

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Ocorrência de poliandria na broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)

Camila Moreira Costa

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Entomologia

**Piracicaba
2014**

Camila Moreira Costa
Engenheira Agrônoma

Ocorrência de poliandria na broca-do-café, *Hypothenemus hampei*
(Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ MAURÍCIO SIMÕES BENTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestra em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

Piracicaba
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Costa, Camila Moreira

Ocorrência de poliandria na broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) / Camila Moreira Costa. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2014.
64 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.
Bibliografia.

1. Café 2. Sistemas de acasalamento 3. Poliandria 4. *Hypothenemus hampei*
I. Título

CDD 633.73
C937o

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Gliceria e Luis Carlos, pelo amor incondicional

Ao meu amor, Antonio Pires de Camargo

AGRADECIMENTOS

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela oportunidade e estrutura disponibilizada para a realização do mestrado.

A FAPESP, processo nº 2012/16391-6, pela concessão da bolsa de mestrado e auxílio financeiro para a realização deste projeto.

Ao Prof. Cláudio Franco pelos conhecimentos transmitidos e pela confiança em mim depositada possibilitando um excelente oportunidade de estágio, que resultou nesta conquista.

Ao Professor José Maurício Simões Bento pela confiança, apoio e dedicação durante o mestrado.

Aos professores do departamento de Entomologia ESALQ/USP pelo conhecimento repassado.

Ao doutorando, Weliton Dias da Silva, pelo apoio durante o estágio e o mestrado. Obrigada pela orientação e por compartilhar os seus conhecimentos.

Aos agrônomos Luiz Spezzia, Marcelo Henrique Palmieri (Cooperativa Regional de Cafeicultores em Guaxupé) e Leonardo Campos (Coopercitrus) pela disposição em coletar frutos de café que foram essenciais na realização deste trabalho.

Ao Dr. Oliveira Guerreiro Filho do Instituto Agronômico de Campinas (IAC) (Centro de Café “Alcides Carvalho”) por disponibilizar as áreas de cultivo de café para coleta de broca.

A Luiz Henrique Mota e Marisol Jaramillo pela companhia nas diversas viagens e coletas de café a campo.

A Renata Morelli pela enorme ajuda e disposição para realizar as análises estatísticas.

A Rejane Kuss Roggia por estar sempre disposta a responder minhas dúvidas e me ajudar com o que fosse preciso.

Aos demais colegas do Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos pelo companheirismo durante a realização deste trabalho.

A Antonio Pires de Camargo por estar sempre ao meu lado. Obrigada pela compreensão, amizade e carinho. Te amo hoje e sempre!

“Don't limit yourself. Many people limit themselves to what they think they can do. You can go as far as your mind lets you. What you believe, remember, you can achieve”

Mary Kay Ash

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	17
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Acasalamento	23
2.2 Sistemas de Acasalamento.....	23
2.2.1 Poliandria.....	26
2.3 Exemplos da importância do estudo dos sistemas de acasalamento em insetos.....	28
2.4 Broca-do-café	29
2.4.1 Aspectos bioecológicos	29
2.4.2 Aspectos do comportamento reprodutivo de <i>Hypothenemus hampei</i>	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Criação dos insetos	35
3.2 Obtenção dos insetos para a realização dos experimentos.....	36
3.3 Ocorrência de poliandria em fêmeas de <i>Hypothenemus hampei</i>	36
3.4 Efeito de múltiplos acasalamentos sobre os aspectos bioecológicos de fêmeas de broca-do-café e de sua prole.....	39
3.5 Análise estatística	41
4 RESULTADOS.....	43
4.1 Ocorrência de poliandria em fêmeas de <i>Hypothenemus hampei</i>	43
4.2 Efeito de múltiplos acasalamentos sobre os aspectos bioecológicos de fêmeas de broca-do-café e de sua prole.....	44
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXO.....	61

RESUMO

Ocorrência de poliandria na broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)

Estudos relacionados ao sistema de acasalamento nos insetos permite a compreensão dos aspectos evolutivos do comportamento reprodutivo de uma espécie. Esses sistemas são classificados, geralmente, pelo número de parceiros sexuais de um indivíduo durante um período de acasalamento. Em fêmeas, pode ocorrer monogamia, quando a cópula for realizada com somente um macho e, poliandria, quando há ocorrência de múltiplas cópulas com machos diferentes ou com o mesmo macho (cópulas repetidas). Em espécies como a broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, que passam a maior parte de sua vida (ovo a adulto) no interior do fruto de café e possuem ciclo multivoltino os estudos envolvendo o sistema de acasalamento são escassos. Portanto, este trabalho visou estudar o acasalamento da broca-do-café, avaliando se há ocorrência de poliandria e os possíveis efeitos de múltiplas cópulas e cópulas repetidas sobre a bioecologia da fêmea e sua prole. Os resultados revelaram pela primeira vez a ocorrência de poliandria em *H. hampei*. Foi observado um maior número de recópulas em fêmeas colonizadoras, quando comparado com as fêmeas em oviposição, sugerindo que a condição fisiológica da fêmea foi um fator decisivo no momento da recópula. Além disso, a duração da recópula foi menor nas fêmeas em oviposição do que em fêmeas colonizadoras. A fecundidade foi afetada negativamente pela poliandria, sugerindo a presença de um custo associado a realização de múltiplas cópulas. A longevidade não foi influenciada pelo sistema de acasalamento, demonstrando que a poliandria não influenciou o tempo de vida das fêmeas. A recuperação larva:adulto em *H. hampei* não foi influenciada pelo sistema de acasalamento. Por outro lado, a taxa de eclosão de larvas foi superior na condição de poliandria, comparativamente à monogamia.

Palavras-chave: Café; Sistemas de acasalamento; Poliandria; *Hypothenemus hampei*

ABSTRACT

Polyandry occurrence in the coffee berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae)

Researches about insects mating systems are important to understand the aspects of reproductive behavior evolution. Mating systems are usually grouped according to the number of mates during mating. Insect females mating system are classified as monogamy when there is only one copulation per male while polyandry refers to multiple mating with different males or with the same male (repeated mating). There is a lack of researches dealing with mating systems in species like the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, which spend most of its life cycle (egg to adult) inside of the coffee berry and has a multivoltine cycle. This research aimed to study the mating system of *H. hampei* females, verifying the existence of polyandry and evaluating the effects of the multiple and repeated mating on the bioecology of the female and its offspring. The current study showed for the first time the occurrence of polyandry on females of *H. hampei*. The number of remating in colonizing females was higher than in the females under oviposition, thus the female physiological condition is crucial on remating behavior. The copula duration was shorter in females under oviposition than in the colonizing females. Fecundity was negatively affected by polyandry suggesting the existence of costs associated with multiple mating by females. Longevity were not influenced by the mating systems, showing that polyandry does not affect female lifetime. Although egg hatching was superior in polyandry compared to monogamy, the larva:adult recovery rate in *H. hampei* was not affected by the mating system.

Keywords: Coffee; Mating systems; Polyandry; *Hypothenemus hampei*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sequência de acasalamento de casais de broca-do-café, *Hypothenemus hampei*. Retirado de Silva et al., 2012.....33
- Figura 2 - (A) Recipiente plástico com frutos de café infestados e demonstrando a saída de fêmeas colonizadoras de *Hypothenemus hampei*. (B) Recipiente utilizado para criação de *H. hampei* em grãos de café pergaminho. (C) Grãos de café pergaminho infestados por *H. hampei* dentro de um recipiente de criação.....36
- Figura 3 - (A) Tubo de ensaio contendo uma fêmea de broca-do-café, *Hypothenemus hampei* e um pedaço de endosperma em ambos os lados do tubo. (B) Dispositivo experimental utilizado para determinar o momento que as fêmeas se tornaram responsivas a luz (colonizadoras). (C) Detalhe do dispositivo experimental mostrando que metade do tubo permanece no escuro e a outra metade com luz. (D) Parte interna e externa do frasco de poliestireno com grão pergaminho para ovoposição vedado com tecido *voile*38
- Figura 4 - (A) Placa de microtitulação com a presença casais da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* em 20 poços; (B) Detalhe do poço da placa de microtitulação contendo um macho e uma fêmea de *H. hampei* e (C) Dispositivo experimental utilizado para a filmagem dos casais de *Hypothenemus hampei*, demonstrando o ambiente para a filmagem contendo uma câmera filmadora Sony HDSR1239
- Figura 5 - (A) Placas de Petri com marcação separando os ovos obtidos de cada fêmea de *Hypothenemus hampei* por tratamento; (B) Detalhe dos ovos de *Hypothenemus hampei* agrupados, (C) Larvas dispostas no interior da galeria artificial; e (D) Placas de Petri com grãos de café "pergaminho" onde foram transferidas as larvas recém-eclodidas41
- Figura 6 - Frequência de sobrevivência das fêmeas de *Hypothenemus hampei* submetidas à monogamia (A), cópulas repetidas (B), e poliandria (C)....45
- Figura 7 - Processo de beneficiamento do café por via úmida: (A) Frutos de café (*Coffea arabica* L. Var. Catuaí Amarelo); (B) Descascamento e (C) Imersão em água para retirada da mucilagem64

Figura 8 – Diferença entre grão “pergaminho” de origem industrial (A) e grão “pergaminho” beneficiado manualmente em laboratório por via úmida (B), para criação de *Hypothenemus hampei*..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Definição de sistemas de acasalamento segundo Shuster e Wade (2003)	24
Tabela 2 - Número de cópulas (1º macho) e frequência de cópula (%) em fêmeas virgens de <i>Hypothenemus hampei</i>	43
Tabela 3 - Número de recópulas (2º macho) e frequência de recópula (%) de fêmeas de <i>Hypothenemus hampei</i>	44
Tabela 4 - Duração (min.) das cópulas (1º macho) e recópulas (2º macho) em <i>Hypothenemus hampei</i>	44
Tabela 5 - Número de ovos/semana, total de ovos produzidos, taxa de eclosão de larvas e recuperação larva:adulto por fêmea de <i>Hypothenemus hampei</i> submetida à monogamia, cópulas repetidas e poliandria	46

1 INTRODUÇÃO

Os estudos sobre o comportamento de acasalamento de insetos são o primeiro passo para o entendimento dos sistemas de acasalamento em diversas espécies (THORNHILL; ALCOCK, 1983). Sistemas de acasalamento são geralmente descritos baseados no número de cópulas que cada sexo tem em um determinado período, e/ou pela maneira com que os indivíduos obtêm as cópulas associado a características comportamentais (REYNOLDS, 1996). Deste modo, a classificação dos principais sistemas de acasalamento se divide em: monogamia, quando um macho acasala com somente uma fêmea e vice-versa; poliginia, quando um macho acasala com diversas fêmeas e poliandria, quando uma fêmea acasala com diversos machos (KLUG, 2011). A ocorrência de um sistema de acasalamento dentro de uma população é influenciado por diversos fatores, como a capacidade de monopolização dos parceiros sexuais (EMLEN; ORING, 1977), a abundância, qualidade e distribuição espacial e temporal de recursos; a razão de indivíduos sexualmente ativos (Operational Sex Ratios - OSR) e a sincronia de reprodução (KIRKENDALL, 1983).

O estudo da ocorrência de múltiplas cópulas a partir do macho tornou possível compreender a existência de múltiplas cópulas já que cada cópula adicional adquirida resulta em um aumento no sucesso reprodutivo (REYNOLDS, 1996). Entretanto, há uma assimetria entre os sexos, já que as fêmeas podem garantir o seu sucesso reprodutivo maximizando o número de ovos produzidos. Apesar disto, a ocorrência de múltiplas cópulas com machos diferentes (poliandria) ou com o mesmo macho (cópulas repetidas) em fêmeas de diversas espécies não é rara (ARNQVIST; NILSSON, 2000).

A aceitação de múltiplas cópulas envolvem uma série de custos como a aquisição de material espermático desnecessário, tempo gasto no cortejo, cópula e repelência de machos atraídos em períodos de não receptividade, além da maior vulnerabilidade a inimigos naturais e risco de transmissão de patógenos (THORNHILL; ALCOCK, 1983). Entretanto, os benefícios obtidos a partir de múltiplas cópulas parecem superar custos inerentes (THORNHILL; ALCOCK, 1983). Tais benefícios se dividem em duas categorias: material (benefício direto) e genético (benefício indireto). Entre os benefícios materiais estão os presentes nupciais ou benefícios nutricionais via fluidos seminais ou espermatóforo, reabastecimento de

esperma e, em alguns casos, diminuição do risco de predação e fácil acesso aos recursos de uma área (ALCOCK; EICKWORT; EICKWORT, 1977; CAMPBELL, 2005; FEDORKA; MOUSSEAU, 2002; WIKLUND; KARLSSON; LEIMAR, 2001; THORNHILL; ALCOCK, 1983). Benefícios genéticos são vantagens para a próxima geração obtidos via cópula com diversos machos geneticamente diferentes. Diversos modelos teóricos foram baseados no potencial das fêmeas obterem benefícios genéticos: (i) Hipótese “trading-up” (BIRKHEAD; MOLLER, 1993; MOLLER, 1992; NEWCOMER; ZEH; ZEH, 1999); (ii) Hipótese da diversidade da prole (NEWCOMER; ZEH; ZEH, 1999; RIDLEY, 1993); (iii) Hipótese de inibição de endogamia (BRETMAN; NEWCOMBE; TREGENZA, 2009; NEWCOMER; ZEH; ZEH, 1999; TREGENZA; WEDELL, 2002); (iv) Hipótese de evitar incompatibilidade genética (ZEH; ZEH, 2001); (v) Hipótese da qualidade intrínseca do macho (“good sperm”) (MADSEN et al., 1992); e (vi) Hipótese da seleção espermática (“sexy sperm”) (JENNIONS; PETRIE, 2000).

