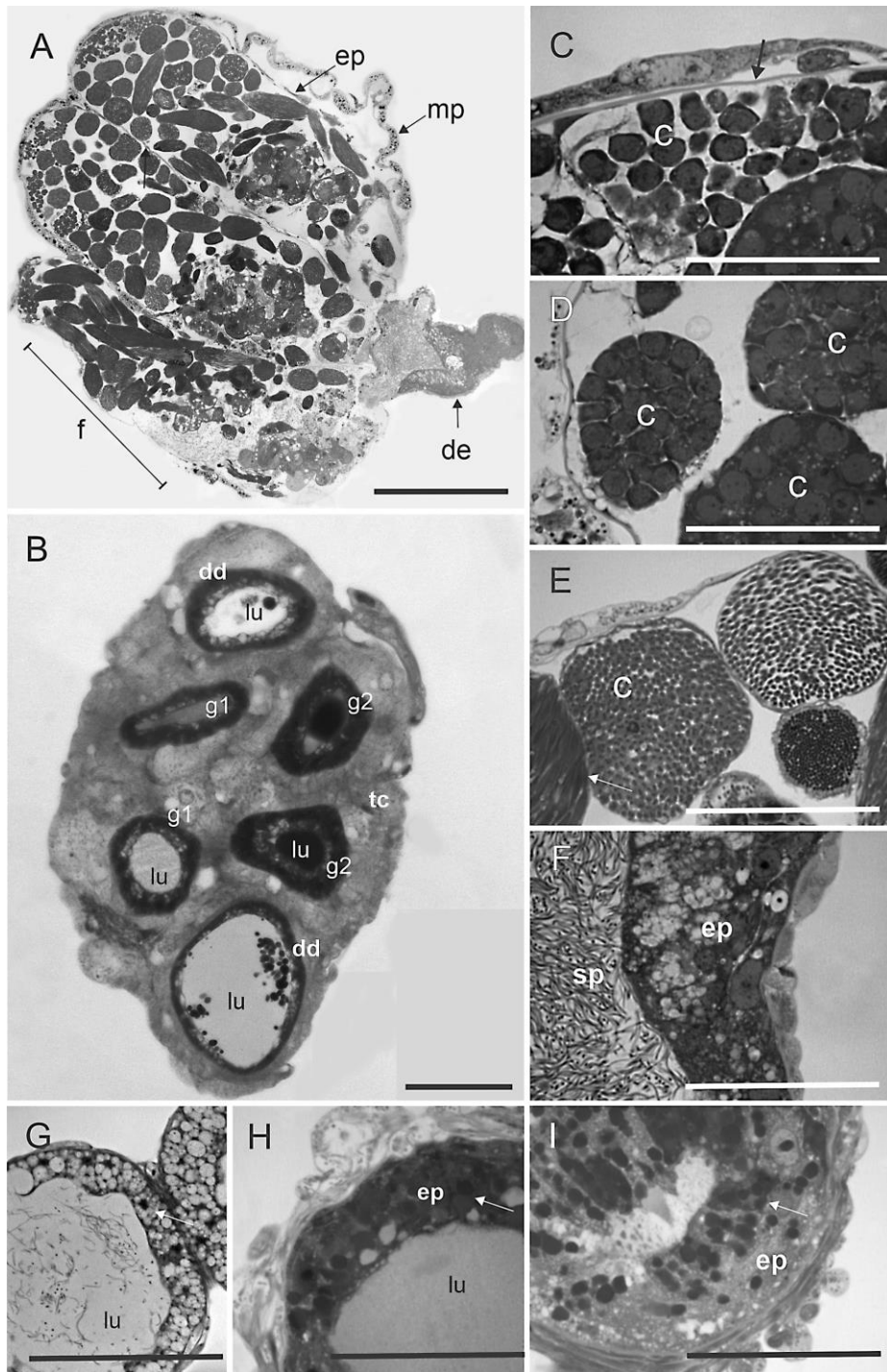


Figura 2. Histologia de SRM de *E. connexa*. **A:** Corte longitudinal de testículo exibindo a membrana peritoneal (mp), epitélio (ep), folículos separados por septos (seta) (f), cistos em diferentes estágios da espermatogênese e ducto deferente (dd). **B:** Corte transversal da junção das glândulas acessórias (g1 e g2), ductos deferentes (dd), e tecido conjuntivo (tc). Observa-se a presença de conteúdo citoplasmático no lúmen (lu) do ducto deferente. **F:** Corte longitudinal do início do ducto deferente exibindo presença de espermatozoides (sp) no lúmen. Observa-se epitélio com presença de

vesículas de secreção. **H**: Ducto deferente mostrando uma camada epitelial (setas) e espermatozoides no lúmen. **H-I**: glândulas acessórias em corte transversal mostrando a diferenciação no conteúdo vesicular que é secretado no lúmen. Barras: A=200 µm; B-I=50 µm.

Histologia do sistema reprodutor feminino

E. conexa apresentou ovários com ovariolos meroísticos e telotróficos com duas regiões distintas: o trofário na região apical e o vitelário na basal (Fig. 3A). No trofário foram observadas oogônias (3B, C), já no vitelário se observou, mais anteriormente, um oócito primário em crescimento e na porção mais posterior um oócito em fase mais adiantada do desenvolvimento. No interior desse último oócito se observou a vesícula germinal e grande quantidade de grânulos de vitelo (Fig. 3A). Os oócitos estavam envolvidos por uma bicamada de células foliculares cúbicas com núcleos de cromatina descondensada (Fig. 3D). Na região posterior do vitelário foi observado um tecido interfolicular (Fig. 3A). Se observa também a glândula espermatecal, a espermateca fortemente esclerotizada e o oviducto comum. A glândula espermatecal é achatada em corte transversal, possui uma luz ampla revestida internamente por uma delgada cutícula e, externamente, por uma série de subunidades lobulares formadas por células secretoras, nas quais se observam uma ampla quantidade de vesículas citoplasmáticas e o respectivo ducto que chega ao lúmen da glândula espermatecal (Fig. 3E,G,H). A porção basal da espermateca estava envolvida por uma série de camadas musculares (Fig. 3E, F). O oviducto comum era também revestido internamente por uma camada de cutícula (Fig. 3E).

