

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Tese

Técnicas de criação, bioecologia e competição interespecífica de parasitoides
(Hymenoptera: Braconidae) de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae)

Rafael da Silva Gonçalves

Pelotas, 2016

Rafael da Silva Gonçalves

Técnicas de criação, bioecologia e competição interespecífica de parasitoides (Hymenoptera: Braconidae) de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fitossanidade (área do conhecimento: Entomologia).

Orientador: Dr. Dori Edson Nava

Coorientador: Dr. Anderson Dionei Grützmacher
Dr^a. Beatriz Águiar Jordão Paranhos
Dr. Nicholas Chirivas Manoukis

Pelotas, 2016

Banca examinadora:

Dr. Anderson Dionei Grützmacher (Co-orientador)

Dr^a. Regina Sugayama

Dr^a. Simone Mundstock Jahnke

Dr. Moises João Zotti

Dr. Adalécio Kovaleski

Aos meus pais Neiva e Daili pelo exemplo de vida.

Aos meus irmãos Filipe, Henrique e Laura.

À minha esposa Daiane Hellnvig Zarnott pelo amor, dedicação, cumplicidade e sabedoria.

DEDICO E OFEREÇO

Agradecimentos

Aos meus familiares, em especial minha mãe Neiva Maria da Silva, meu pai Daili Ferreira Gonçalves, meus irmãos Filipe, Henrique e Laura pela confiança, dedicação e amor;

À minha esposa Daiane Hellnwig Zarnott por toda força, auxílio, dedicação, paciência, carinho e amor;

Ao Dr. Dori Edson Nava, pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Centro Nacional de Pesquisa Clima Temperado (CPACT), pela orientação, confiança, apoio, conselhos, amizade e conhecimentos compartilhados;

Ao professor Dr. Anderson Dionei Grützmacher do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da FAEM-UFPEL, pela co-orientação e ensinamentos;

Ao Dr. Nicholas Chirivas Manoukis, pesquisador do United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service, US Pacific Basin Agricultural Research Center, pela orientação, confiança, amizade e conhecimento compartilhados;

Ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado;

Aos professores, pesquisadores e colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade (PPGFs) pelos ensinamentos e atenção dispensada;

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Neide, por sua atenção, auxílio e dedicação;

Ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo no Brasil e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche;

À chefia e funcionários da Embrapa Clima Temperado pela concessão da área experimental, laboratórios e apoio para o desenvolvimento do trabalho;

À chefia e funcionário do do United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service, US Pacific Basin Agricultural Research Center pelo acolhimento e estrutura para o desenvolvimento do trabalho;

Ao Dr. Valmir Antônio Costa do Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, em Campinas, São Paulo, pela identificação dos parasitoides;

Aos colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, pelos momentos de discussão e conhecimentos compartilhados;

Aos colegas Sônia Poncio, Anderson Bolzan, Felipe Andrezza, Helter Carlos Pereira, Giovani Smaniotto, Sabrina Ongaratto, Karina Jobim, Silvana Amaral, Suélen Gonçalves Rodrigues, Cristiano Lima, Lucas Kuhn Hübner, Gabriela Inés Díez-Rodríguez, Raul da Cunha Borges Filho, Francisco Canez Neto, pelos momentos de descontração e pela dedicação e apoio em todos os momentos, bem como pela amizade construída;

Aos grandes amigos Heitor Lisbôa e Tiago Scheunemann pela amizade, companheirismo, alegria e incentivo;

Ao grande amigo Sandro Daniel Nörnberg, pela amizade, companheirismo, incentivo, bem como, pelos momentos de discussão e compartilhamento de conhecimentos;

Aos colegas do EcoLab do Agricultural Research Service - USDA, Stephanie Gayle, Julie Gaertner, Caley Saragosa, Forest Bremer, Sara Louise Rayner, Shannon Wilson, Lígia Caroline Bortolli e Ruben Machota Jr. pelo companheirismo e apoio no desenvolvimento das atividades no Hawaii;

Ao colega e amigo Thomas Manige pela paciência, auxílio, dedicação e conhecimentos compartilhados e especialmente pela amizade;

Aos funcionários do USDA Michael McKenney e Keith Shigetani pelo compartilhamento de experiências e especialmente pela amizade construída;

A todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho e me incentivaram nesta caminhada.