Apesar da importância da compreensão do sistema de acasalamento em insetos, para espécies como a broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) que apresenta características ecológicas e reprodutivas peculiares estes tipos de estudo são escassos. A broca-do-café apresenta ciclo multivoltino e hábito críptico, passando a maior parte de sua vida (ovo a adulto) no interior do fruto de café, o que dificulta o seu estudo e controle (BERGAMIN, 1943).

O processo de colonização da broca inicia com a saída das fêmeas acasaladas do fruto do qual se desenvolveram. Essas fêmeas, conhecidas como fêmeas colonizadoras, são as que iniciam um novo ciclo de infestação no campo (MATHIEU et al., 2001). Este comportamento de abandono do fruto é estimulado por fatores abióticos, tais como temperatura, umidade relativa do ar (BAKER et al., 1992) e luminosidade (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997). Chegando ao fruto, a fêmea inicia a construção de uma galeria que se estende da região da coroa até atingir uma das sementes. Na semente, o inseto alarga a galeria, construindo uma câmara para a deposição de seus ovos (BERGAMIN, 1943). O comportamento de abandono do fruto, depende também do estágio fisiológico do inseto, uma vez que as fêmeas virgens ou as que já ovipositaram, mesmo no fruto nativo, não exibem o comportamento de abandono (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997).

O comportamento reprodutivo da broca-do-café apresenta características compatíveis com a teoria da competição local por cópula (“Local Mate Competition – LMC”). Tal condição é caracterizada pela ocorrência de acasalamento entre irmãos antes da dispersão das fêmeas, além de uma proporção sexual a favor das fêmeas, as quais são capazes de controlar a razão sexual de sua prole enquanto os machos possuem importância secundária. Estudos citológicos mostram que tanto fêmeas quanto machos são geneticamente diploides, porém os machos não expressam nem transmitem um grupo de cromossomos paternos para a progênie. Devido a estas características a broca é considerada funcionalmente haplodiplóide (BORSA; KJELLBERGT, 1996; BRUN et al., 1995).

A partir da escassez de estudos envolvendo o comportamento reprodutivo da broca-do-café, associado as características ecológicas e comportamentais peculiares desta espécie, o presente trabalho visou estudar o sistema de acasalamento da broca-do-café, avaliando a ocorrência de poliandria e os possíveis efeitos de múltiplas cópulas e cópulas repetidas sobre aspectos bioecológicos da fêmea e de sua prole.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Acasalamento

O acasalamento é uma das interações comportamentais executadas pelos insetos da mesma espécie, visando à transferência de material espermático dos machos para as fêmeas (ARNQVIST; NILSSON, 2000; TRIPLEHORN, 2011).

As fases do comportamento de acasalamento são divididas em encontro sexual, corte e cópula. O encontro sexual é baseado na necessidade dos indivíduos de encontrarem parceiros receptivos do sexo oposto para fins de acasalamento. Para isso, são utilizados sinais químicos para a agregação de indivíduos em um local específico, ou para atração sexual propriamente dita, podendo também ser utilizados sinais auditivos ou luminosos. A corte ocorre após o encontro do macho e da fêmea, sendo o macho responsável pelo maior desempenho, em busca da aceitação. A corte pode apresentar diferentes funções como facilitar a transferência do espermatóforo ou permitir que a fêmea se comunique com o macho se mostrando ou não receptiva. A capacidade das fêmeas em distinguir os sinais de corte evita a cópula com machos de outras espécies e também pode auxiliar na escolha de indivíduos que se mostrem mais adequados. E finalmente, a cópula é o resultado de um acasalamento bem sucedido (TRIPLEHORN, 2011).

2.2 Sistemas de Acasalamento

O termo sistemas de acasalamento se refere à estratégia comportamental empregada na obtenção de parceiros sexuais sendo descrito, geralmente, baseado no: (i) número de cópulas que cada sexo tem em um determinado período, e/ou (ii) pela maneira que os indivíduos obtêm as cópulas associado as características comportamentais ligadas a dinâmica de acasalamento

Considerando o número de cópulas, existe uma diversidade de sistemas de acasalamento cuja definição ainda apresenta divergências entre autores. Segundo Klug (2011) a monogamia ocorre quando um macho e uma fêmea acasalam exclusivamente um com o outro. Quando os indivíduos tem mais de um parceiro é chamado de poligamia. A poligamia se divide em: poliginia, que ocorre quando um

macho acasala com mais de uma fêmea e a poliandria quando a fêmea copula com diferentes machos. Existem descrições diferentes para os sistemas citados acima considerando fatores como a probabilidade de sucesso reprodutivo de macho e fêmea (Tabela 1) (SHUSTER; WADE, 2003).

Tabela 1 - Definição de sistemas de acasalamento segundo Shuster e Wade (2003)

Sistema de acasalamento	Definição
Monogamia	Cada sexo tem um parceiro sexual por um período reprodutivo ou toda a vida.
Poliginia	Fêmeas tem um único parceiro enquanto os machos acasalam com diversas fêmeas.
Poliandria	Machos tem uma única parceira enquanto as fêmeas acasalam com diversos machos.
Poligamia	Ambos os sexos acasalam com vários indivíduos, e o sucesso reprodutivo é semelhante para machos e fêmeas.

O consenso tem sido que o sistema de acasalamento de uma população depende na habilidade de um dos sexo em adquirir parceiros, seja por união direta ou por defesa de territórios e recursos (REYNOLDS, 1996). Os seguintes fatores estão inter-relacionados e são predominantes em modelos que estudam sistemas de acasalamento: a abundância, qualidade e distribuição espacial e temporal de recursos; a razão de indivíduos sexualmente ativos (*Operational Sex Ratios* - OSR) e a sincronia de reprodução (KIRKENDALL, 1983).

A distribuição espacial de recursos pode afetar a estrutura de um sistema de acasalamento, assim quando recursos importantes estão distribuídos uniformemente no espaço, há menor oportunidade de monopolização. Tais condições resultariam em territorialismo, diminuindo o potencial de múltiplas cópulas e favorecendo a monogamia. Quando os recursos estão agrupados existe a possibilidade de que uma pequena parte da população monopolize todo o recurso tornando o ambiente com alto potencial de poligamia. Porém, nessas mesmas condições pode haver maior dificuldade dos indivíduos em monopolizar os recursos devido ao aumento no nível de competição podendo diminuir o potencial a poligamia (EMLEN; ORING,

1977). A distribuição temporal de parceiros sexuais também é uma fonte de variação. Se as fêmeas da população se tornam sexualmente receptivas de maneira uniforme e/ou sexualmente ativas somente por um período de tempo, há baixo potencial na monopolização de fêmeas. Entretanto com o aumento no nível de assincronia na receptividade das fêmeas, o potencial para realização de múltiplas cópulas aumenta (EMLEN; ORING, 1977; KLUG et al., 2010).

A razão de indivíduos sexualmente ativos (*Operational Sex Ratios* - OSR) é definida como a razão média de machos sexualmente ativos para fêmeas férteis. A tendência nesta razão prevê qual sexo irá competir pelo acesso as cópulas e quão intensa será essa competição sendo o principal determinante da ocorrência de seleção sexual na população. Onde o OSR é direcionado para os machos é esperado a poliginia; quando é direcionado para fêmeas espera-se que ocorra poliandria (EMLEN; ORING, 1977; KVARNEMO; AHNESJO, 1996).

Tentando explicar o mecanismo da seleção natural, Charles Darwin notou a ocorrência de diversas características que não auxiliavam na sobrevivência de seus hospedeiros. Tais traços pareciam evoluir quando eram sexualmente selecionados, isto é, se aumentassem o sucesso reprodutivo individual mesmo as custas de sua sobrevivência, tal mecanismo é conhecido como seleção sexual. A seleção sexual tem dois mecanismos: intrasexual (competição) e intersexual. Na seleção intrasexual, indivíduos do mesmo sexo tentam superar os rivais, geralmente disputando o acesso ao sexo oposto. Esse mecanismo é responsável pela evolução dos ornamentos dos machos (BRENNAN, 2012), como os chifres de besouros (EMLEN, 2000). Por outro lado, a seleção intersexual resulta da interação entre os sexos, envolvendo a escolha do parceiro. O resultado desta seleção é visto na evolução de elaboradas demonstrações comportamentais e características morfológicas. A seleção sexual favorece a ocorrência de machos mais competitivos entre si pela atenção da fêmea e fêmeas mais exigentes, avaliando características morfológicas e comportamentais dos machos visando determinar qual irá aumentar seu sucesso reprodutivo (BRENNAN, 2012). Darwin acreditava que a seleção sexual era um processo somente pré-copulatório assumindo que as fêmeas seriam sexualmente monogâmicas. Porém, estudos posteriores demonstraram que as fêmeas podem procurar diferentes parceiros (poliandria). Como consequência da poliandria as fêmeas armazenam esperma de diferentes machos em seus órgãos reprodutivos criando um ambiente de competição entre os espermatozoides armazenados

pela fertilização dos ovos. Assim, sob o efeito da poliandria a seleção sexual irá ocorrer antes e depois da cópula (BIRKHEAD; PIZZARI, 2002).

2.2.1 Poliandria

O estudo de múltiplas cópulas sob o ponto de vista do macho facilitou a compreensão de por que os machos acasalam várias vezes com diversas fêmeas e a ocorrência de adaptações como estruturas genitais, tamanho dos testículos, volume e formato de esperma (REYNOLDS, 1996). Em contraste, as fêmeas aumentariam seu sucesso reprodutivo maximizando o número de ovos produzidos sem a necessidade de realizar múltiplas cópulas. Esta assimetria entre os sexos sugere que o sucesso reprodutivo dos machos cresce conforme há um aumento no número de cópulas enquanto uma ou poucas cópulas seriam suficientes para maximizar o sucesso das fêmeas. Apesar dessa teoria, fêmeas da maioria das espécies acasalam múltiplas vezes, geralmente com machos diferentes (poliandria) mas também com o mesmo macho (cópulas repetidas) (ARNQVIST; NILSSON, 2000). As cópulas repetidas são caracterizadas pela aceitação ou solicitação de cópulas sequenciais com o mesmo parceiro, enquanto a poliandria ou múltiplas cópulas refere-se ao acasalamento entre um indivíduo e machos diferentes (DRAPEU et al., 2001).

O acasalamento resulta em custos bioecológicos como a aquisição de material espermático desnecessário, tempo gasto no cortejo, cópula e repelência de machos atraídos em períodos de não receptividade, além da maior vulnerabilidade a inimigos naturais e risco de transmissão de patógenos. Os custos aumentam conforme há aceitação de várias cópulas, entretanto os benefícios parecem se igualar e até mesmo superar os custos, tornando a realização de múltiplas cópulas um fenômeno comum entre fêmeas de várias espécies (SHUTT et al., 2010; THORNHILL; ALCOCK, 1983). Os benefícios materiais são ganhos não-genéticos no sucesso reprodutivo da fêmea, composto pela taxa reprodutiva, longevidade e fecundidade (FEDORKA; MOUSSEAU, 2002). Estes podem ser originados da aquisição de nutrientes via fluidos seminais, espermatóforos ou presentes nupciais (WIKLUND; KARLSSON; LEIMAR, 2001). Substâncias adquiridas durante o acasalamento são de extrema importância sobre o comportamento reprodutivo das fêmeas afetando sua receptividade e influenciando diretamente a ocorrência e o

padrão de poliandria da espécie (ARNQVIST; NILSSON, 2000). Outros benefícios incluem o reabastecimento espermático garantindo que haja a fertilização dos ovos produzidos (CAMPBELL, 2005; FEDORKA; MOUSSEAU, 2002; THORNHILL; ALCOCK, 1983); cuidado parental e acesso a locais de alimentação e oviposição adequados (ALCOCK; EICKWORT; EICKWORT, 1977)

Os benefícios genéticos são vantagens para a próxima geração obtidos via cópula com machos geneticamente diferentes. A poliandria pode favorecer tanto a seleção espermática quanto mecanismos crípticos de escolha na fêmea que possibilita que esta obtenha benefícios indiretos para sua prole (SIMMONS, 2001). Devido à dificuldade de imaginar como a poliandria pode ser favorecida na ausência de benefícios materiais foram desenvolvidos modelos teóricos baseados no potencial das fêmeas obterem benefícios genéticos:

(i) Hipótese “trading-up”: Fêmeas de espécies monogâmicas realizam cópulas com machos extras para compensar a baixa qualidade do parceiro social (BIRKHEAD; MOLLER, 1993; MOLLER, 1992; NEWCOMER; ZEH; ZEH, 1999).