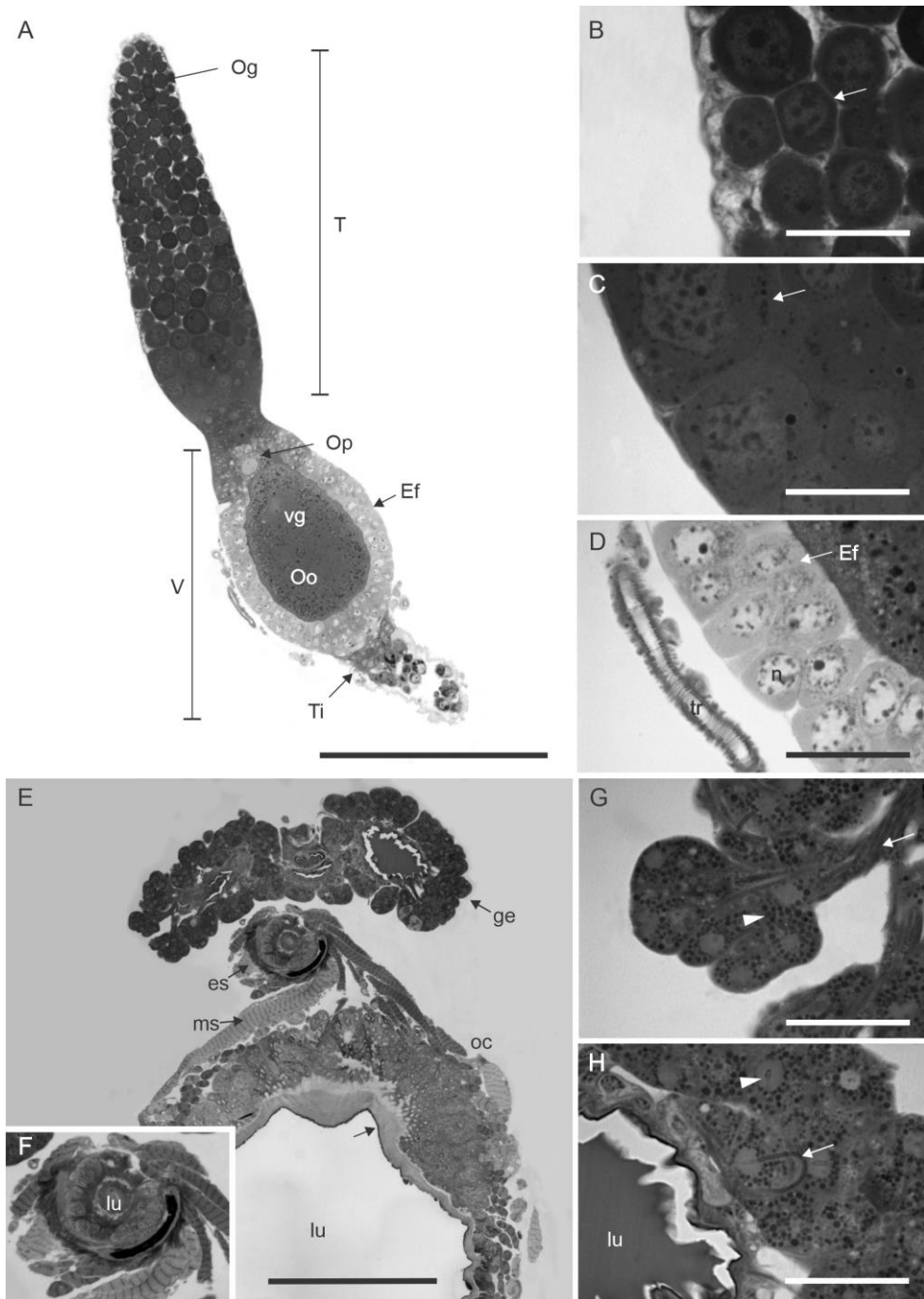


Figura 3. Histologia do SRF de *E. connexa*. **A:** Corte longitudinal de ovariolo mostrado as regiões do trofário (T) e vitelário (V), mostrando as oogônias (Og) no trofário e, no vitelário, um oócito primário (Op) seguido de um oócito (Oo) com a vesícula germinal (Vg) e grânulos de vitelo. Epitélio folicular (Ef), tecido interfolicular (Ti). **B-C:** Maior aumento de regiões do ovariolo da figura anterior. **D:** Epitélio folicular mostrando a bicamada de células com os núcleos. Observa-se uma porção do traqueiolo na região externa (tr), **E:** Corte transversal da glândula espermatecal (ge), espermateca (es) e oviducto comum (oc) mostrando o lúmen (lu) revestido pela cutícula (setas). Observa-se o oviducto comum rodeado por células musculares (ms). **F:** Espermateca mostrando o lúmen (lu) e externamente as células musculares. **G, H:** Células da glândula espermatecal mostrando os grânulos de secreção (cabeça de

seta) e os ductos (seta) que chegam no lúmen (lu) da glândula. Barras: A=500 μm ; C-G=25 μm ; B-D,H,I=200 μm .

Discussão

Em *Eriopis connexa*, o sistema reprodutor masculino (SRM) exhibe o padrão típico observado em outros coccinelídeos: constituído de um par de testículos com folículos em forma de tufo, dois pares de glândulas acessórias longas e finas que desembocam no ducto ejacutório juntamente com os dois ductos deferentes (Ehara, 1952). O SRM dessa espécie já foi descrito por Maffei et al. (2001), contudo esses autores reportaram a ausência de glândulas acessórias. Diferentemente desse estudo, todos os indivíduos analisados apresentaram dois pares de glândulas acessórias alongadas e finas, com características morfológicas de coloração e conteúdo diferenciados, como tem sido observado em outros coccinelídeos (Ehara, 1952). O formato do aedeagus apresentou as mesmas características que foram observadas para *E. connexa* em populações do Chile, sendo este curvado em sua porção média e alongado na sua parte terminal (Gonzalez, 2014). Aedeagus com características semelhantes a estas também foram observados em outras espécies do mesmo gênero (Gonzales, 2014; Bustamante et al., 2007).