Resumo

GONÇALVES, Rafael da Silva. **Técnicas de criação, bioecologia e competição interespecífica de parasitoides (Hymenoptera: Braconidae) de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae)**. 2016. 182f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Um dos principais problemas da fruticultura nacional e mundial é a ocorrência das moscas-das-frutas *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) e *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae), as quais estão amplamente distribuídas e causando graves perdas na região Neotropical. Diversas espécies de parasitoides são responsáveis pela regulação populacional destas pragas agrícolas. Uma destas espécies é o endoparasitoide coinobionte *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911) que encontra-se distribuído desde a Argentina até o sul dos Estados Unidos parasitando larvas de diferentes espécies de moscas-das-frutas. Além deste, os parasitoides exóticos *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead, 1905) e *Fopius arisanus* (Sonan, 1932) (Hymenoptera: Braconidae) merecem destaque, devido a ampla utilização em programas de controle biológico. Neste sentido, os objetivos do presente trabalho foram: I) conhecer uma série de informações biológicas que possam dar suporte ao desenvolvimento de uma técnica de criação para *Do. areolatus*; II) estudar a biologia de *Do. areolatus* nos hospedeiros *A. fraterculus* e *C. capitata*; III) determinar os efeitos de diferentes temperaturas sobre as fases imaturas e adulta de *Do. areolatus*; IV) estudar o comportamento de forrageamento de *Do. areolatus* e *Di. longicaudata* em condições de competição extrínseca; V) estudar o processo de competição intrínseca entre *Do. areolatus* e *Di. longicaudata* em larvas de *A. fraterculus* e, VI) investigar os efeitos da aprendizagem sobre a eficiência de parasitismo de *F. arisanus* em *Bactrocera dorsalis*. No estudo sobre técnica de criação verificou-se que o fornecimento de 10 larvas de segundo ínstar de *A. fraterculus* pelo período de 12 horas permitiu a maximização da produção de *Do. areolatus*. Além disso, o desempenho dos insetos foi incrementado com o fornecimento de dieta com concentração de mel de 60%. O estudo da biologia de *Do. areolatus* em larvas de *A. fraterculus* e *C. capitata* demonstra que os parâmetros demográficos dos parasitoides multiplicados em larvas de *A. fraterculus* foram superiores aos dos insetos multiplicados em *C. capitata*. Além disso, larvas de *A. fraterculus* proporcionaram a produção de insetos com maior peso e comprimento de tibia. No que diz respeito ao impacto de diferentes temperaturas sobre as fases imaturas de *Do. areolatus*, verificou-se que houve desenvolvimento em todas as temperaturas estudadas. O limiar térmico inferior de desenvolvimento e a constante térmica de machos e fêmeas de *Do. areolatus* foram de 8,04 e 8,15 °C, e de 358,05 e 399,97 graus dias. Sobre a fase adulta observamos que a longevidade de machos e fêmeas foi inversamente proporcional à temperatura, variando de 27,83 a 8,41 dias para machos e de 42,75 a 16,58 dias para fêmeas. Analisando conjuntamente os parâmetros demográficos, verificamos que a faixa térmica ideal para a manutenção dos adultos varia entre 22 e 25 °C. Nos bioensaios de competição intrínseca com exposições sequenciais de larvas de *A. fraterculus*, foi observado que larvas expostas para *Do. areolatus* em segundo ínstar e para *Di. longicaudata* no terceiro,

possibilitam que *Do. areolatus* supere seu competidor. Nos estudos de competição extrínseca verificou-se que as fêmeas de *Do. areolatus*, diferentemente de *Di. longicaudata*, são capazes de discriminar frutos previamente explorados pelo seu competidor, por meio do reconhecimento de sinais químicos. Além disso, o processo de forrageamento hospedeiro de ambas as espécies é alterado quando são expostas à frutos já explorados pela espécie competidora. Os estudos de aprendizagem com *F. arisanus* demonstraram que a eficiência de parasitismo deste é incrementada por experiências prévias de parasitismo e que este efeito independe da idade dos parasitoides.