(ii) Hipótese da diversidade da prole: O aumento na diversidade da prole resultante de múltiplas cópulas aumenta o sucesso reprodutivo da fêmea, seja pela redução da competição entre descendentes como uma garantia contra adversidades ambientais (NEWCOMER; ZEH; ZEH, 1999; RIDLEY, 1993).

(iii) Hipótese de inibição de endogamia: A poliandria diminui os custos da endogamia em situações que as fêmeas não conseguem evitar cópulas com irmãos (BRETMAN; NEWCOMBE; TREGENZA, 2009; NEWCOMER; ZEH; ZEH, 1999; TREGENZA; WEDELL, 2002).

(iv) Hipótese de evitar incompatibilidade genética: Enfatiza a importância das interações entre os genomas materno e paterno e propõe que a poliandria permite que as fêmeas explorem mecanismos pós-copulatórios que minimizam os riscos e custos da fertilização por um espermatozoide geneticamente incompatível (ZEH; ZEH, 2001).

(v) Hipótese da qualidade intrínseca do macho (“good sperm”): Se o espermatozoide utilizado é o do macho de maior sucesso na competição, este também será mais efetivo na produção de descendentes viáveis (MADSEN et al., 1992)

(vi) Hipótese da seleção espermática (“sexy sperm”): Considera que as características que levam ao sucesso na competição podem ser herdadas, assim as

fêmeas irão originar descendentes de maior sucesso reprodutivo (JENNIONS; PETRIE, 2000)

Os benefícios citados anteriormente são utilizados para explicar a ocorrência de múltiplas cópulas por fêmeas. Porém, em algumas espécies as fêmeas não obtêm benefícios e estão simplesmente consentindo com o comportamento do macho. Isto ocorre devido aos custos inerentes em recusar os machos são maiores que o de aceitar a cópula ou devido à agressão dos machos para que haja cópula (HUNTER et al., 1993).

O sucesso reprodutivo da fêmea pode ser diretamente afetado pelo comportamento de acasalamento em diferentes maneiras. Os efeitos podem ser devido ao ato da cópula, pela presença de esperma ou transferência de substâncias acessórias. O ato da cópula gera gasto de tempo e energético, maior vulnerabilidade a inimigos naturais, além de exposição a doenças e patógenos. A presença de esperma pode estimular a produção de ovos, porém a transferência de esperma em excesso diminui a produção de ovos e a fertilidade (ARNQVIST; NILSSON, 2000). A transferência de substâncias acessórias juntamente com o fluido seminal do macho apresenta efeitos complexos sobre a reprodução das fêmeas. Alguns eventos como estímulos do macho, preenchimento dos órgãos de armazenamento de esperma, aquisição de espermatóforo, presentes nupciais e fluidos seminais (SHUTT et al., 2010; WEDELL, 2005), associado a mecanismos fisiológicos podem atuar sobre a receptividade das fêmeas. A mudança na receptividade da fêmea pode modificar a frequência de cópulas a serem realizadas e, portanto, o número de parceiros a serem aceitos pela fêmea (RINGO; TALYN; BRANNAN, 2005; RINGO, 1996; THORNHILL; ALCOCK, 1983).

2.3 Exemplos da importância do estudo dos sistemas de acasalamento em insetos

O estudo do padrão comportamental da reprodução da fêmea tem implicações sobre a eficácia de algumas técnicas empregadas para o manejo de pragas. Métodos de controle que visam evitar o acasalamento das fêmeas, como a confusão sexual por meio de feromônios e técnica do inseto estéril (SIT) podem ser afetados por características do comportamento reprodutivo. A poliandria em fêmeas selvagens pode diminuir a eficiência da SIT, já que tem sido observado que a

irradiação não afeta a produção das substâncias das glândulas acessórias dos machos, porém diminui a capacidade dessas substâncias em inibir a receptividade das fêmeas. Portanto, se a fêmea acasala com um macho estéril que não consegue inibir a recópula, a fêmea pode acasalar com um macho selvagem e a inibição reprodutiva não será atingida (PÉREZ-STAPLES; SHELLY; YUVAL, 2013).

O conhecimento do padrão de armazenamento de esperma pela fêmea após a ocorrência de poliandria pode ser utilizado para estimar o potencial de aumento ou diminuição da frequência dos genes resistentes na população. Em populações de *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae), uma fêmea que foi acasalada primeiro com um macho resistente e depois com um macho suscetível dá origem a descendentes com ambas as características. Mesmo que o macho suscetível seja responsável pela paternidade de 70% da prole ainda há formação de indivíduos resistentes. Assim, quando uma fêmea coloniza novas áreas, o processo de aquisição de resistência pode ser iniciado mesmo sem a presença de adultos resistentes (ARNAUD; CALLAGHAN; HAUBRUGE, 2001).

2.4 Broca-do-café

2.4.1 Aspectos bioecológicos

A broca-do-café, *H. hampei* possui desenvolvimento holometábolo, apresentando os estágios de ovo, larva, pupa e adulto. Além disso, é uma espécie críptica que passa a maior parte de seu ciclo de vida no interior do fruto de café. Devido ao ciclo multivoltino da broca, é possível encontrar todos os estágios de desenvolvimento do inseto dentro de um mesmo fruto de café (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997). Considerando o efeito da temperatura sobre o desenvolvimento do inseto, o ciclo de vida (ovo a adulto) de *H. hampei* pode variar de 23,3 dias (30°C) até 53,7 dias (20°C) (JARAMILLO et al., 2009).

O processo de colonização da broca inicia com a saída das fêmeas acasaladas do fruto do qual se desenvolveram. Essas fêmeas são chamadas de fêmeas colonizadoras, pois são elas que iniciam um novo ciclo de infestação no campo (MATHIEU et al., 2001). Este comportamento de abandono do fruto é estimulado por fatores abióticos, tais como temperatura, umidade relativa (BAKER et

al., 1992) e luminosidade (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997). Chegando ao fruto, a fêmea inicia a construção de uma galeria que se estende da região da coroa até atingir uma das sementes. Na semente, o inseto alarga a galeria, construindo uma câmara para a deposição de seus ovos. A matéria seca do endosperma é um fator crucial na velocidade do processo de colonização, assim em frutos com menos de 20 % de matéria seca pode haver abandono dos frutos ou a fêmea permanece na galeria esperando que o fruto alcance o grau de matéria seca ideal para o estabelecimento da prole (JARAMILLO; BORGEMEISTER; BAKER, 2006). López-Guillén et al. (2011) em estudo sobre os músculos das asas de fêmeas de *H. hampei* verificaram a ocorrência da degeneração muscular das asas de fêmeas colonizadoras após a penetração no fruto, assim as proteínas antes repassadas para as asas podem ser utilizadas no desenvolvimento ovariano, este mecanismo de degeneração impede que a fêmea colonize mais de um fruto.

Há muitos anos é mencionada a preferência de fêmeas de *H. hampei* por frutos maduros de café (CORBETT, 1933). Esta preferência tem sido atribuída aos voláteis dos frutos que serviram como mediadores da resposta olfativa da broca (GIORDANENGO; BRUN; FREROT, 1993). Essa resposta, assim como o comportamento de abandono do fruto, depende também do estágio fisiológico do inseto, uma vez que as fêmeas virgens ou as que já ovipositaram, mesmo no fruto nativo, não exibem o comportamento de abandono (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997). Portanto, somente as fêmeas colonizadoras respondem positivamente aos voláteis dos frutos de café (MATHIEU et al., 2001).

Em média a fêmea coloca dois ovos por dia, podendo produzir de 31 a 119 ao longo de todo ciclo de vida. Os ovos são pequenos, elípticos, brancos, brilhantes e depositados em grupo. As larvas eclodem de 4 a 10 dias após a oviposição. Ao eclodirem, apresentam a cápsula cefálica maior que o resto do corpo, coloração amarela palha, mandíbulas visíveis e corpo com bordos levemente recurvados. A fase larval dura aproximadamente 14 dias, com dois ínstaras para a larva que originará a fêmea e um para a larva que originará o macho (BERGAMIN, 1943). É nesta fase em que ocorrem os maiores danos nos frutos devido à atividade de broqueamento dos insetos (FERNÁNDEZ; CORDERO, 2007). A pré-pupa da broca possui características semelhantes as larvas, porém, não se alimentam e são imóveis (BERGAMIN, 1943). A pupa apresenta coloração branca e na medida que há formação das asas, peças bucais e antenas, adquirem a coloração castanho-

clara. O tamanho das pupas varia de acordo com o sexo, sendo em média 1,89 mm para as fêmeas e 1,22 mm para os machos. O período pupal é de 7 dias em média (BERGAMIN, 1943).

O adulto da broca é um inseto pequeno com dimensões de, aproximadamente, 1,65 x 0,73 mm (comprimento x largura) para as fêmeas e 1,18 x 0,55 mm para os machos. Ao emergir, a broca apresenta uma coloração amarronzada e tem consistência frágil, e com o passar de 4 ou 5 dias adquirem a coloração preta e são mais endurecidos (BERGAMIN, 1943). As fêmeas apresentam o corpo alongado, de coloração preta brilhante. O pronoto é curvado protegendo a cabeça, posicionada na região ventral, impossibilitando a sua visualização superior. A presença de espinhos na tíbia auxilia em atividades como a abertura das galerias nos frutos de café. Já os machos são semelhantes às fêmeas, porém de tamanho menor e com vestígios de asas membranosas, sendo incapazes de voar. O macho permanece dentro do fruto durante toda a vida, acasalando com as irmãs conforme estas emergem, podendo fertilizar, em média, duas fêmeas por dia (BERGAMIN, 1943). A proporção sexual, fêmea:macho, em *H. hampei* é de 10:1. O macho vive em média 40 dias, podendo variar de 78 a 103 dias, enquanto a fêmea vive em média 156,6 dias (BERGAMIN, 1943).

2.4.2 Aspectos do comportamento reprodutivo de *Hypothenemus hampei*

A reprodução da broca-do-café é compatível com a competição local por cópula (“Local Mate Competition – LMC”). Tal condição é caracterizada pela ocorrência de acasalamento entre parentes antes da dispersão das fêmeas, além de uma proporção sexual favorável as fêmeas, as quais são capazes de controlar a razão sexual de sua prole enquanto os machos possuem importância secundária (BORSA; KJELLBERGT, 1996).

O comportamento de acasalamento da broca foi descrito recentemente por Silva et al. (2012) revelando características como a idade, horário e duração da cópula, além do detalhamento da sequência de acasalamento. Segundo os autores, o maior número de cópulas ocorre entre 48-96 horas de idade, variando de 2,6 a 6,9 cópulas, respectivamente. O comportamento de cópula foi observado a qualquer horário do dia, sem a presença de um pico evidente. Ainda de acordo com os autores, o comportamento de acasalamento apresenta três fases distintas. A fase

pré-copulatória tem início com a aproximação do macho e posteriormente o macho toca o élitro e pronoto da fêmea com a antena e rostro. O macho inicia a monta e move o corpo na direção posterior curvando o abdômen ventralmente e expondo o edeago. Na fase copulatória, o macho posiciona o corpo perpendicularmente e insere o edeago na genitália da fêmea. Durante a cópula, ambos permanecem imóveis. Esta fase termina com o desacoplamento genital. Na fase pós-copulatória o macho 'desmonta' e permanece próximo a fêmea por apenas alguns segundos (Figura 1).

A reprodução sob condições de "LMC" são frequentemente associadas a reprodução por arrenotoquia, onde fêmeas vem de ovos fertilizados e machos de ovos não fertilizados. Entretanto um sistema similar ocorre na broca-do-café, chamado pseudo-arrenotoquia, na qual a produção de machos requer fertilização pelo esperma, porém um grupo de cromossomos é eliminado durante o desenvolvimento (BORSA; KJELLBERGT, 1996). Estudos citológicos mostram que tanto fêmeas quanto machos são diplóides, porém os machos não expressam nem transmitem um grupo de cromossomos. O grupo de cromossomos que se condensa é o paterno, portanto a broca herda estritamente os genes maternos (BRUN et al., 1995), podendo ser dito que a reprodução ocorre por linhas maternas (BENAVIDES et al., 2005). Borsa e Kjellbergt (1996) confirmaram que os genes paternais não são expressos nos filhos mas aparecem nas filhas. As brocas fêmeas são diploides enquanto os machos apresentam um grupo de cromossomos e uma massa condensada correspondente aos cromossomos que não se alinharam durante a divisão e conseqüentemente não são transmitidos para a progênie (BENAVIDES, [s.d.]). Devido a estas características a broca é considerada funcionalmente haplodiplóide (BRUN et al., 1995).