Cada testículo de *E. connexa* é formado por cerca de 15 folículos, sendo este um número que pode ser característica dessa espécie, já que, segundo Barker (1989), esse número pode variar entre as espécies. É importante ressaltar que este número de folículos pode estar de acordo com o que foi observado por Maffei et al. (2001), pois segundo esses autores “cada testículo era formado por muitos folículos em forma de gota”. Com relação à espermiogênese, se observa similaridade com relação a outros coleópteros (Wu et al., 2017; Koçakoglu et al., 2019). Cada folículo apresenta os quatro estágios de desenvolvimento das células germinativas (espermatogônias, espermátocitos, espermátide e espermatozoides) onde os estágios iniciais se observam na região apical folicular e os cistos com células germinativas mais maduras na região posterior, a partir da qual os espermatozoides maduros chegam à vesícula seminal (no ducto deferente) através do curto ducto eferente. Padrão este observado na maioria das famílias de besouros (Alzahrani et al., 2013; Koçakoglu et al., 2019). As glândulas acessórias do sistema reprodutor masculino em coleópteros possuem

uma ampla variedade de diferenças com relação ao número e forma (Barker, 1989; Wu et al., 2017). Estas glândulas estão associadas à formação de fluido espermático e, em muitas espécies, à formação de espermatóforos (Gillott, 2005; Klowden, 2008). Em *E. connexa*, dois pares de glândulas com características histológicas e conteúdo diferenciados foram encontradas. Como nesta espécie não há elaboração de espermatóforo, a função destas glândulas no caso é a produção de fluido espermático.

Em relação ao sistema reprodutor feminino (SRF), *E. connexa* exhibe também o padrão geral observado em outros coccinelídeos: um par de ovários formados por vários ovaríolos que se juntam aos oviductos laterais, os quais terminam, posteriormente, no oviducto comum que se conecta à espermateca através do ducto espermatecal (Katakura et al., 2014). As características da espermateca em forma de C e do infundibulum de "T" foram semelhantes a outras espécies do gênero *Eriopis* (González, 2014; Bustamante et al., 2007), porém mostra pequenas diferenças como relação à coloração e forma.

Maffei et al. (2001) reportaram que para esta espécie cada ovário era formado por quatro ovaríolos. Contudo, em todas as fêmeas aqui examinadas observamos em cada ovário de 12 a 17 ovaríolos. Não é compreensível por que aqueles autores citaram quatro ovaríolos, pois ao observar a Fig. 3 no referido trabalho é possível perceber que o número foi subestimado. No oviducto comum não foram encontradas glândulas acessórias como reportado para outras espécies pertencentes à Coccinellidae (Katakura et al., 2014). O tipo de ovário foi meroístico telotrófico como reportado por Maffei et al. (2001) e também observado em outros coleópteros (Boning, 1994; Mathias et al., 2011), com as oogônias na região apical (trofário) e oócitos na região basal (vitelário) circundados por epitélio formado por uma bicamada celular. A glândula espermatecal formada por conjuntos de células secretoras cada uma com um canalículo desembocando em reservatório comum, o que é semelhante àquela observada na maioria dos insetos (Pascini & Martins, 2017).

Como conclusão, neste trabalho mostramos que em *E. connexa*, diferentemente do que foi descrito, o SRM apresenta glândulas acessórias como na maioria dos insetos. Já nas fêmeas cada um dos dois ovários é formado por 12 a 17 ovaríolos e não apenas quatro como reportado. Ainda, este estudo permitiu fornecer informações histológicas dos sistemas reprodutivos masculino e feminino que poderão

ser relevantes para futuros estudos sobre a sistemática e/ou a biologia reprodutiva dessa espécie de joaninha.

Referências

- Alzahrani, A.M., Abdelsalam, S.A., Elmenshawy, O.M. Abdel-Moneim, A.M. (2013). Ultrastructural characteristics of spermiogenesis in *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). Florida Entomologist, 96(4), 1463-1469.
- Barker, G.M. (1989). Functional anatomy of the reproductive system of *Listronotus bonariensis* (Kuschel). New Zealand Entomologist, 12(1), 34-42.
- Büning, J. (1994). The insect ovary. Ultrastructure, previtellogenic growth and evolution. Chapman & Hall.
- Bustamante-Navarrete, A., Fuentes, G. Ramos, A.O. (2007). Revision y descripción de algunas especies de *Eriopsis* (Coleoptera: Coccinellidae) del Perú. Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa, 41, 67-72.
- Dallai, R., Lino-Neto, J., Dias, G., Nere, P., Mercati, D., upetti, P. (2018). Fine structure of the ladybird spermatozoa (Insecta, Coleoptera, Coccinellidae). Arthropod structure & development, 47 (3), 286-298.
- Ehara, S. (1952) Comparative anatomy of the genitalia and the internal reproductive organs of ladybeetles belonging to *Epilachna*: (systematic studies of Coccinellidae, I). Journal of Faculty Science Hokkaido University, 11, 21-33.
- Gillott, C. (2005). Entomology (Third ed.). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- Giorgi, J. A., N. J. Vandenberg, J. V. McHugh (2009). The evolution of food preferences in Coccinellidae. Biological Control 51, 215-231
- Gonzales, G.F. (2014). Especies nuevas del género *Eriopsis* Mulsant (Coleoptera: Coccinellidae) del norte de Chile. Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa. 306, 61-72.
- Katakura, H. Nakano, S., Hosogai, T., Kahono S. (1994) Female internal reproductive organs, modes of sperm transfer, and phylogeny of Asian Epilachninae (Coleoptera: Coccinellidae), Journal of Natural History, 28(3), 577-583.
- Jaglarz, M.K., Bilinski, S.M (1998). Organization of the egg chambers in Hydradephaga (Insecta, Coleoptera-Adephaga) and its phylogenetic significance. Folia Biologica. 46, 55-60.
- Klowden, M.J. (2008). Physiological systems in insects. Beijing: Science Press.
- Koçakoğlu, N., Güllü, M. (2019). The histomorphological structure of the male reproductive system of maize leaf weevil *Tanymecus dilaticollis* Gyllenhal, 1834 (Coleoptera: Curculionidae). Microscopy Research and Technique. 82. 10.1002/jemt.23286.