Palavras-chave: *Anastrepha fraterculus*, *Ceratitis capitata*, *Doryctobracon areolatus*, *Diachasmimorpha longicaudata*, *Fopius arisanus*

Abstract

GONÇALVES, Rafael da Silva. **Bioecology and interspecific competition of parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) of the fruit flies (Diptera: Tephritidae).** 2016. 182p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

One of the main problems of national and global fruit production is the occurrence of the fruit flies *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), which are widely distributed and causing serious losses in the Neotropical region. Several species of parasitoids are responsible for population regulation of agricultural pests. One such species is the koinobiont endoparasitoid *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911) that is distributed from Argentina to the southern United States parasitizing larvae of different species of fruit flies. Apart from this, the exotic parasitoids *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead, 1905) and *Fopius arisanus* (Sonan, 1932) (Hymenoptera: Braconidae) are worth mentioning, due to extensive use in biological control programs. Thus, the current study aimed to: i) develop a background biological to support the development of a mass rearing technique of *Do. areolatus*; II) study the biology of *Do. areolatus* in the hosts *A. fraterculus* and *C. capitata*; III) determine the effects of different temperatures on the immature and adult stages of *Do. areolatus*; IV) study the foraging behavior of *Do. areolatus* and *Di. longicaudata* in extrinsic competition; V) study the intrinsic competition process between *Do. areolatus* and *Di. longicaudata* in larvae of *A. fraterculus* and VI) investigate the effects of learning about *F. arisanus* parasitism efficiency in *Bactrocera dorsalis* (Hendel, 1912) (Diptera: Tephritidae). In the study of rearing technique it has been found that providing 10 second instar larvae of *A. fraterculus* for 12 hours allowed maximizing production of *Do. areolatus*. Furthermore, the performance of this insect was increased with the supply of a diet with 60% honey concentration. The study of biology of *Do. areolatus* in *A. fraterculus* and *C. capitata* larvae showed that the demographic parameters of parasitoids multiplied in *A. fraterculus* larvae were higher than the insects multiplied in *C. capitata*. Also, *Do. areolatus* reared in *A. fraterculus* were heavier and had a longer tibia than those reared in *C. capitata*. The lower thermal threshold and the thermal constant of males and females of *Do. areolatus* were 8.04 and 8.15 °C and 358.05 and 399.97 degrees days. On the adult stage we observed that the longevity of males and females was inversely proportional to temperature, ranging from 27.83 to 8.41 days for males and 42.75 to 16.58 days for females. By analyzing demographic parameters, we find that the ideal temperature range for the maintenance of adult varies between 22 and 25 °C. In intrinsic competition studies with sequential exposures of *A. fraterculus* larvae, it was found that larvae exposed to *Do. areolatus* in second instar and then to *Di. longicaudata* in the third instar, enable *Do. areolatus* overcome your competitor. In extrinsic competition studies it was found that *Do. areolatus* females, unlike *Di. longicaudata*, are able to discriminate fruits previously exploited by its competitor, by recognizing chemical cues. In addition, the foraging behavior of both species was altered when they are exposed to fruit already explored

by competitor species. Studies of learning, with *F. arisanus* showed that parasitism efficiency of this parasitoid is increased by previous experiences of parasitization, and that this effect is independent of the age of the parasitoids.

Key words: *Anastrepha fraterculus*, *Ceratitis capitata*, *Doryctobracon areolatus*, *Diachasmimorpha longicaudata*, *Fopius arisanus*

Lista de Figuras

Artigo 1

- Figura 1 Número de descendentes (A) e descendentes emergidos (B) de *Doryctobracon areolatus* em relação ao tempo de exposição das larvas ao parasitismo (2, 4, 6, 8,10 e 12 horas) (Temperatura: 25 ± 2 °C, Umidade relativa: 70 ± 10 % Fotofase: 12 horas). As barras verticais representam os intervalos de confiança ($p < 0,05$)..... 48
- Figura 2 Número de descendentes (A) e de fêmeas (B) de *Doryctobracon areolatus* produzidos em função da densidade de larvas de *Anastrepha fraterculus* (5, 10, 15, 20, 25 e 30) (Temperatura: 25 ± 2 °C, Umidade relativa: 70 ± 10 % Fotofase: 12 horas). Barras verticais representam os intervalos de confiança ($p < 0,05$)..... 49
- Figura 3 Número de descendentes (A) descendentes emergidos (B) e razão sexual (C) produzidos por fêmeas de *Doryctobracon areolatus* alimentadas com dietas contendo diferentes concentrações de mel (20, 50, 80 e 100 %) (25 ± 2 °C, RH 70 ± 10 %; 12:12 h) (Temperatura: 25 ± 2 °C, Umidade relativa: 70 ± 10 % Fotofase: 12 horas)..... 50
- Figura 4 Parasitismo diário e acumulado de fêmeas de *Doryctobracon areolatus*, em larvas de *Anastrepha fraterculus*, alimentadas com dietas contendo diferentes concentrações de mel (Temperatura: 25 ± 2 °C, Umidade relativa: 70 ± 10 % Fotofase: 12 horas)..... 51
- Figura 5 Curvas de sobrevivência de fêmeas (A) e machos (B) de *Doryctobracon areolatus* alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de mel (Temperatura: 25 ± 2 °C, Umidade relativa: 70 ± 10 % Fotofase: 12 horas). Curvas identificadas com a mesma letra, para cada sexo, não diferem entre si. TSM - tempo médio de sobrevivência..... 52