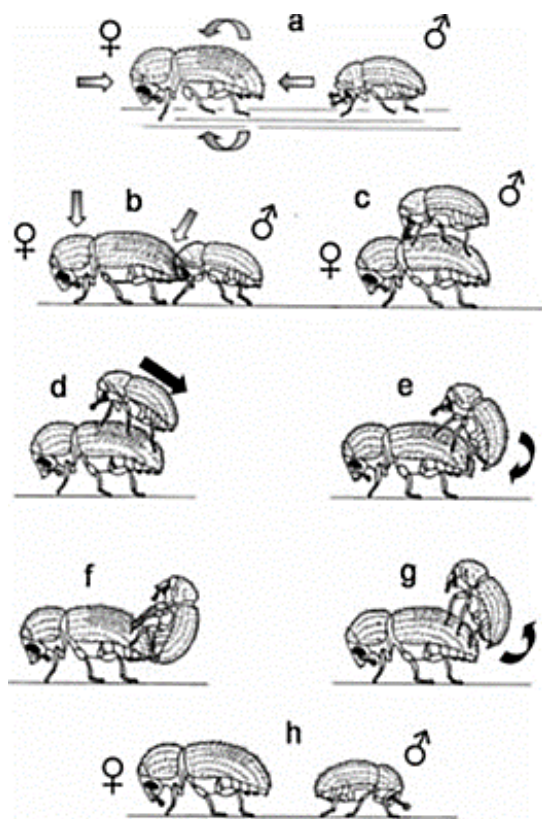


Figura 1 - Sequência de acasalamento de casais de broca-do-café, *Hypothenemus hampei*. Retirado de Silva et al., 2012

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia Química e Comportamento de Insetos, do Departamento de Entomologia e Acarologia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), em Piracicaba, SP.

3.1 Criação dos insetos

Os insetos utilizados para manutenção da criação em laboratório foram obtidos a partir de frutos de café infestados com broca-do-café coletados no campo. No laboratório os frutos foram umedecidos com água destilada e mantidos em local com alta iluminação solar para estimular a saída das fêmeas colonizadoras (Figura 2 A). As fêmeas que saíram dos frutos nativos foram coletadas utilizando um tubo de ensaio ou um aspirador entomológico e transferidas para criação sobre grãos de café “pergaminho” em potes plásticos (20 cm comprimento x 14 cm largura x 7,5 cm altura) forrados com papel de filtro umedecido com água destilada (Figura 2 C). Os grãos foram colocados em camada única nos recipientes plásticos e foi liberado um inseto por fruto. Para permitir a circulação de ar no interior dos potes foram utilizadas tampas vazadas e tecido *voile* para evitar a saída dos insetos (Figura 2 B). Aproximadamente 40-50 dias após a transferência dos insetos para os potes de criação, o mesmo procedimento realizado para os frutos foi repetido com os grãos estimulando a saída da próxima geração de fêmeas colonizadoras. A criação foi mantida sobre prateleiras de metal em uma sala climatizada a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ de UR e 24 horas de escotofase.

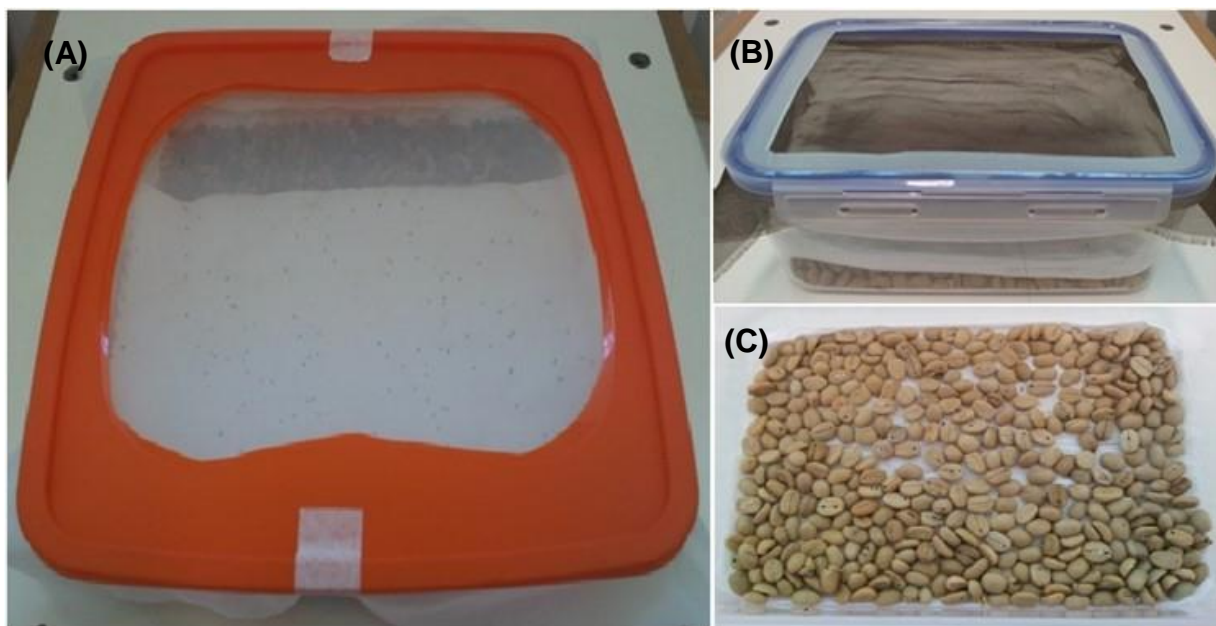


Figura 2 - (A) Recipiente plástico com frutos de café infestados e demonstrando a saída de fêmeas colonizadoras de *Hypothenemus hampei*. (B) Recipiente utilizado para criação de *H. hampei* em grãos de café pergaminho. (C) Grãos de café pergaminho infestados por *H. hampei* dentro de um recipiente de criação

3.2 Obtenção dos insetos para a realização dos experimentos

Para obtenção de machos e fêmeas virgens de *H. hampei* visando à formação dos casais que foram utilizados nos experimentos, foram coletadas pupas de ambos os sexos pela abertura dos grãos infestados, utilizando um bisturi e um microscópio estereoscópico binocular (aumento 2,0x). As pupas do mesmo sexo foram individualizadas em tubos de vidro (7,5 cm de comprimento x 9 mm de diâmetro) esterilizados e vedados com filme de PVC, os quais foram mantidos nas mesmas condições climáticas descritas anteriormente para criação dos insetos. A emergência dos adultos da broca foi verificada diariamente, e os insetos emergidos foram transferidos para tubos de vidro contendo um pedaço de endosperma de café como fonte alimentar. Os tubos foram mantidos na sala climatizada até a realização dos experimentos.

3.3 Ocorrência de poliandria em fêmeas de *Hypothenemus hampei*

Este experimento teve por objetivo determinar a ocorrência de poliandria em *H. hampei*, verificando se as fêmeas aceitavam novos machos em diferentes

situações de sua fase adulta. Para tanto, fêmeas virgens de *H. hampei* com idade entre 48-96h foram submetidas aos seguintes tratamentos

- (i) Fêmeas colonizadoras: As fêmeas foram expostas a dois machos diferentes de mesma condição fisiológica, sendo um antes e outro depois de se tornarem colonizadoras (responsivas a luz).

O tratamento (i) reproduz o comportamento de saída do fruto pelas fêmeas colonizadoras, principalmente no período de entressafra, no qual a escassez de frutos de café provocaria a entrada destas fêmeas em frutos já infestados (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997).

- (ii) Fêmeas submetidas a um período de oviposição: No qual as fêmeas foram expostas a um macho, e após 10 dias, na condição de “fêmeas em oviposição” e então expostas a um segundo macho.

Este tratamento reproduz o comportamento das fêmeas que iniciaram o processo de oviposição e, provavelmente, permanecem no fruto nativo.

Para determinar o momento em que a fêmea da broca se torna colonizadora, as fêmeas recém-acasaladas foram colocadas em um dispositivo formado por um tubo de ensaio (Figura 3 A) no qual metade permanecia no escuro, e a outra metade na presença de luz. Para garantir a condição de escuro na metade dos tubos de ensaio, estes foram encaixados em isopor preto perfurado (Figura 3 B e C). Em ambos os lados do tubo havia pedaços de endosperma de café, para a alimentação das fêmeas. Diariamente, entre 15:30 e 17:00h, foram retiradas as fêmeas que se movimentaram para o lado com presença de luz do dispositivo experimental. Após 80% das fêmeas se tornaram responsivas a luz, foram submetidas ao acasalamento com um segundo macho.

No tratamento (ii), as fêmeas eram transferidas para um frasco escuro de poliestireno (3,5 cm de altura x 2,0 cm de diâmetro) contendo um grão de café ‘pergaminho’, antes de serem expostas ao segundo macho (Figura 3 D).

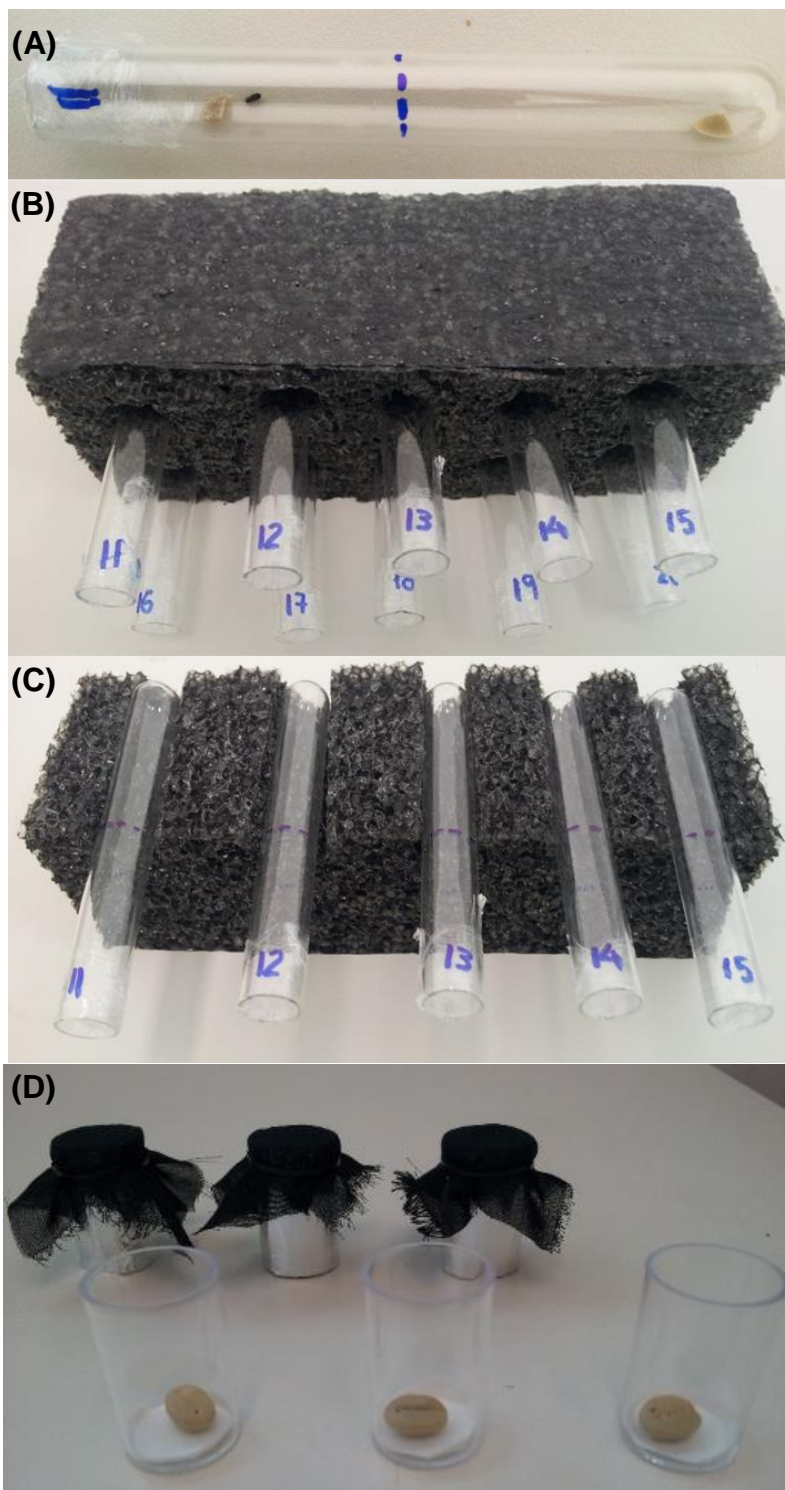


Figura 3 - (A) Tubo de ensaio contendo uma fêmea de broca-do-café, *Hypothenemus hampei* e um pedaço de endosperma em ambos os lados do tubo. (B) Dispositivo experimental utilizado para determinar o momento que as fêmeas se tornaram responsivas a luz (colonizadoras). (C) Detalhe do dispositivo experimental mostrando que metade do tubo permanece no escuro e a outra metade com luz. (D) Parte interna e externa do frasco de poliestireno com grão pergaminho para ovoposição vedado com tecido *voile*

Para registrar o comportamento de acasalamento em cada tratamento, os casais foram individualizados em poços de uma placa de microtitulação de 96 poços

forrados com uma camada dupla de papel de filtro umedecido e contendo um pedaço de endosperma de café (Figura 4 A, B). Posteriormente, os casais foram filmados durante 12 h de acordo com metodologia descrita por Silva et al. (2012), sendo as imagens analisadas por meio de um programa fornecido pelo fabricante da câmera Sony HDSR12 (Figura 4 C).