- Maffei, E., Fragoso, D., Pompolo, S. & Serrão, J. (2001). Morphological and Cytogenetical Studies On the Female and Male Reproductive Organs of *Eriopis connexa* Mulsant (Coleoptera, Polyphaga, Coccinellidae). *Netherlands Journal of Zoology*, 5, 483-496.
- Magro, A., Lecompte, E., Magné, F., Hemptinne, J.L. & Crouau-Roy, B. (2010). Phylogeny of ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae): Are the subfamilies monophyletic? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(3), 833-848.
- Magro, A.E., Lecompte, F., Magne, J.L., Hemptinne. & Crouau-Roy, B. (2010). Phylogeny of ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae): are the subfamilies monophyletic? *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 54, 833 - 848.
- Majerus, M.E.N. (2016). *The Structure of Ladybirds. A Natural History of Ladybird Beetles*, University of Cambridge. 15-48.
- Mathias, M., Sánchez, P., Denardi, S., Caetano, F. (2010). *Rhyncophorus palmarum* L. (Linnaeus, 1758): A Morphological and Histological Study of the Female Reproductive System. *Microscopy research and technique*. 74. 10.1002/jemt.20969.
- Nedvěd, O. & Kovář, I. (2012). *Phylogeny and Classification. Ecology and Behaviour of the Ladybird Beetles (Coccinellidae)*, First Edition. I. Hodek, H.F. van Emden, A. Honeřk.1-12. doi:10.1002/9781118223208.ch1.
- Pascini, T.V. & Martins, G.F. (2017). The insect spermatheca: an overview. *Zoology*, 121, 56-71.
- Rodrigues, A.R.S., Spindola, A.F., Torres, J.B., Siqueira, H.A.A. & Colares, F. (2013a). Response of different populations of seven lady beetle species to lambda-cyhalothrin with record of resistance. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 96, 53-60.
- Rodrigues, A.R.S., Torres, J.B., Siqueira, H.A.A. & Lacerda, D.P.A. (2013b). Inheritance of lambda-cyhalothrin resistance in the predator lady beetle *Eriopis connexa* (Germar) (Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Control* 64, 217-224.
- Rodrigues, A.R.S., Ruberson, J., Siqueira, H. & Scott, J. (2013c). Pyrethroid resistance and its inheritance in a field population of *Hippodamia convergens* (Guérin-Méneville) (Coleoptera: Coccinellidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 105, 135-143.
- Seago, A.E., Giorgi, J.A., Li, J. & Ślipiński, A. (2011). Phylogeny, classification and evolution of ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae) based on simultaneous analysis of molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 60 (1): 137-351.
- Torres, J.B., Rodrigues, A.R.S., Barros, E.M. & Santos, D.S. (2015). Lambda-cyhalothrin resistance in the lady beetle *Eriopis connexa* (Coleoptera: coccinellidae)

conferstolerance to other pyrethroid. *Journal of Economic Entomology*. 108, 60-68.

Wu, Y.F., Wei, L.S., Torres, A., M., Zhang, X., Wu, S.P. & Chen, H. (2102). Morphology of the male reproductive system and spermiogenesis of *Dendroctonus armandi* Tsai and Li (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Journal of Insect Science*, 17(1), 1-9.

4 CAPÍTULO 3

Anatomia dos sistemas reprodutores *Coleomegilla maculata* e *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae)

Anatomia dos sistemas reprodutores de *Coleomegilla maculata* e *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae)

Diego Andres Bolivar Silva¹; Paulo Henrique Rezende¹; José Lino-Neto²

¹Departamento de Entomologia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa-MG, Brasil.

²Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa-MG, Brasil.

E-mail: dabolivars@ufv.br

Resumo

Neste trabalho descrevemos e comparamos anatomicamente os sistemas reprodutores masculinos (SRM) e femininos (SRF) de *Coleomegilla maculata* e *Harmonia axyridis*, com o fim de achar diferenças anatômicas e morfológicas entre uma espécie invasora e uma nativa da região. Indivíduos destas duas espécies foram dissecados e seus sistemas reprodutores descritos. Os sistemas reprodutores das duas espécies mostraram o padrão geral básico observado nos besouros em geral. *H. axyridis* apresentou, em cada um dos dois testículos, o maior número de folículos (23), seguida de *C. maculata* (13). Todas elas mostraram, além dos testículos, um par de ductos deferentes e dois pares de glândulas acessórias, todos desembocando na extremidade anterior do ducto ejaculatório. O SRF possui dois ovários formados por 24 ovaríolos em *H. axyridis*, e 14 em *C. maculata*. Os ovaríolos de cada ovário conectam a um oviducto lateral e, os dois oviductos laterais, desembocam no oviducto comum. Ainda, em cada espécie observou-se uma espermateca, e sua respectiva glândula, conectada ao oviducto comum por meio do ducto spermatecal. Em *H. axyridis*, diferentemente das outras duas espécies, foi observado um par de glândulas laterais associado a base do oviducto comum. O maior número de folículos e ovaríolos de *H. axyridis*, e a presença de glândulas no final do oviducto comum, indicaria uma vantagem para sua ampla capacidade de colonizar ambientes e seu alto desempenho reprodutivo.

Palavras-chave: testículos, ovários, glândulas acessórias, aedeagus, coccinelídeos.