Artigo 2

- Figura 1 Curvas de sobrevivência de fêmeas (A) e machos (B) adultos de *D. areolatus* criados em larvas de *A. fraterculus* e *C. capitata*. Temperatura: 25 ± 2 °C; UR: 70 ± 10 %; fotofase: 12 horas. Curvas em (A) e (B) não diferem significativamente

entre si. TMS: tempo médio de sobrevivência..... 74

Artigo 3

- Figura 1 Curva de velocidade de desenvolvimento do período ovo-adulto de *Doryctobracon areolatus* em diferentes temperaturas. (A) Fêmeas, (B) Machos. Umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas..... 102
- Figura 2 Modelos de regressão utilizadas para descrever a influência da temperatura nos parâmetros demográficos de *Doryctobracon areolatus*. (A) Taxa líquida de reprodução. (B) Taxa intrínseca de crescimento. (C) Taxa finita de aumento. (D) Intervalo médio entre gerações. Barras verticais representam os intervalos de confiança..... 103
- Figura 3 Parasitismo diário e acumulado de *Doryctobracon areolatus* em larvas de *Anastrepha fraterculus* em diferentes temperaturas. Umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas..... 104
- Figura 4 Curvas de sobrevivência de *Doryctobracon areolatus* mantidos em diferentes temperaturas. (A) Fêmeas, (B) Machos. Curvas seguidas pelas mesmas letras, para cada sexo, não diferem entre si pelo teste de log-rank. (TMS - tempo médio de sobrevivência)..... 105

Artigo 4

- Figura 1 Resposta olfativa de *Do. areolatus* em olfatômetro tipo "Y" a combinações de voláteis. As barras representam a resposta final dos insetos. ** representa diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado ($p \leq 0,05$)..... 130
- Figura 2 Resposta olfativa de *Di. longicaudata* em olfatômetro tipo "Y" a diferentes combinações de odores. As barras representam a resposta final dos insetos. * representa diferença significativa e ^{ns} diferença não significativa entre os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado ($p \leq 0,05$)..... 131

Artigo 5

- Figura 1 Parasitismo (EP) de larvas de *A. fraterculus* submetidas a diferentes regimes de exposição. Barras com a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal Wallis ($\alpha \leq 0,05$) (Letras maiúsculas se referem a comparação das médias de *Do. areolatus* e letras minúsculas se referem a

	comparação das médias de <i>D. longicaudata</i>).....	154
Figura 2	Parasitismo (EP) de larvas de <i>A. fraterculus</i> de diferentes ínstares submetidas a diferentes regimes de exposição. Barras pretas com a mesma letra maiúscula não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha \leq 0,05$). Barras cinzas com a mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal Wallis ($\alpha \leq 0,05$).....	155

Artigo 6

Figura 1	Parasitismo, superparasitismo e eclosão de ovos de <i>B. dorsalis</i> expostos para fêmeas de <i>F. arisanus</i> com diferentes experiências de oviposição. As barras de erro representam o erro padrão.....	176
Figura 2	Percentual de parasitoides emergidos, não emergidos e razão sexual da população descendente produzida por fêmeas de <i>F. arisanus</i> com diferentes experiências de oviposição. As barras de erro representam o erro padrão.....	177