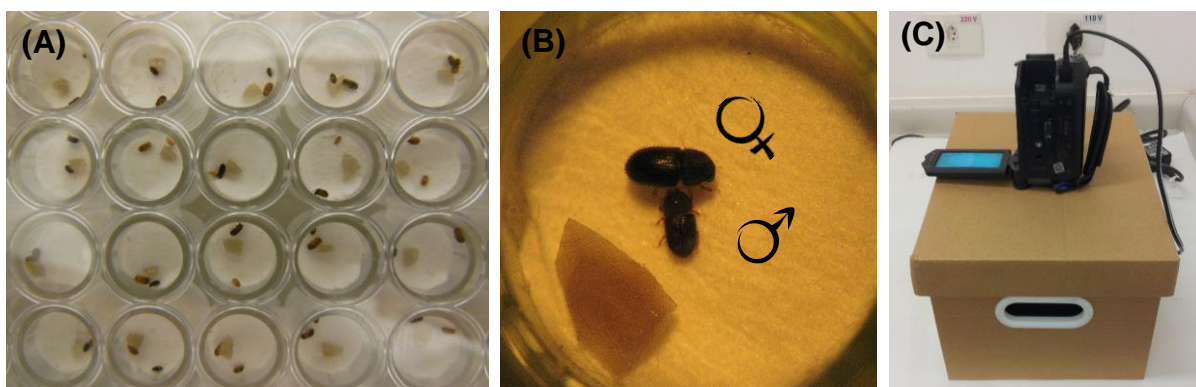


Figura 4 - (A) Placa de microtitulação com a presença casais da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* em 20 poços; (B) Detalhe do poço da placa de microtitulação contendo um macho e uma fêmea de *H. hampei* e (C) Dispositivo experimental utilizado para a filmagem dos casais de *Hypothenemus hampei*, demonstrando o ambiente para a filmagem contendo uma câmera filmadora Sony HDSR12

3.4 Efeito de múltiplos acasalamentos sobre os aspectos bioecológicos de fêmeas de broca-do-café e de sua prole

Para determinar se as fêmeas de *H. hampei* se beneficiam de múltiplas cópulas com o mesmo macho (cópulas repetidas) ou de cópulas com machos diferentes (poliandria), foram utilizados os seguintes tratamentos: (i) fêmeas acasaladas uma única vez com um macho virgem ('monogamia'); (ii) fêmeas acasaladas três vezes com o mesmo macho ('cópulas repetidas'); e (iii) fêmeas acasaladas com três machos diferentes ('poliandria'). Os casais foram colocados em uma placa de microtitulação de 96 poços e filmados durante três horas para observar se houve a cópula (Figura 6). O tempo definido para a filmagem foi baseado em bioensaios preliminares onde foi observado que mais da metade das fêmeas realizavam uma única cópula neste período. Portanto, depois da filmagem o casal foi separado permitindo somente um acasalamento por dia. A filmagem foi realizada utilizando-se o mesmo procedimento descrito no experimento anterior.

Um fator considerado durante o tratamento 'cópulas repetidas' foi que as fêmeas ao realizarem a segunda e terceira cópula copulariam com um macho não

virgem e, poderiam receber menos material espermático do que as fêmeas que copulariam com um macho virgem diferente ('poliandria'). Sendo assim, para contornar este fator os machos designados para a segunda e terceira cópula foram mantidos com uma fêmea pelo período de três horas no dia anterior a realização do bioensaio de 'poliandria'.

Após o término dos tratamentos envolvendo os acasalamentos, as fêmeas foram mantidas em frascos escuros de poliestireno (3,5 cm de altura x 2,0 cm de diâmetro) com um grão de café "pergaminho" (substrato para oviposição) que foi substituído sempre que houve abertura do grão para retirada dos ovos. Para evitar a saída da fêmea e proporcionar um fluxo de ar, o recipiente foi fechado com tecido *voile* preto e elástico pequeno (Figura 3 D). Para uniformizar a entrada das fêmeas nos grãos de café "pergaminho" foram feitos orifícios, de aproximadamente 1 mm em todos os grãos com auxílio de uma micro retífica (Dremmel 3000).

Os benefícios diretos das cópulas foram determinados a partir da avaliação da fecundidade e longevidade das fêmeas. Para isto, a cada 10 dias os grãos de café "pergaminho" foram abertos e realizados a contagem dos ovos produzidos juntamente com a observação da sobrevivência da fêmea. Já os benefícios indiretos das cópulas foram verificados por meio da prole. Os ovos produzidos por cada fêmea foram separados em placas de Petri (40mm de diâmetro) e avaliados semanalmente para verificar a eclosão das larvas (Figura 5 A, B). As larvas originadas das coletas foram dispostas em grãos de café "pergaminho", nos quais foi feito uma galeria artificial com auxílio da micro retífica para facilitar a alimentação dos insetos (Figura 5 C). Os grãos foram mantidos em placas de Petri (40mm de diâmetro) onde foi acompanhada a emergência dos adultos (Figura 5 D).

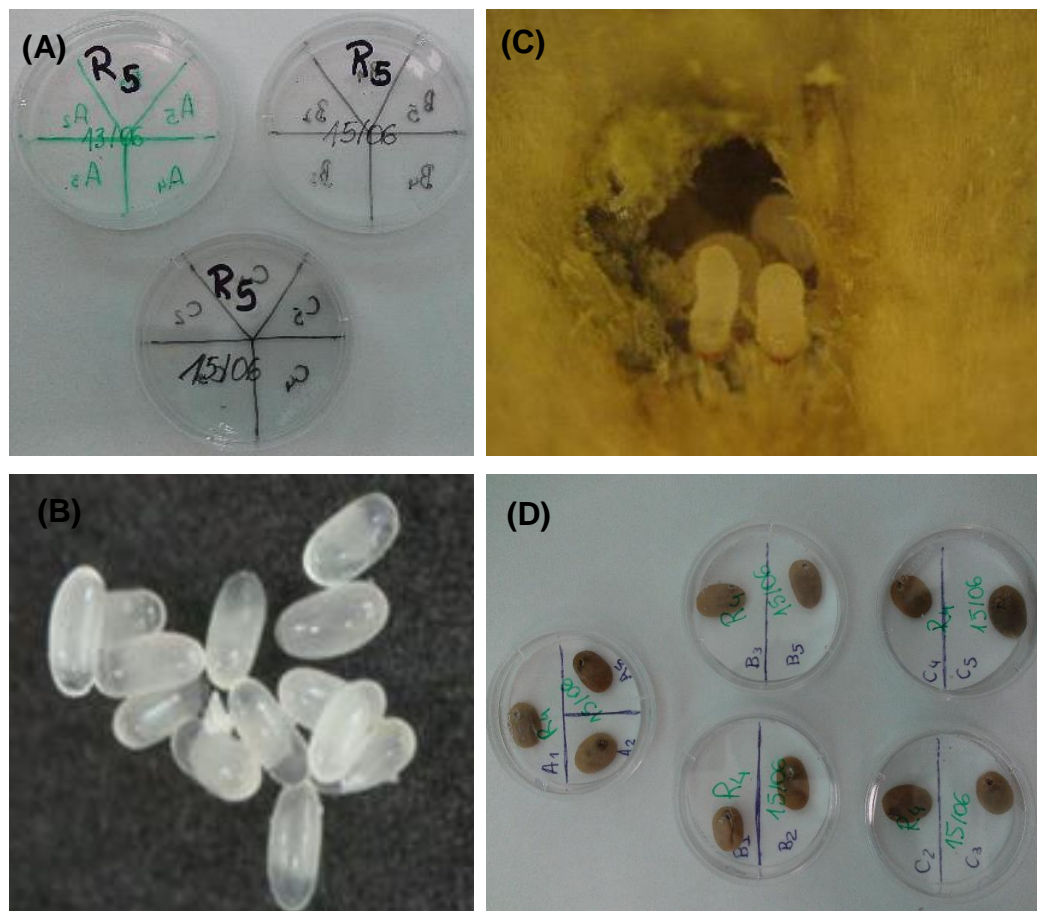


Figura 5 - (A) Placas de Petri com marcação separando os ovos obtidos de cada fêmea de *Hypothenemus hampei* por tratamento; (B) Detalhe dos ovos de *Hypothenemus hampei* agrupados, (C) Larvas dispostas no interior da galeria artificial; e (D) Placas de Petri com grãos de café "pergaminho" onde foram transferidas as larvas recém-ecloídas

3.5 Análise estatística

No primeiro experimento (item 3.2) foram utilizadas, inicialmente, 60 fêmeas de *H. hampei* por tratamento, sendo cada fêmea uma repetição em delineamento inteiramente casualizado, porém as fêmeas que morreram antes da finalização do tratamento ou que não copularam com o 1º macho foram excluídas das análises estatísticas. Os dados foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade de variâncias utilizando os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Posteriormente, o número de fêmeas que realizaram cópula e, a seguir as que aceitaram a recópula foram comparadas entre os tratamentos (i) e (ii) utilizando-se o teste qui-quadrado (χ^2). Os dados da duração média da(s) cópula(s) com o 2º macho foram avaliados entre os tratamentos por meio de modelos lineares generalizados

(GLM). Para associar a duração média da cópula entre 1º e 2º macho foi utilizado o teste de correlação de Pearson.

Para o segundo experimento (item 3.3) foram utilizadas 40 fêmeas por tratamento (N=120). O delineamento foi em blocos ao acaso com oito blocos, sendo que cada tratamento presente em um bloco era formado por cinco fêmeas de *H. hampei*. Porém, as fêmeas que não produziram nenhum ovo ou que morreram durante a execução dos tratamentos foram excluídas da análise estatística. Os dados foram avaliados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Para associar a longevidade ao número total de ovos e número de ovos por semana foi utilizado o teste de correlação de Pearson. As relações entre os tratamentos e as variáveis independentes foram avaliadas utilizando regressões múltiplas por meio de modelos lineares generalizados (GLM). O número de ovos por semana foi avaliado por regressão linear, o nº total de ovos por regressão log-linear com ajuste para *over-dispersion*, a taxa de eclosão e recuperação larva:adulto por regressões logísticas com ajuste para *over-dispersion*. As médias entre os tratamentos foram comparadas aos pares por teste t não paramétrico com correção de Bonferroni. A longevidade foi avaliada pela estimativa de Kaplan-Meier e as curvas comparadas aos pares pelo teste de log-rank. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o programa estatístico R, versão 2.15.1.

4 RESULTADOS

4.1 Ocorrência de poliandria em fêmeas de *Hypothenemus hampei*

Fêmeas virgens de *H. hampei* expostas ao primeiro macho, apresentaram frequência de cópula semelhantes para os tratamentos de fêmeas colonizadoras e fêmeas submetidas ao período de oviposição, ou seja, 64,58% e 63,04%, respectivamente ($\chi^2=0,067$, $gl=1$, $P=0,7963$) (Tabela 2). Já, na condição de recópula (2º macho), as fêmeas colonizadoras copularam cerca de três vezes mais (64,52%) que as fêmeas na condição de oviposição (20,69%) ($\chi^2=7,538$, $gl=1$, $P=0,006$) (Tabela 3).

A duração média da recópula (2º macho) foi menor nas fêmeas em oviposição comparativamente as fêmeas colonizadoras ($F_{1,24}=5,18$; $P= 0,032$) (Tabela 4). Além disso, foi verificada uma correlação negativa entre a duração média da cópula e recópula (Pearson $r= -0,40$, $P=0,045$, $n= 26$), indicando que quanto maior a duração da cópula (1º macho) menor a duração da recópula (2º macho).