Abstract

In this work, we discover and anatomically compare the male (SRM) and female (SRF) reproductive systems of *Coleomegilla maculata* and *Harmonia axyridis*, as to determine anatomical and morphological differences between an invasive species and a native of the region. Individuals of these two species foram dissected and their reproductive systems described. The reproducing systems of two species will show the basic general pattern observed in general. *H. axyridis* showed, in each of two testicles, or a greater number of follicles (23), followed by *C. maculata* (13). All of them will show, at the same time, two testes, a pair of deferens vases, and two pairs of accessory glands, all leading to the anterior extremity of the ejaculatory duct. O SRF has two ovaries formed by 24 ovaries in *H. axyridis*, and 14 in *C. maculata*. The ovaries of each ovarian connect to a lateral oviduct, and the two laterals oviducts open to the common oviduct. In addition, in each species observed there is a spermatheca, and its respective gland, connected to the common oviduct by means of the sperm duct. In *H. axyridis*, differently from the other two species, a pair of lateral glands associated with the common oviduct was observed. A higher number of follicles and ovarioles of *H. axyridis*, and the presence of glands at the end of the common oviduct, would indicate an advantage for its wide capacity to colonize environments and its high reproductive performance.

Keywords: testes, ovaries, accessory glands, aedeagus, coccinellids.

Introdução

Os Coccinellidae compreendem aproximadamente 6000 espécies descritas pertencentes a 360 gêneros distribuídos ao redor do mundo (Nedvěd and Kovár, 2012). A monofilia da família é bem suportada, contudo dependendo do autor os 360 gêneros estão distribuídos em duas, seis ou sete subfamílias. Sasaji (1968) considerou seis subfamílias (Chilocorine, Coccidulinae, Coccinellinae, Epilachninae, Scymninae e Sticholotinae), enquanto Kovář (1996) reconheceu sete subfamílias, adicionando Ortaliinae. Já Seago et al. (2011) acharam que não há justificativa para distribuir os coccinélídeos em seis subfamílias como tradicionalmente tem sido e propuseram apenas duas: Microweisinae Leng 1920 e Coccinellinae Latreille, 1807. De qualquer modo, desde o estabelecimento de Coccinellidae, diversos sistemas de classificação têm sido propostos, porém ainda não existe consenso sobre as relações entre suas principais linhagens (Ślipiński 2007; Seago et al. 2011).

Coleomegilla maculata, popularmente conhecida como joaninha malhada, é um

coccinélídeo nativo da América do Norte. Suas larvas e adultos se alimentam principalmente de pulgões e têm sido usadas como um agente de controle biológico. *Harmonia axyridis* é uma espécie polífaga de origem asiática que tem sido introduzida deliberadamente em vários países para controle biológico de diferentes pragas de artrópodes, principalmente pulgões. Contudo, ela é um predador intraguilda, competindo por alimento com as espécies nativas de joaninhas, por isso tornando-se uma espécie invasora (Martins et al. 2009).

Dentro da família Coccinellidae, existem trabalhos sobre a descrição da anatomia externa do aparelho genital de uma ampla variedade espécies em diferentes subfamílias. Para o gênero *Harmonia*, Chapin e Brou (1991) descreveram o aedeago e a espermateca para a espécie *H. axyridis* (Pallas). Enquanto para o gênero *Coleomegilla* existe descrição detalhada da genitália para as espécies *C. maculata* (DeGeer), *C. quadrifasciata* (Schönherr) e *C. timberlake* (González) (González, 2014; Gordon, 1985). Embora a genitália externa deste grupo seja meticulosamente documentada, estudos sobre a anatomia interna do sistema reprodutor masculino e feminino para estes gêneros ainda são escassos ou inexistentes. O objetivo deste trabalho foi descrever e comparar a anatomia interna dos sistemas reprodutores em *H. axyridis* e *C. maculata* a fim de fornecer informação para futuros trabalhos de taxonomia, filogenia, biologia reprodutiva e estabelecer diferenças que possam explicar o sucesso reprodutivo e de colonização de *H. axyridis*, desse sendo as duas espécies importantes insetos predadores com grande importância econômica e ecológica.

Material e métodos

Insetos

Machos e fêmeas adultos de *C. maculata* e *H. axyridis* foram coletados entre julho e agosto de 2019 no Vale da Agronomia (*campus* UFV) da cidade de Viçosa, MG, Brasil.

Métodos

Para a anatomia do sistema reprodutor masculino (SRM) e feminino (SRF), machos e fêmeas adultos (n = 6) de cada espécie, foram dissecados em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M e pH 7,2 (PBS) e extraído o sistema reprodutor. Em seguida estes foram fixadas por 24 horas em solução de glutaraldeído a 2,5% no mesmo tampão. Posteriormente, as amostras foram fotografadas com uma câmera AxioCam MRc acoplada a um microscópio estereoscópio Zeiss Discovery V-20. A partir dessas imagens, as mensurações das glândulas e ductos tanto masculinos quanto femininos foram feitas utilizando o software *ImageJ* (disponível em <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Após a obtenção das imagens, o número de folículos de cada testículo no caso dos machos e de ovariolos em cada ovário das fêmeas foi contado. A descrição anatômica geral do sistema reprodutor foi realizada tanto para machos quanto para fêmeas a partir também das imagens, as quais foram editadas usando o programa Adobe Photoshop CS5.

Resultados

Sistema reprodutor masculino

O SRM de *C. maculata*, contém um par de testículos de cor branca, o número de folículos por testículo varia de 11 a 15 com média igual a 13,1. Os testículos estão dispostos lateralmente e se juntam na base ao ducto deferente (Fig. 1A) com comprimento médio de 7,4. A porção proximal aos testículos dos ductos deferentes é dilatada, formando as vesículas seminais; e na base, se liga ao bulbo do ducto ejaculatório (Fig. 1A). Neste bulbo chegam dois pares de glândulas acessórias que são brancas e finas com um comprimento médio de 9,1 mm (Fig. 1A). O ducto ejaculatório possui um comprimento médio de 5,5 mm e, posteriormente, se associa ao aedeagus que é esclerotizado e com duas porções distinta: a apical delgada e flexível e a basal curvada em forma de 'C' (Fig. 1C).