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Médias (\pm EP) do total de descendentes, descendentes emergidos e razão sexual de <i>Doryctobracon areolatus</i> criados em larvas de <i>Anastrepha fraterculus</i> de diferentes instares em teste de livre escolha e confinamento. Temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 70 ± 10 % e fotofase de 12 horas.....	46
Tabela 2	Número total (\pm EP) de descendentes, descendentes emergidos e razão sexual de <i>Doryctobracon areolatus</i> mantidos com diferentes dietas à base de mel. Temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h.....	47

Artigo 2

Tabela 1	Peso de pupários de <i>A. fraterculus</i> e <i>C. capitata</i> , número total de descendentes, percentual de emergência e razão sexual de <i>D. areolatus</i> criados em ambos hospedeiros.....	71
Tabela 2	Valores médios (\pm EP) do comprimento da tibia posterior e do peso de adultos machos e fêmeas de <i>D. areolatus</i> criados em larvas de <i>A. fraterculus</i> e <i>C. capitata</i>	72
Tabela3	Parâmetros demográficos de <i>D. areolatus</i> criado em larvas de <i>A. fraterculus</i> e <i>C. capitata</i>	73

Artigo 3

Tabela 1	Duração do período de desenvolvimento ovo-adulto (média \pm erro padrão) de machos e fêmeas e razão sexual de <i>Doryctobracon areolatus</i> em diferentes temperaturas. Umidade relativa de 70 ± 10 % e fotofase de 12 horas.....	101
----------	--	-----

Artigo 4

Tabela1	Tempo de latência (média \pm EP) de fêmeas de <i>Do. areolatus</i> e <i>Di. longicaudata</i> em resposta a diferentes compostos voláteis.....	132
---------	---	-----

Tabela 2	Descrição dos principais eventos comportamentais envolvidos no forrageamento hospedeiro dos parasitoides <i>Do. areolatus</i> e <i>Di. longicaudata</i>	133
Tabela 3	Tempo despendido por fêmeas de <i>Do. areolatus</i> para execução dos eventos comportamentais envolvidos no processo de forrageamento de frutos infestados com <i>A. fraterculus</i> e explorados pelo competidor <i>Di. longicaudata</i> . (Temperatura: 25 ± 2 °C, umidade relativa: 60 ± 10 % e fotofase:12 horas).....	134
Tabela 4	Tempo despendido por fêmeas de <i>Di. longicaudata</i> para execução dos eventos comportamentais envolvidos no processo de forrageamento de frutos infestados com <i>A. fraterculus</i> e explorados pelo competidor <i>Do. areolatus</i> . (Temperatura: 25 ± 2 °C, umidade relativa: 60 ± 10 % e fotofase:12horas).....	135

Artigo 6

Tabela 1	Percentual de parasitismo, superparasitismo e eclosão (média \pm erro padrão) de ovos de <i>B. dorsalis</i> expostos para fêmeas de <i>F. arisanus</i> com diferentes idades.....	174
Tabela 2	Percentual de parasitoides emergidos e não emergidos, e razão sexual dos descendentes produzidos por fêmeas de <i>F. arisanus</i> com diferentes idades.....	175

Sumário

1 - Introdução Geral	20
2 - Artigo 1 - Bases biológicas para o desenvolvimento de um protocolo de criação de <i>Doryctobracon areolatus</i> (Szépligeti) em <i>Anastrepha fraterculus</i> (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae)	25
Resumo.....	26
Abstract.....	27
Introdução	28
Material e Métodos.....	29
Experimento 1 - Determinação do ínstar para parasitismo	31
Experimento 2 - Determinação do tempo ideal de exposição das larvas aos parasitoides	32
Experimento 3 - Determinação da capacidade de parasitismo de <i>D. areolatus</i> ..	32
Experimento 4 - Efeito de diferentes concentrações de mel na biologia de <i>D. areolatus</i>	33
Análise estatística	34
Resultados e Discussão.....	35
Agradecimentos	41
Referências bibliográficas	41
3 - Artigo 2 - Biologia de <i>Doryctobracon areolatus</i> em larvas de <i>Anastrepha fraterculus</i> e <i>Ceratitis capitata</i>	54
Resumo.....	54
Abstract.....	56
Introdução	57
Material e Métodos.....	58
Colônias de insetos	58
Biologia de <i>D. areolatus</i>	59
Análise Estatística	60
Resultados	61