Tabela 2 - Número de cópulas (1º macho) e frequência de cópula (%) em fêmeas virgens de *Hypothenemus hampei*

Tratamentos	Fêmeas que copularam/ Total de fêmeas	Frequência de cópula (%)*
(i) Fêmeas colonizadoras	31/48	64,58
(ii) Fêmeas submetidas ao período de oviposição	29/46	63,04

* $\chi^2=0,067$ $df=1$, $P=0,7963$

Tabela 3 - Número de recópulas (2º macho) e frequência de recópula (%) de fêmeas de *Hypothenemus hampei*

Tratamentos	Aceitaram recópula?		Frequência de recópula (%)*
	Sim	Não	
(i) Fêmeas colonizadoras	20	11	64,52
(ii) Fêmeas submetidas ao período de oviposição	6	23	20,69

* $\chi^2=7,538$, $df=1$, $P=0,006$ Tabela 4 - Duração (min.) das cópulas (1º macho) e recópulas (2º macho) em *Hypothenemus hampei*

Tratamentos	Duração cópula (min)	Duração recópula (min)*
	(Média \pm EP)	(Média \pm EP)
(i) Fêmeas colonizadoras	2,21 \pm 0,12	2,36 \pm 0,14
(ii) Fêmeas submetidas ao período de oviposição	2,71 \pm 0,15	1,74 \pm 0,19

* $F_{1,24}= 5,18$; $P=0,032$.

4.2 Efeito de múltiplos acasalamentos sobre os aspectos bioecológicos de fêmeas de broca-do-café e de sua prole

Entre as fêmeas de *H. hampei* analisadas, não houve efeito da quantidade de cópulas sobre o número médio de ovos/semana, seja estes acasalamentos realizados com um macho, três vezes com o mesmo macho, ou três vezes com machos distintos ($F_{2,89}=0,28$; $P=0,75$). Fêmeas submetidas a condição de 'poliandria' colocaram em média 4,12 ovos/semana, contra 3,82 e 4,06 ovos/semana para as condições de 'cópulas repetidas' e 'monogamia', respectivamente. O número total de ovos produzidos por fêmea foi afetado negativamente pela quantidade de cópulas ($F_{2,87}=3,65$; $P=0,03$), sendo as fêmeas sob condição de 'poliandria' as que apresentaram um menor número de ovos produzidos (Tabela 5).

A longevidade das fêmeas foi semelhante entre os tratamentos ($\chi^2=2,1$; $gl= 2$; $P=0,359$), sugerindo que a ocorrência de múltiplas cópulas com o mesmo parceiro ou com parceiros diferentes não acarretou custos na sobrevivência das fêmeas.

Fêmeas submetidas a condição de monogamia, cópulas repetidas e poliandria, apresentaram longevidade média de $70,4 \pm 6,33$; $67,02 \pm 5,71$; e $60,75 \pm 5,61$ dias, respectivamente (Figura 6).

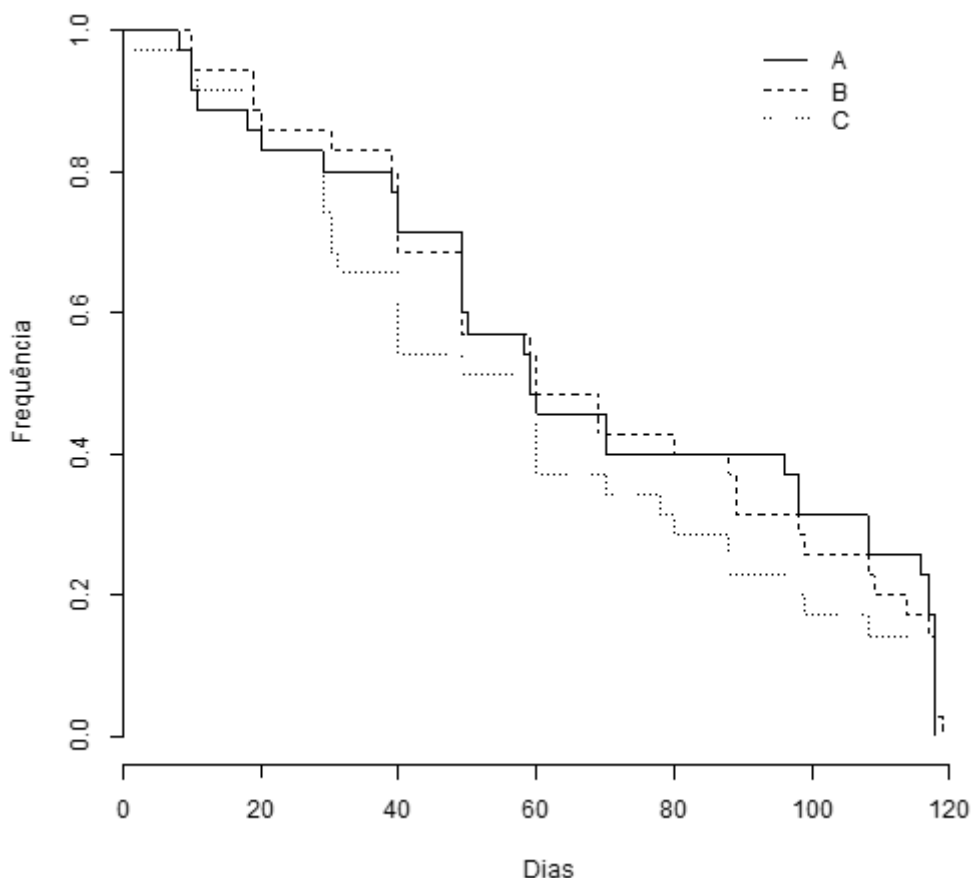


Figura 6 - Frequência de sobrevivência das fêmeas de *Hypothenemus hampei* submetidas à monogamia (A), cópulas repetidas (B), e poliandria (C)

A taxa de eclosão de larvas (viabilidade de ovos) diferiu entre os tratamentos ($F_{2,89}=3,43$; $P=0,036$). Fêmeas que foram submetidas à condição de monogamia apresentaram uma menor taxa de eclosão comparativamente as fêmeas na condição de poliandria. Por outro lado, as fêmeas na condição de cópulas repetidas não diferiram dos demais tratamentos (Tabela 5).

Já, a taxa de recuperação larva:adulto, que representa a quantidade de larvas eclodidas que resultaram na emergência de adultos da broca-do-café, não foi influenciada pelos tratamentos ($F_{2,85}=0,61$; $P=0,54$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Número de ovos/semana, total de ovos produzidos, taxa de eclosão de larvas e recuperação larva:adulto por fêmea de *Hypothenemus hampei* submetida à monogamia, cópulas repetidas e poliandria

Parâmetros avaliados	Tratamentos		
	Monogamia (Média ± EP)	Cópulas repetidas (Média ± EP)	Poliandria (Média ± EP)
Nº de ovos/semana ¹	4,06 ± 0,40	3,82 ± 0,34	4,12 ± 0,32
Nº total de ovos ^{2*}	31,38 ± 4,00 a	23,24 ± 2,27 b	21,46 ± 2,40 b
Taxa de eclosão ^{3*}	0,49 ± 0,04 a	0,57 ± 0,03 ab	0,65 ± 0,04 b
Larva:Adulto ⁴	0,41 ± 0,05	0,34 ± 0,04	0,39 ± 0,04

¹ F_{2,89}=0,28 P=0,75; ² F_{2,87}=3,65 P=0,03; ³ F_{2,89}=3,43 P=0,036; ⁴ F_{2,85}=0,61 P=0,54

* Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste t não paramétrico com correção de Bonferroni.

5 DISCUSSÃO

Este trabalho revela pela primeira vez a ocorrência de poliandria em *H. hampei*. A frequência de recópula observada tanto em fêmeas colonizadoras, como também em fêmeas em oviposição, demonstrou que este comportamento é passível de acontecer em condições naturais para a broca-do-café. Ademais, o fato de um maior número de recópulas ter ocorrido em fêmeas colonizadoras, em comparação com as fêmeas em oviposição, sugere ainda que no momento da recópula a condição fisiológica da fêmea tem papel decisivo para sua aceitação.

Nota-se, que diversas outras espécies de besouros com características ecológicas semelhantes a *H. hampei*, tais como gorgulhos, buprestídeos e cerambicídeos, também apresentam poliandria (ALCOCK, 1976; CAMPBELL, 2005; RUTLEDGE; KEENA, 2012).

Considerando-se que mais de 90% das fêmeas colonizadoras de *H. hampei*, ao abandonarem seus frutos nativos são férteis (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997), a presença de poliandria nesta espécie poderia, a partir deste momento, reduzir a endogamia nestes indivíduos. Nota-se, por exemplo, que durante a entressafra do café existe uma escassez de frutos adequados para a colonização, e na ausência deste hospedeiro a fêmea penetra em frutos já infestados. Neste fruto a fêmea teria a oportunidade de acasalar com machos provenientes de outras populações, e desse modo promover uma maior diversidade genética dentro da espécie (MATHIEU; BRUN; FRÉROT, 1997). De fato, Gingerich et al. (1996) ao estudarem o nível de endogamia em *H. hampei* a partir da resistência ao produto químico endosulfan, observaram altos níveis de 'outbreeding' que eles atribuíram a duas possíveis hipóteses: (i) acasalamento durante ou depois da dispersão das fêmeas colonizadoras; e (ii) infestações por diferentes fêmeas em um mesmo fruto.

Todavia, vale ressaltar que não há um consenso sobre o fato de que a poliandria seja um mecanismo que acarrete em benefícios para a redução da endogamia (JENNIONS et al., 2004; SIMMONS et al., 2006; TENG; KANG, 2007). Apesar disso, já se tem documentado esses benefícios para diversas espécies de insetos (BRETMAN; NEWCOMBE; TREGENZA, 2009; MICHALCZYK et al., 2011; TREGENZA; WEDELL, 2002).

Embora fêmeas de *H. hampei* em período de oviposição apresentaram poliandria, a frequência observada de recópulas foi baixa. Aparentemente, quando

recém fertilizada, a oviposição parece ser a principal e fundamental atividade fisiológica destas fêmeas. Contudo, considerando-se que em *H. hampei*, os acasalamentos podem ocorrer em qualquer horário do dia (SILVA et al., 2012), estas fêmeas necessitariam, de algum modo, evitar o assédio dos machos. E, de fato, a maioria destas fêmeas em oviposição demonstraram um comportamento de rejeição aos machos (dados não quantificados), evitando as tentativas de cópulas por meio de movimentos bruscos para frente e para trás, que os derrubavam. Respostas semelhantes de rejeição são comuns nos insetos, e estudadas em besouros como *Anoplophora malasiaca* e *Psacothaea hilaris* (Coleoptera: Cerambycidae) (FUKAYA, 2004; FUKAYA et al., 2004). Curiosamente, neste trabalho, 34,5% das fêmeas de *H. hampei* em oviposição perfuraram o papel de filtro que forrava os poços da placa de microtitulação, possivelmente também como estratégia para escapar do assédio dos machos. Em trabalhos clássicos conduzidos com *Drosophila* spp. (Diptera: Drosophilidae) há padrões bem definidos de movimentos realizados por fêmeas virgens e acasaladas para diminuir o cortejo e impedir a cópula em resposta ao assédio dos machos, demonstrando que a chance de sucesso nestas condições é extremamente baixa (CONOLLY; COOK, 1973).

Adicionalmente, as fêmeas em oviposição da broca-do-café apresentaram duração da recópula inferior as fêmeas colonizadoras. Além disso, houve uma correlação negativa entre a duração da primeira cópula e da recópula, indicando que uma maior duração na cópula, resultou numa diminuição de tempo da recópula em *H. hampei*. Em *Scatophaga stercoraria* (Diptera: Scatophagidae), Parker (1970) verificou que a duração das cópulas com fêmeas após o período de oviposição também foi menor que a duração normal observada desta espécie. Todavia, vale ressaltar que o controle da duração da cópula pode estar sob domínio tanto da fêmea como do macho. A fêmea pode influenciar a duração da cópula pela adoção de um comportamento de rejeição, seja induzindo ou forçando o término da cópula. Em contraste, o controle do macho ocorre na tentativa de reduzir a competição espermática e garantir um maior sucesso reprodutivo (CUATIANQUIZ; CORDERO, 2006; SINGH; SINGH, 2004). Nota-se, que os fatores que influenciam a duração da cópula já foram estudados para diversas espécies de insetos, porém são dependentes da precedência do esperma, status reprodutivo da fêmea, padrões de oviposição, tamanho e idade do macho, dentre outras (JOTHY-SIVA, 1987; KOREF-SANTIBÁÑEZ, 2001; PARKER, 1970; SINGH; SINGH, 2004).

De acordo com os resultados encontrados a fecundidade foi influenciada pelo sistema de acasalamento, assim as fêmeas submetidas a monogamia apresentaram um aumento no número total de ovos produzidos comparativamente a fêmeas submetidas a cópulas repetidas e poliandria. A diminuição na fecundidade nas fêmeas que realizaram múltiplas cópulas sugere a existência de um custo associado a realização de múltiplas cópulas com o mesmo macho ou com machos diferentes (BYBEE et al., 2005)

A fecundidade das fêmeas é afetada pela quantidade de fluido de seminal transferido pelo macho durante a cópula. Características como o histórico de acasalamentos e tamanho do macho podem influenciar diretamente na produção de fluidos seminais (SAVALLI; FOX, 1998, 1999). No experimento visando estabelecer o efeito de múltiplas cópulas sobre a fecundidade das fêmeas de *H. hampei*, estas características do macho da broca-do-café não foram controladas podendo ter influenciado na redução do número total de ovos produzidos por fêmeas submetidas a poliandria. Em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) e diversas espécies de Lepidoptera, as fêmeas acasaladas com machos virgens apresentaram maior fecundidade comparativamente a fêmeas acasaladas múltiplas vezes com machos não virgens (HELLINSKI; HARRINGTON, 2011; TORRES-VILA; JENNIONS, 2005; SAVALLI; FOX, 1999; FOX et al., 1995;). Em *Stator limbatus* (Coleoptera: Chrysomelidae) e *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) o tamanho corporal do macho apresentou uma relação direta com a quantidade de fluido seminal produzido e transferido para a fêmea afetando a fecundidade (HELLINSKI; HARRINGTON, 2011; MOYA-LARAÑO; FOX, 2006).