O SRM de *H. axyridis* (Fig. 1B) segue o padrão básico observado na espécie anterior: um par de testículos com os folículos dispostos lateralmente, dos quais saem os ductos deferentes (média 7,8 mm) que tem as vesículas seminais e terminam, juntamente como as quatro longas glândulas acessórias (9,3 mm) em um ducto ejaculatório único (média 6,2 mm). Este se associa a um aedeagus bastante curvo em forma de C (Fig. 1D). A diferença mais conspícua do SRM dessa espécie para

anteriores para *C. maculata* é o número de folículos por testículo, pois nesta foi observado a média de 21,8 folículos, variando de 18 a 28.

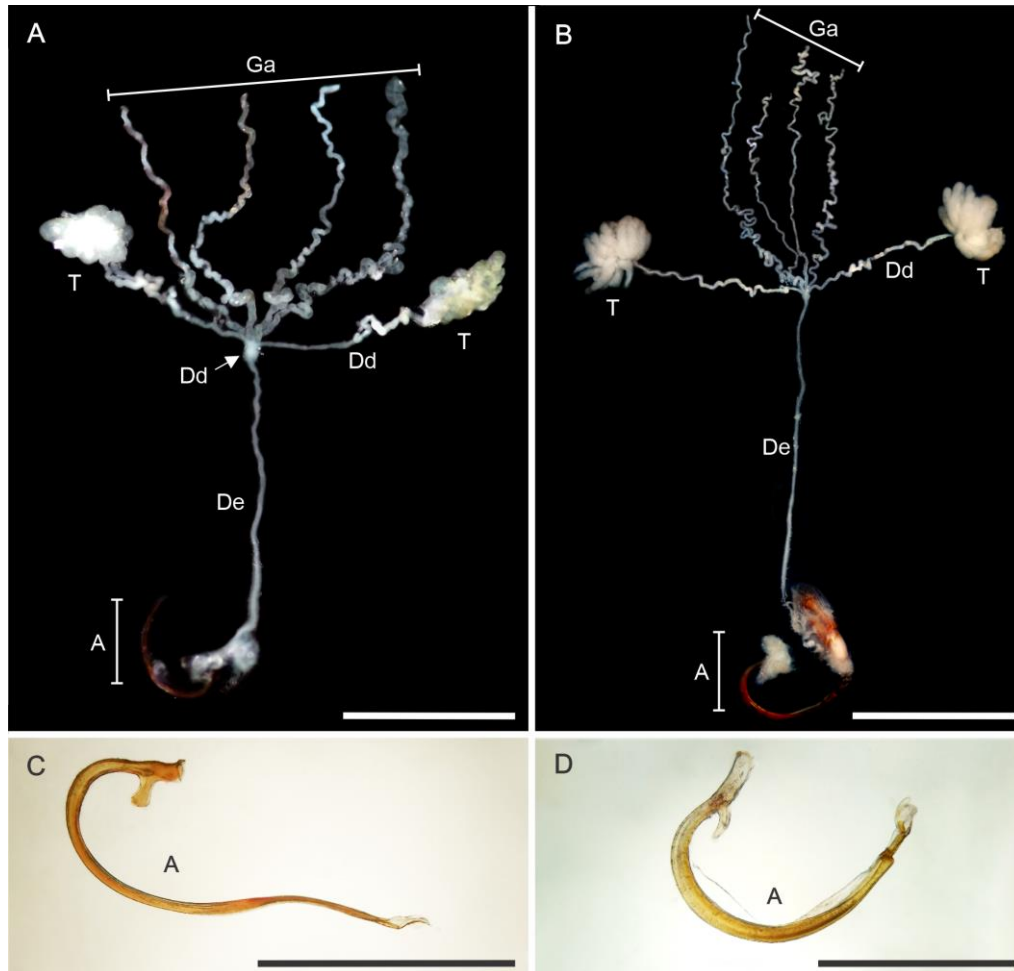


Figura 1. Sistema reprodutor masculino de *Coleomegilla. maculata* (A) e *Harmonia. axyridis* (B) exibindo um par de testículos (T), ductos deferentes (Dd), dois pares de glândulas acessórias (Ga), ducto ejacutório (De) e aedeago (A). observa-se a presença de bulbo ejacutório (Be) para *C. maculata* (B). C-D Detalhe do aedeago *C. maculata* e *H. axyridis* respectivamente. Barras: A-C= 2 mm; C-F = 1mm.

Sistema reprodutor feminino

Os SRF de *C. maculata* (Fig. 2A) é formado por um par de ovários, os quais estão compostos por 8 a 16 ovariolos (média de 13,9). Os ovariolos são de coloração branca, alongados e em sua porção apical são conectados por filamentos terminais. Eles se juntam aos oviductos laterais, e estes se unem a um oviducto comum curto. À porção mediana do oviducto comum está ligada a espermoteca através do ducto

espermatecal. As espermateca é bastante esclerotizada e marrom clara, em forma aproximadamente de L com a porção final dilata (Fig. 2C).

Em *H. axyridis* o sistema reprodutor (Fig. 2B) é bastante semelhante ao de *C. maculata*: dois ovários, dois oviductos laterais que terminam e um oviducto comum ao qual desemboca a espermateca por meio do ducto espermatecal. Contudo, ele se diferencia da outra espécie por apresentar em média 24,5 (19 a 27) folículos por testículo; ter a espermateca em forma de C e consideravelmente maior (Fig. 2D) e; principalmente por exibir um par de glândulas bem desenvolvidas associado à extremidade posterior do oviducto comum (Fig. 2B).