Discussão	62
Agradecimentos	65
Referências.....	65
4 - Artigo 3 - Bionomia, exigências térmicas e tabela de vida de fertilidade de <i>Doryctobracon areolatus</i> em diferentes condições térmicas	76
Resumo.....	77
Abstract.....	78
Introdução	79
Materiais e Métodos.....	81
Colônias de manutenção	81
Biologia das fases imaturas de <i>D. areolatus</i> e determinação das exigências térmicas	82
Biologia dos adultos e determinação dos parâmetros demográficos de <i>D. areolatus</i>	83
Análise estatística.....	84
Resultados	85
Biologia das fases imaturas de <i>D. areolatus</i> e determinação	85
das exigências térmicas.....	85
Biologia dos adultos e determinação dos parâmetros demográficos de <i>D. areolatus</i>	86
Discussão	87
Referências.....	93
5 - Artigo 4 - Competição extrínseca entre o parasitoide nativo <i>Doryctobracon areolatus</i> e o exótico <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> (Hymenoptera: Braconidae): evidências comportamentais do reconhecimento heteroespecífico	107
Resumo.....	108
Abstract.....	109
1. Introdução	110
2. Material e Métodos.....	112
2.1. Material biológico	112
2.2. Bioensaios olfatométricos	113
2.3. Bioensaios comportamentais.....	115
3. Resultados	117
3.1. Bioensaios olfatométricos	117
3.2. Bioensaios comportamentais.....	117

4. Discussão	118
5. Agradecimentos	123
6. Referências.....	123
6 - Artigo 5 - Há possibilidades de <i>Doryctobracon areolatus</i> (Hymenoptera: Braconidae) vencer uma competição intrínseca contra <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> ?.....	137
Resumo.....	137
Abstract.....	139
Introdução.....	140
Material e Métodos.....	142
Material biológico.....	142
Experimento 1.....	143
Experimento 2.....	145
Análise estatística.....	145
Resultados.....	146
Experimento 1.....	146
Experimento 2.....	146
Discussão	147
Agradecimentos.....	150
Referências.....	150
7 - Artigo 6 - O efeito da experiência de <i>Fopius arisanus</i> no parasitismo de <i>Bactrocera dorsalis</i>	157
Resumo.....	158
Abstract.....	159
Introdução.....	160
Material e Métodos.....	161
Material biológico.....	161
Experimento 1 - Efeito da experiência de oviposição das fêmeas de <i>F. arisanus</i>	162
Experimento 2 - Efeito da idade das fêmeas de <i>F. arisanus</i>	163
Análise estatística.....	163
Resultados.....	164
Experimento 1 - Efeito da experiência de oviposição das fêmeas de <i>F. arisanus</i>	164
Experimento 2 - Efeito da idade das fêmeas de <i>F. arisanus</i>	165

Discussão	165
Agradecimentos	169
Referências.....	169
8 - Conclusões	178
9 - Referências.....	179

1 - Introdução Geral

A fruticultura brasileira é considerada uma das atividades mais dinâmicas da economia e tem se destacado como uma das principais atividades agrícolas. Os fatores que contribuem para o desenvolvimento da fruticultura brasileira dizem respeito, principalmente, às condições climáticas favoráveis, bem como à disponibilidade de áreas para cultivo (AGRIANUAL, 2010).

No mundo 800 milhões de toneladas de frutas são produzidas ao ano, e atualmente, o Brasil consolida a terceira posição em produção de frutas em nível mundial (ANUÁRIO BRASILEIRO DA FRUTICULTURA, 2015), atrás apenas da China e da Índia. No Brasil a área cultivada com frutíferas é de cerca de 2.260 milhões de hectares e a produção encontra-se ao redor de 43 milhões de toneladas/ano (IBRAF, 2010).

Embora exista certa especialização regional, especialmente em função das condições climáticas, a produção de frutas ocorre em todo o território nacional. Assim, as regiões mais próximas da linha do Equador possuem maior importância na produção de frutíferas de clima tropical, com destaque à produção de banana, manga, cacau, melão, etc. Já nas regiões mais ao Sul, destacam-se as frutíferas de clima sub-tropical e temperado, como por exemplo, o pêssego, pera e maçã.