A longevidade das fêmeas de *H. hampei* não foi influenciada pelo sistema de acasalamento, ou seja, a poliandria não diminuiu o tempo de vida das fêmeas, como já constatado também para outras espécies de insetos (GOWATY et al., 2010; HARANO; YASUI; MIYATAKE, 2006; SCHWARTZ; PETERSON, 2006).

A hipótese primária da evolução da poliandria para diversas espécies é a existência de benefícios materiais e/ou genéticos que favoreçam o sucesso reprodutivo da fêmea no sentido de se igualar ou sobrepor os custos resultantes das múltiplas cópulas. Esses benefícios resultariam no recebimento ou aumento de recursos que são limitantes para as fêmeas, de modo que o aumento no número de

cópulas promoveria um ganho no número de descendentes (ORSETTI; RUTOWSKI, 2003).

A recuperação larva:adulto em *H. hampei* não foi influenciada pelo sistema de acasalamento. Por outro lado, a taxa de eclosão de larvas foi superior na condição de poliandria, comparativamente à monogamia. Neste sentido, vários estudos associam um aumento na taxa de eclosão e na viabilidade dos adultos aos benefícios genéticos oriundos do recebimento de esperma vindos de machos diferentes (ENGQVIST, 2006; IVY; SAKALUK, 2005; NEWCOMER; ZEH; ZEH, 1999; PANDEY, 2010). No caso da broca-do-café, esta premissa ainda carece de mais estudos, considerando-se que alguns trabalhos demonstram que os machos desta espécie não contribuem com a carga genética da prole. Este fenômeno conhecido por haplodiploidia, faz com que o macho apesar de geneticamente diplóide, seja funcionalmente haplóide, uma vez que seus cromossomos são heterocromatizados durante a espermatogênese podendo não ser transferido para os descendentes. Entretanto, as cópulas em *H. hampei* são necessárias para produção de ovos viáveis (BRUN et al., 1995). Sendo assim, parece pouco provável que uma maior taxa de eclosão de larvas em *H. hampei* na condição de poliandria seja resultado de benefícios genéticos vindos dos machos. Em outros insetos como *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera: Gryllidae) e *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae), apesar de apresentarem mecanismos de reprodução distintos ao de *H. hampei*, a ausência de efeitos positivos associados a benefícios genéticos também foi verificado (EADY; WILSON; JACKSON, 2000; TREGENZA; WEDELL, 1998)

Por fim, deve-se considerar a possibilidade de que outros mecanismos também possam afetar o sucesso dos descendentes como, por exemplo, os possíveis efeitos maternos (TREGENZA et al., 2003). Nesta situação, as fêmeas podem variar a quantidade de recursos que fornecem aos descendentes, resultando em fortes influências na performance da prole (SIMMONS, 2005). Desse modo, fêmeas acasaladas com diferentes machos, poderiam elevar o sucesso reprodutivo dos seus descendentes (SLATYER et al., 2011). Ademais, devemos ainda considerar o ambiente maternal e sua interação com as características de nutrição, tamanho e idade materna que poderia influenciar o tamanho do ovo, sobrevivência da prole e tamanho na fase adulta (TREGENZA et al., 2003).

6 CONCLUSÕES

Existe poliandria em fêmeas da broca-do-café, *Hypothenemus hampei*;

A poliandria em *H. hampei* é influenciada pela condição fisiológica da fêmea, ocorrendo com maior frequência em fêmeas colonizadoras do que em fêmeas em oviposição;

A duração da recópula em *H. hampei* é afetada tanto pela condição fisiológica da fêmea quanto pela duração da cópula (1º macho), ou seja, quanto maior a duração da cópula (1º macho) menor a duração da recópula (2º macho);

A produção de ovos é afetada negativamente pela poliandria, comparada à monogamia, sugerindo a existência de um custo associado a realização de múltiplas cópulas;

A longevidade das fêmeas em *H. hampei* não é afetada pelo sistema de acasalamento a que as fêmeas são submetidas;

A poliandria em *H. hampei* aumenta a taxa de eclosão de larvas, comparativamente à monogamia, porém, esse mesmo efeito positivo não é observado na recuperação larva:adulto.

REFERÊNCIAS

- ALCOCK, J. Courtship and Mating in *Hippomelas planicosta* (Coleoptera : Buprestidae). **The Coleopterists Bulletin**, Washington, v. 30, n. 4, p. 343–348, 1976.
- ALCOCK, J.; EICKWORT, G.C.; EICKWORT, K.R. The reproductive behavior of *Anthidium maculosum* (Hymenoptera: Megachilidae) and the evolutionary significance of multiple copulations by females. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 2, n. 4, p. 385–396, 1977.
- ARNAUD, L.; CALLAGHAN, A.; HAUBRUGE, E. Forum insecticide resistance gene transmission by insecticide-susceptible insects. **Functional Ecology**, Oxford, v. 15, p. 812–817, 2001.
- ARNQVIST, G.; NILSSON, T. The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. **Animal Behaviour**, London, v. 60, n. 2, p. 145–164, Feb. 2000.
- BAKER, P.S.; LEY, C.; BALBUENA, R.; BARRERA, J.F. Factors affecting the emergence of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) from coffee berries, **Bulletin of Entomological Research**, Farham Royal, v. 82, p. 145–150, 1992.
- BENAVIDES, P. Aspectos genéticos relacionados con la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). In: La genética y los insectos. p. 283–297, [s.d].
- BENAVIDES, P.; VEJA, F.; ROMERO-SEVERSON, J.; BUSTILLO, A.; STUART, J. Biodiversity and biogeography of an important inbred pest of coffee, coffee berry borer (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Annals of the Entomological Society of America**, Maryland, v. 98, n. 3, p. 359–366, May 2005.
- BERGAMIN, J. Contribuição para o conhecimento de biologia da broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867). **Arquivos do Instituto Biológico**, Campinas, v. 14, p. 31-72, 1943.
- BIRKHEAD, T.; MOLLER, A.P. Female control of paternity. **Trends in ecology & evolution**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 100–104, Mar. 1993.
- BIRKHEAD, T.R.; PIZZARI, T. Postcopulatory sexual selection. **Nature Reviews**, London, v. 3, p. 262–73, Apr. 2002.
- BORSA, P.; KJELLBERGT, F. Experimental evidence for pseudo-arrhenotoky in *Hypothenemus hampei*. **Heredity**, London, v. 76, p. 130–135, 1996.
- BRENNAN, P. Sexual selection the role of parental care. **Nature Education Knowledge**, London, v. 3, n. 10, p. 79, 2012.
- BRETMAN, A.; NEWCOMBE, D.; TREGENZA, T. Promiscuous females avoid inbreeding by controlling sperm storage. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 18, p. 3340–3345, Jun. 2009.

BRUN, L.O.; STUART, J.; GAUDICHON, V.; ARONSTEIN, K.; FRENCH-CONSTANT, R.H. Functional haplodiploidy: a mechanism for the spread of insecticide resistance in an important international insect pest. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, p. 9861–9865, Oct. 1995.

BUSTILLO, E.A.; VILLALBA, A.D. Efecto del clima y condiciones de cultivo del café en la biología y comportamiento de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). In: WORKSHOP INTERNACIONAL – MANEJO DA BROCA-DO-CAFÉ, 1., 2004, Londrina. **Anais...– Manejo da Broca-do-Café**. Londrina: IAPAR, 2007. p. 37-50.

BYBEE, L. F. et al. Effects of single versus multiple mates: monogamy results in increased fecundity for the beetle *Phoracantha semipunctata*. **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 18, n. 4, p. 513–527, Jul. 2005.

CAMPBELL, J.F. Fitness consequences of multiple mating on female *Sithophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae). **Environmental Entomology**, Maryland, v. 34, n. 4, p. 833–843, May 2005.

CENICAFÉ. Cultivemos café: Beneficio. Disponível em: <http://www.cenicafe.org/es/index.php/cultivemos_cafe/beneficio/>. Acesso em: 18 nov. 2013.

CONOLLY, K.; COOK, R. Rejection responses by female *Drosophila melanogaster*: their ontogeny, causality and effects upon the behaviour of the courting male. **Behaviour**, Leiden, v. 44, n. 1, p. 142–166, 1973.

CORBETT, G.H. Some preliminary observations on the coffee berry beetle borer *Stephanoderes (Cryphalus) hampei* Ferr. **Malayan Agricultural Journal**, Kuala Lumpur, v. 21, p. 8–22, 1933.

CUATIANQUIZ, C.; CORDERO, C. Experimental manipulation of male behaviour during copulation in *Stenomacra marginella* (Heteroptera: Largidae): effect on copula duration, female remating and oviposition. **Behavioural processes**, Amsterdam, v. 73, p. 222–227, Sept. 2006

EADY, P.E.; WILSON, N.; JACKSON, M. Copulating with multiple mates enhances female fecundity but not egg-to-adult survival in the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. **Evolution**, Lancaster, v. 54, n. 6, p. 2161–2165, May 2000.

DRAPEAU, M.D.; FULLER, B.F.; RAUSER, C.L. ; LONG, A.D. Repeated mating in a lek-mating insect, *Drosophila melanogaster*. **Drosophila Information Service**, Norman, v.84, p.136-140, 2001.

EMLÉN, D.J. Integrating development with evolution: A case study with beetle horns. **BioScience**, Washington, v. 50, n. 5, p. 403–418, May 2000.

EMLÉN, S.T.; ORING, L.W. Ecology, sexual selection, and the evolution of insects mating systems. **Science**, New York, v. 197, n. 4300, p. 215–223, Jul. 1977.

- ENGQVIST, L. Females benefit from mating with different males in the scorpionfly *Panorpa cognata*. **Behavioral Ecology**, Carry, v. 17, p. 435–440, Feb. 2006.
- FEDORKA, K.M.; MOUSSEAU, T.A. Material and genetic benefits of female multiple mating and polyandry. **Animal Behaviour**, London, v. 64, p. 361–367, Dec. 2002.
- FERNÁNDEZ, S.; CORDERO, J. Biología de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) en condiciones de laboratorio. **Bioagro**, Barquisimeto, v. 19, n. 1, p. 35–40, Mar. 2007.
- FOX, C. W. et al. Paternal investment in a seed beetle (Coleoptera: Bruchidae): Influence os male size, age and mating history. **Entomological Society of America**, Maryland v. 88, n. 1, p. 100–103, Jan. 1995.
- FUKAYA, M. Effects of male body size on mating activity and female mate refusal in the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotha hilaris* (Pascoe) (Coleoptera: Cerambycidae): Are small males inferior in mating? **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 39, n. 4, p. 603–609, May 2004.
- FUKAYA, M.; YASUDA, T.; AKINO, T.; YASUI H.; WAKAMURA, S.; FUKUDA, T.; OGAWA, Y. Effects of male body size on mating behavior and female mate refusal in the white-spotted longicorn beetle, *Anoplophora malasiaca* (Thomson) (Coleoptera : Cerambycidae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 39, n. 4, p. 731–737, 2004.
- GINGERICH, D.P.; BORSA, P.; SUCKLING, D.; BRUN, L. Inbreeding in the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) estimated from endosulfan resistance phenotype frequencies. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 86, p. 667–674, 1996.
- GIORDANENGO, P.; BRUN, L.; FREROT, B. Evidence for allelochemical attraction of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, by coffee berries. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 19, n. 4, p. 763–769, 1993.
- GOWATY, P. A. et al. Polyandry increases offspring viability and mother productivity but does not decrease mother survival in *Drosophila pseudoobscura*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 31, p. 13771–6, Aug. 2010.
- HARANO, T.; YASUI, Y.; MIYATAKE, T. Direct effects of polyandry on female fitness in *Callosobruchus chinensis*. **Animal Behaviour**, London, v. 71, n. 3, p. 539–548, 2006.
- HELINSKI, M. E. H.; HARRINGTON, L. C. Male mating history and body size influence female fecundity and longevity of the dengue vector *Aedes aegypti*. **Journal of Medical Entomology**, Lanham, v. 48, n. 2, p. 202–211, Mar. 2011.
- HUNTER, F.M.; PETRIE, M.; OTRONEN, M.; BIRKHEAD, T.; MOLLER, A.P. Why do females copulate repeatedly with one male? **Trends in ecology & evolution**, Amsterdam, v. 8, n. 1, p. 21–26, 1993.