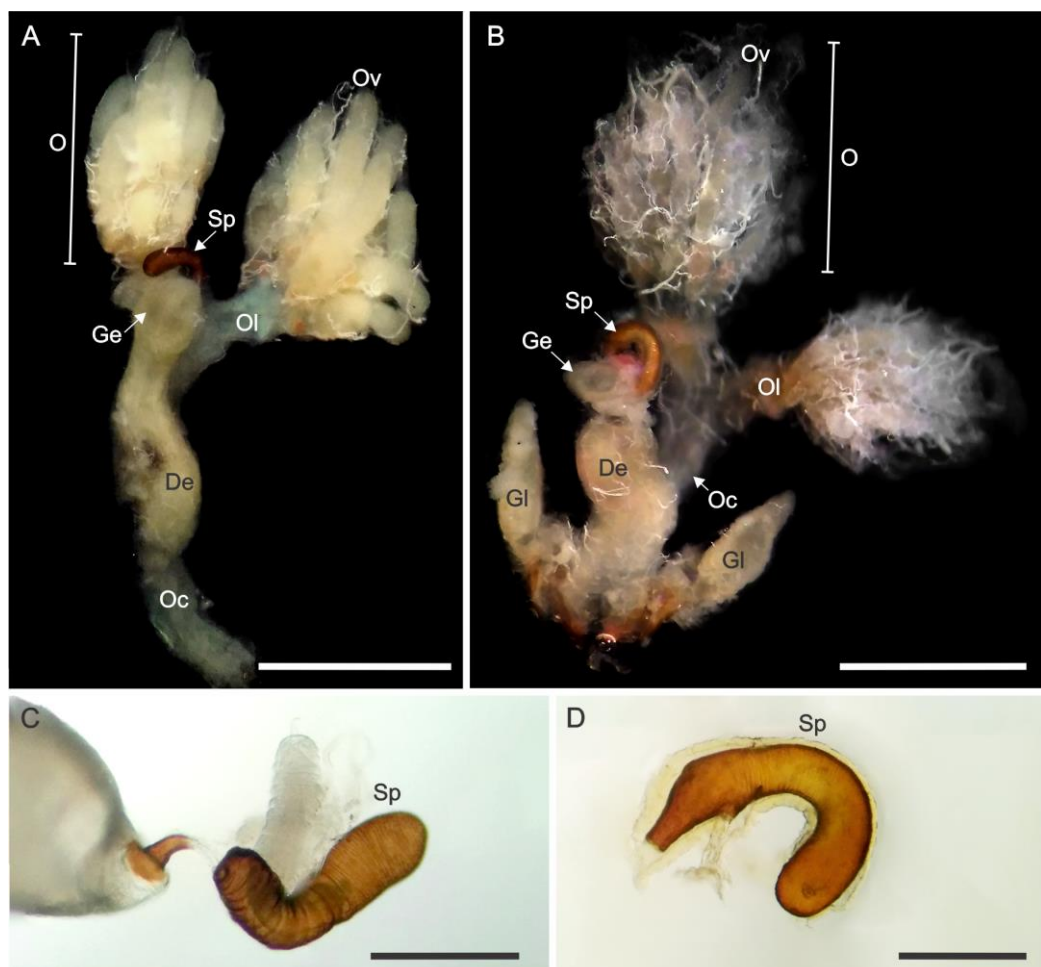


Figura 2. Sistema reprodutor feminino (SRF), *C. maculata* (A) e *H. axyridis* (B) exibindo um par de ovários (O), ovariolos (Ov), oviductos laterais (Ol), oviducto comum (Oc), ducto espermatecal (De), glândula espermatecal (Ge) e espermateca (Sp). Observa-se na base do oviducto comum as glândulas laterais (Gl). Detalhe da textura e cor da espermateca para *C. maculata* (C) e *H. axyridis* (D). Barras: A-C= 2 mm; C-F = 500 μ m.

Discussão

O SRM das duas espécies exibe o padrão típico para os coccinelídeos, constituído de um par de testículos com vários folículos em forma de tufo, dois pares de glândulas acessórias longas e finas que desembocam no ducto ejaculatório juntamente com os dois ductos deferentes (Ehara, 1952). Apesar destas similitudes, diferenças inerentes a cada espécie foram encontradas. *H. axyridis* foi a espécie que mostrou o maior número de folículos por testículo, enquanto *C. maculata* o menor. Adicionalmente, *C. maculata* tem um bulbo ejaculatório proeminente que não é presente em *H. axyridis*.

Com relação as glândulas acessórias, as duas espécies exibem um padrão geral e não foi observado diferenciação na cor nem na forma. Os aedeagos foram diferenciados e facilmente reconhecíveis em cada espécie, por exemplo, *C. maculata* apresentou uma porção basal marrom e delgada, com apenas uma porção curva, já *H. axyridis* essa estrutura é mais espessa, rígida e em forma de C. Essas características dos aedeagos se assemelham às descrições realizadas para cada gênero por Bustamante (2007), Gordon (1985) e Chapin & Brou (1991).

No SRF, observa-se nas duas espécies estudadas, o padrão geral anatômico observado em outros coccinelídeos; um par de ovários formados por vários ovariolos que se juntam aos oviductos laterais conectados posteriormente ao oviducto comum e, por sua vez, este ducto se junta à espermateca através do ducto espermatecal (Katakura et al., 1994, Marzo, 2008). Foram observadas diferenças no número de ovariolos, sendo que *C. maculata* possui menor número de ovariolos por ovário e *H. axyridis* o maior. As espermatecas das espécies exibiram características que podem ser úteis para diferenciar cada espécie; a textura, coloração, tamanho e formato. *C. maculata* e *H. axyridis*, as espermatecas se apresentaram com coloração marrom claro, e em forma de “L” em *C. maculata* e de “C” em *H. axyridis*. Ainda nesta última, a superfície da espermateca é lisa, não rugosa como acontece em *C. maculata*.