- IVY, T.M.; SAKALUK, S.K. Polyandry promotes enhanced offspring survival in decorated crickets. **Evolution**, Lancaster, v. 59, n. 1, p. 152–159, 2005
- JARAMILLO, J.; BORGEMEISTER, C.; BAKER, P. Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): searching for sustainable control strategies. **Bulletin of Entomological Research**, Farnham Royal, v. 96, p. 223–233, 2006
- JARAMILLO, J.; CHABI-OLAYE, A.; KAMONJO, C.; JARAMILLO, A.; VEGA, F.; POEHLING, H. M.; BORGEMEISTER, C. Thermal Tolerance of the Coffee Berry Borer *Hypothenemus hampei*: Impact on a Tropical Insect Pest Predictions of Climate Change. **Plos One**, San Francisco, v. 4, n. 8, p. 1–11, 2009.
- JENNIONS, M.D.; PETRIE, M. Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. **Biological Reviews**, Cambridge, v. 75, p. 21–64, 2000.
- JENNIONS, M.D.; HUNT, J.; GRAHAM, R.; BROOKS, R. No evidence for inbreeding avoidance through postcopulatory mechanisms in the black field cricket, *Teleogryllus commodus*. **Evolution**, Lancaster, v. 58, n. 11, p. 2472–2477, 2004.
- JOTHY-SIVA, M.T. Variation in copulation duration and the resultant degree of sperm removal in *Orthetrum cancellatum* (L.) (Libellulidae : Odonata). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, New York, v. 20, p. 147–151, 1987.
- KLUG, H. HEUSCHELE, J.; JENNIONS, M. D.; KOKKO, H. The mismeasurement of sexual selection. **Journal of Evolutionary Biology**, Basel, v. 23, n. 3, p. 447–462, 2010.
- KIRKENDALL, L.R. The evolution of mating systems in bark and ambrosia beetles (Coleoptera: Scolytidae and Platypodidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, London, v. 77, n. 4, p. 293–352, 1983.
- KOREF-SANTIBÁÑEZ, S. Effects of age and experience on mating activity in the sibling species *Drosophila pavani* and *Drosophila gaucha*. **Behavior Genetics**, New York, v.31, n. 3, p. 287–297, May2001.
- KVARNEMO, C.; AHNESJO, I. The dynamics of operational sex ratios. **Trends in ecology & evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 10, p. 404–408, out. 1996.
- LÓPEZ-GUILLÉN, G. ;CARRASCO, J.V.; CRUZ-LOPEZ, L.; BARRERA, J.F. MALO, E.; ROJAS, J. C. Morphology and Structural Changes in Flight Muscles of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae) Females. **Environmental Entomology**, Maryland, v. 40, n. 2, p. 441–448, Apr. 2011.
- MADSEN, T. Shine, R.; Loman, J.; Hakansson, T. Why do female adders copulate so frequently? **Nature**, London, v. 355, p. 440-441, Jan. 1992.
- MATHIEU, F.; BRUN, L.O.; FRÉROT, B. Factors related to native host abandonment by the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Col., Scolytidae). **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 121, n. 1/5, p. 175–180, 1997.

MATHIEU, F. GAUDICHON, V.; BRUN, L.; FRÉROT, B. Effect of physiological status on olfactory and visual responses of female *Hypothenemus hampei* during host plant colonization. **Physiological Entomology**, Oxford, v. 26, p. 0–4, Mar. 2001.

MICHALCZYK, L.; MILLARD, A.L.; OLIVER, M.; LUMLEY, A.; EMERSON, B.; CHAPMAN, T.; GAGE, M. Inbreeding promotes female promiscuity. **Science**, New York, v. 333, p. 1739–1742, Sept. 2011.

MOLLER, A.P. Frequency of Female Copulations with Multiple Males and Sexual Selection. **The American Naturalist**, Chicago, v. 139, n. 5, p. 1089–1101, May 1992.

MOYA-LARANO, J.; FOX, C. W. Ejaculate size, second male size, and moderate polyandry increase female fecundity in a seed beetle. **Behavioral Ecology**, Carry, v. 17, n. 6, p. 940–946, Jul. 2006.

NEWCOMER, S.D.; ZEH, J.A.; ZEH, D.W. Genetic benefits enhance the reproductive success of polyandrous females. **Evolution**, Lancaster, v. 96, p. 10236–10241, Aug. 1999.

NILSSON, T. Polyandry and the evolution of reproductive divergence in insects. 2004. Thesis (Department of Ecology and Environmental Science) - Umeå University, Umeå, 2002. Disponível em: <<http://umu.diva-portal.org/smash/get/diva2:142064/FULLTEXT01>>. Acesso em: 05 out 2013.

ORSETTI, D.M.; RUTOWSKI, R.L. No material benefits, and a fertilization cost, for multiple mating by female leaf beetles. **Animal Behaviour**, London, v. 66, n. 3, p. 477–484, Sept. 2003.

PANDEY, O. Benefits of polyandry in Parthenium beetle, *Zygogramma bicolorata* Pallister (Coleoptera: Chrysomelidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology**, South Korea, v. 13, n. 2, p. 151–155, Jan. 2010.

PARKER, G.A. Sperm competition and its evolutionary on copula duration in the fly *Scatophaga stercoraria*. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 16, p. 1301–1328, Jan. 1970.

PÉREZ-STAPLES, D.; SHELLY, T.E.; YUVAL, B. Female mating failure and the failure of “mating” in sterile insect programs. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 146, n. 1, p. 66–78, Jun. 2013.

REYNOLDS, J.D. Animal breeding systems. **Trends in ecology & evolution**, Amsterdam, v. 11, n. 2, p. 68–72, Feb. 1996.

RIDLEY, M. Clutch size and mating frequency in parasitic Hymenoptera. **The American Naturalist**, Chicago, v. 142, n. 5, p. 893–910, Nov. 1993.

RINGO, J. Sexual receptivity in insects. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v. 41, p. 473–494, 1996.

- RINGO, J.; TALYN, B.; BRANNAN, M. Effects of precocene and low protein diet on reproductive behavior in *Drosophila melanogaster* (Diptera : Drosophilidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Maryland, v. 98, n. 4, p. 601–607, Jul. 2005.
- RUTLEDGE, C.E.; KEENA, M.A. Mating Frequency and Fecundity in *Agrilus anxius* (Coleoptera: Buprestidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Maryland, v. 105, n. 6, p. 852–858, Jul. 2012.
- SAVALLI, U. M.; FOX, C. W. Sexual selection and the fitness consequences of male body size in the seed beetle *Stator limbatus*. **Animal behaviour**, London, v. 55, n. 2, p. 473–83, Feb. 1998.
- SAVALLI, U. M.; FOX, C. W. The effect of male mating history on paternal investment, fecundity and female remating in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. **Functional Ecology**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 169–177, Apr. 1999.
- SCHWARTZ, S. K.; PETERSON, M. A. Strong material benefits and no longevity costs of multiple mating in an extremely polyandrous leaf beetle, *Chrysochus cobaltinus* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Behavioral Ecology**, Carry, v. 17, n. 6, p. 1004–1010, Ago. 2006.
- SHUSTER, S.M.; WADE, M.J. Mating Systems and Strategies. Princeton University Press, 2003. p. 552.
- SHUTT, B.; STABLES, L.; ABOAGYE-ANTWI, F.; MORAN, J.; TRIPET, F. Male accessory gland proteins induce female monogamy in anopheline mosquitoes. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 91–94, Nov. 2010.
- SILVA, W.D.; MASCARIN, G.M.; ROMAGNOLI, E.M.; BENTO, J.M.S. Mating Behavior of the Coffee Berry Borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 25, p. 408–417, Dec. 2012.
- SIMMONS, L.W. The evolution of polyandry: an examination of the genetic incompatibility and good-sperm hypotheses. **Science**, New York, v. 14, p. 585–594, 2001.
- SIMMONS, L.W. The Evolution of Polyandry: Sperm Competition, Sperm Selection, and Offspring Viability. **Annual review of ecology, evolution and systematics**, Palo Alto, v. 36, p. 125–146, Aug.. 2005.
- SIMMONS, L.W.; WEDELL, N.; BEVERIDGE, M.; TREGENZA, T. Postcopulatory inbreeding avoidance by female crickets only revealed by molecular markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, p. 3817–3824, Jun. 2006.
- SINGH, R.S.; SINGH, B.N. Female remating in *Drosophila* : Comparison of duration of copulation between first and second matings in six species. **Current Science**, Bangalore, v. 86, n. 3, p. 146–149, Feb. 2004.

SLATYER, R.A.; MAUTZ, B.S.; BACKWELL, P.; JENNIONS, M.D. Estimating genetic benefits of polyandry from experimental studies: a meta-analysis. **Biological reviews**, Cambridge, v. 87, p. 1–33, Apr. 2011.

TENG, Z.-Q.; KANG, L. Egg-hatching benefits gained by polyandrous female locusts are not due to the fertilization advantage of nonsibling males, **Evolution**, Lancaster, v. 61, n. 2, p. 470–476, Feb. 2007.

THORNHILL, R.; ALCOCK, J. The evolution of insect mating systems. Cambridge: Harvard University Press, 1983. p. 547

TORRES-VILA, L. M.; JENNIONS, M. D. Male mating history and female fecundity in the Lepidoptera: do male virgins make better partners? **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 57, n. 4, p. 318–326, Nov. 2004.

TREGENZA, T.; WEDELL, N.; HOSKEN, D.J.; WARD, P.I. Maternal effects on offspring depend on female mating pattern and offspring environment in yellow dung flies. **Evolution**, Lancaster, v. 57, n. 2, p. 297–304, Feb. 2003.

TREGENZA, T.O.M.; WEDELL, N. Benefits of multiple mates in the cricket *Gryllus bimaculatus*, **Evolution**, Lancaster, v. 52, n. 6, p. 1726–1730, Dec. 1998.

TREGENZA, T.; WEDELL, N. Polyandrous females avoid costs of inbreeding. **Nature**, London, v. 415, p. 71–73, Jan. 2002.

TRIPLEHORN, A.C. **Estudo dos insetos**. São Paulo: Cengage Learning, 2011. 809p. Trad. da 7.ed. de Borror and Delong's introduction to the study of insects.

VEGA, F.E. INFANTE, F.; CASTILLO, A.; JARAMILLO, J. The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with recent findings and future research directions. **Terrestrial Arthropod Reviews**, Washington, v. 2, n. 2, p. 129–147, Nov. 2009.

WEDELL, N. Female receptivity in butterflies and moths. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 208, n.18, p. 3433–3440, Sept. 2005.

WIKLUND, C.; KARLSSON, B.; LEIMAR, O. Sexual conflict and cooperation in butterfly reproduction: a comparative study of polyandry and female fitness. **Proceedings of the Royal Society**, London, v. 268, n. 1477, p. 1661–1667, Ago. 2001.

ZEH, J.A.; ZEH, D.W. Reproductive mode and the genetic benefits of polyandry. **Animal Behaviour**, London, v. 61, n. 6, p. 1051–1063, Jun. 2001.

ANEXO

Anexo A – Processo de beneficiamento do fruto de café para obtenção de grãos de alta qualidade para a criação em laboratório de broca-do-café

Visando a obtenção de café “pergaminho” de melhor qualidade foram coletados frutos de café cereja sadios e realizado beneficiamento manualmente. O procedimento utilizado foi baseado no processo de beneficiamento úmido (CENICAFÉ, 2012), que ocorre em três partes: (i) Coleta: Obtenção frutos de café cereja sadios (Figura 7 A); (ii) Despulpamento: Separação dos grãos da casca manualmente apertando-se uma das extremidades do fruto (Figura 7 B). Para facilitar a separação o processo é feito com os frutos dentro de um recipiente com água; (iii) Retirada da mucilagem: após o despulpamento, uma camada chamada de mucilagem açucarada permanece envolvendo os grãos. A separação da mucilagem foi realizada pelo método biológico, no qual o grão foi mantido imerso em água e sofreu uma fermentação natural que destrói a goma açucarada que envolve o pergaminho (Figura 7 C). Diariamente, durante três ou quatro dias foi feita a lavagem dos grãos e a troca da água. Após o término deste processo os grãos foram expostos ao sol em camada única sobre um papel absorvente até a secagem do pergaminho. Utilizando esta metodologia os grãos “pergaminho” apresentaram aparência mais homogênea e melhor qualidade para a criação da broca-do-café (Figura 8).



Figura 7 - Processo de beneficiamento do café por via úmida: (A) Frutos de café (*Coffea arabica* L. Var. Catuaí Amarelo); (B) Descascamento e (C) Imersão em água para retirada da mucilagem



Figura 8 – Diferença entre grão “pergaminho” de origem industrial (A) e grão “pergaminho” beneficiado manualmente em laboratório por via úmida (B), para criação de *Hypothenemus hampei*