É importante observar que, *H. axyridis* foi a que apresentou o maior número de folículos por testículos (~ 22) e de ovariolos por ovário (~ 25), a maior espermateca e, mais notável, um par de glândulas bem desenvolvidas associado à extremidade posterior do oviducto comum. Facilmente é possível supor que este maior número ou tamanho de estruturas está relacionado à uma maior capacidade reprodutiva dessa

espécie. Pois machos e fêmeas podem produzir mais gametas ao longo da vida reprodutiva por terem mais folículos e ovários, respectivamente. Ainda, as glândulas associadas ao oviducto provavelmente produzem substâncias que, por sua localização, podem estar envolvidas na proteção de ovos contra predadores e/ou parasitoides, dissecação ou ainda maior adesão deles ao substrato. Tudo isso afetaria positivamente a reprodução nessa espécie, podendo ser mais um fator responsável pelo seu rápido crescimento populacional observado e o deslocamento das espécies nativas de Coccinellidae. Brown et al. (2008) disseram que, “em um período muito curto, é provável que *H. axyridis* se torne um dos coccinélidos mais amplamente distribuídos na Europa”. Pelos resultados de levantamentos feitos em algumas regiões, pode-se dizer o mesmo para o Brasil (Martins et al. 2009).

Referências

- Bustamante-Navarrete, A., Fuentes, G., Ramos, A., O. (2007). Revision y descripción de algunas especies de Eriopis (Coleoptera: Coccinellidae) del Perú. Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa. 41: 67–72.
- Chapin, J.B., Brou, V.A. (1991). *Harmonia axyridis* (Pallas), the third species of the genus to be found in the United States (Coleoptera: Coccinellidae). Proceedings of the Entomological Society of Washington. 93: 630–635.
- Ehara, S. (1952) Comparative anatomy of the genitalia and the internal reproductive organs of ladybeetles belonging to Epilachna: (systematic studies of Coccinellidae, I). Journal of Faculty Science Hokkaido University, 11: 21–33.
- Escalona, H.E., Zwick, A., Li, H.S., Li, J., Wang, X., Pang, H. & Tomaszewska, W. (2017). Molecular phylogeny reveals food plasticity in the evolution of true ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae: Coccinellini). BMC Evolutionary Biology, 17(1). doi:10.1186/s12862-017-1002-3.
- Gordon, R.D. (1985). The Coccinellidae (Coleoptera) of America north of Mexico. Journal of the New York Entomological Society, 93(1): 1–912.
- Katakura, H., Nakano, S., Hosogai, T. & Kahono, S. (1994) Female internal reproductive organs, modes of sperm transfer, and phylogeny of Asian Epilachninae (Coleoptera: Coccinellidae), Journal of Natural History, 28(3): 577–583.
- Kovář I. (1996). Phylogeny. Ecology of Coccinellidae (ed. by I. Hodek and A. Honek), pp. 19–31. Kluwer Academic, Dordrecht.
- Magro, A., Lecompte, E., Magne, F., Hemptinne, J.L., Crouau-Roy, B. (2010). Phylogeny of ladybirds (Coleoptera: Coccinellidae): are the subfamilies monophyletic? Molecular Phylogenetics and Evolution. 54: 833–848.
- Majerus, M.E.N., Sloggett, J.J., Godeau, J.F. & Hemptinne, J.L., (2007). Interactions between ants and aphidophagous and coccidophagous ladybirds. Popul. Ecol. 49: 15–27.

- Martins, C.B.C., Almeida, L.M., Zonta-de-Carvalho, R.C., Castro, C.F. & Pereira R.A. (2009). *Harmonia axyridis*: a threat to Brazilian Coccinellidae?. *Revista Brasileira de Entomologia* 53(4): 663–671.
- Marzo, L.D. (2008). Studio sulla diversità anatomica della spermateca nei coleotteri. *Entomologica, Bari*, 41: 13–76.
- Nedvěd, O. & Kovář, I. (2012). *Phylogeny and Classification. Ecology and Behaviour of the Ladybird Beetles (Coccinellidae)*, First Edition. I. Hodek, H.F. van Emden, A. Honečk. 1-12. doi:10.1002/9781118223208.ch1.
- Rodrigues, A.R.S., Torres, J.B., Siqueira, H.A.A. & Lacerda, D.P.A. (2013b). Inheritance of lambda-cyhalothrin resistance in the predator lady beetle *Eriopis connexa*(Germar) (Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Control* 64, 217–224.
- Sasaji H. 1968. Phylogeny of the family Coccinellidae (Coleoptera). *Etizenia, Occasional Publications of the Biological Laboratory, Fukui University*, 35: 1–37.
- Seago A.E., Giorgi J.A., Li J., Ślipiński A. (2011). Phylogeny, classification and evolution of ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae) based on simultaneous analysis of molecular and morphological data. *Mol. Phylogenetic Evolution*. 60: 137–351.
- Ślipiński S.A. 2007. *Australian Ladybird Beetles (Coleoptera: Coccinellidae): Their Biology and Classification*. Australian Biological Resources Study, Canberra.
- Spíndola, A.F., Silva-Torres, C.S.A., Rodrigues, A.R.S., Torres, J.B., 2013. Survival and behavioural responses of the predatory ladybird beetle, *Eriopis connexa* populations susceptible and resistant to prethroid insecticide. *Bulletin of entomological research*. 103: 485–494.

5 CONCLUSÕES

As populações resistentes de *E. connexa* possuem maturação sexual precoce em termos de maturação da vesícula seminal, cópula e potencialmente maior sucesso reprodutivo ao serem comparadas com as populações suscetíveis. Para esta espécie também foi realizada uma descrição detalhada da anatomia e histologia do sistema reprodutor masculino e feminino de. As principais diferenças com a descrição anterior do sistema reprodutor foi a presença de glândulas acessórias nos machos como ocorre nos besouros em geral. Enquanto nas fêmeas, a média de 15 ovariolos por ovário, foi bem maior do que foi descrita para esta espécie. Finalmente, ao comparar a anatomia do sistema reprodutor da espécie nativa *Coleomegilla maculata* e a invasora *Harmonia axyridis*, o maior número de folículos dos machos e ovariolos das fêmeas em *H. axyridis*, e a presença de glândulas no final do oviducto comum, indicaria uma vantagem na capacidade de aumentar seu desempenho reprodutivo e colonizar maior número de habitats.