Ademais, tem-se os sérios problemas fitossanitários decorrentes, principalmente, da ação de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae), as quais contribuem para o aumento das perdas tanto qualitativas como quantitativas. Além disso, estes insetos-praga limitam as exportações de frutas, em decorrência das barreiras quarentenárias impostas pelos países importadores. No mundo inteiro, os tefritídeos representam o maior entrave ao livre trânsito de frutas (FACHOLI; UCHÔA, 2006; DUARTE; MALAVASI, 2000). No Brasil as espécies de moscas-das-frutas de importância econômica para os países importadores são: *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830), *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835), *Anastrepha grandis* (Macquart, 1846), *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824), bem

como, *Bactrocera carambolae* Drew e Hancock, 1994 (Diptera: Tephritidae) (MALAVASI; NASCIMENTO, 2003).

A mosca-das-frutas sul-americana, *A. fraterculus*, ocorre desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (MALAVASI; ZUCCHI; SUGAYAMA, 2000). No Brasil, esta espécie encontra-se amplamente distribuída e é considerada praga-chave de diversas frutíferas de interesse econômico e frutas nativas. Nos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina é considerada uma espécie predominante, pois representa cerca de 95% das espécies de *Anastrepha* coletadas em armadilhas nos pomares (SALLES; KOVALESKI, 1990). Alguns estudos realizados em municípios do estado de Santa Catarina demonstram que *A. fraterculus* foi a espécie constante, mais frequente, muito abundante e dominante (GARCIA; CAMPOS; CORSEUIL, 2003).

A gama de frutos hospedeiros utilizados por *A. fraterculus* compreende mais de 90 espécies de plantas distribuídas em 20 famílias botânicas (ZUCCHI, 2007). Na região Sul do Brasil, *A. fraterculus* ataca diversas frutíferas, como por exemplo, pessegueiro [(*Prunus persica* Batsch)], ameixeira [(*Prunus salicina* Lindl)], nectarineira [(*Prunus persica* var. *nucipersica* (Suckow)], macieira [(*Malus domestica* Borkh)], videira [(*Vitis vinifera* Linnaeus)], além de espécies nativas (SALLES; KOVALESKI, 1990; GARCIA; CAMPOS; CORSEUIL, 2003; ZART; BOTTON; FERNANDES, 2011; NUNES et al., 2012).

A mosca-do-mediterrâneo, *C. capitata* é a espécie de maior importância econômica no âmbito mundial, e encontra-se distribuída em todas as áreas tropicais e subtropicais do mundo (ZUCCHI, 2000). No Brasil esta espécie é a única do gênero e está presente em praticamente todos os Estados (ZUCCHI, 2000). No Rio Grande do Sul, encontra-se restrita às zonas urbanas (MALAVASI; ZUCCHI, 2000). Contudo, alguns exemplares já foram detectados próximos a pomares comerciais dos municípios de Pelotas e Capão do Leão, representando, praticamente, a totalidade de moscas coletadas em caquizeiro, além de estarem presentes em diversas outras frutíferas (NAVA et al., 2008; NUNES et al., 2012; RICALDE, 2010).

O manejo das populações de *A. fraterculus* e *C. capitata* tem sido realizado com o uso de inseticidas organofosforados e piretroides em área total, de acordo com calendários de aplicações (ARIOLI; BOTTON; CARVALHO, 2004; NAVA; BOTTON, 2010). A utilização de iscas-tóxicas tem sido amplamente difundida entre os produtores, especialmente entre aqueles dedicados à cultura do pessegueiro

devido a remoção de diversas inseticidas da grade de agrotóxicos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Agronegócios (MAPA) para a cultura (NAVA; BOTTON, 2010). No entanto, o uso frequente de agrotóxicos é responsável por reduzir as populações de insetos benéficos, como polinizadores e entomófagos, além de favorecer o surgimento de pragas secundárias (GALLO et al., 2002; NORRIS; CASWELL-CHEN; KOGAN, 2002). Além disso, problemas relacionados a contaminação dos alimentos, colocam em risco a saúde dos consumidores e dificultam as exportações (PARANHOS; WALDER; ALVARENGA, 2007).

Nos últimos 25 anos o controle biológico de moscas-das-frutas apresentou notável ressurgimento a nível mundial (OVRUSKI et al., 2003). Diversos programas de controle e erradicação de tefritídeos praga inseriram no *roll* de ferramentas o controle biológico clássico ou aplicado com parasitoides (MONTROYA et al., 2000; SIVINSKI et al., 1996; CARVALHO; NASCIMENTO, 2002). Diversos fatores contribuíram para o aumento da utilização do controle biológico, entre eles o interesse na conservação da biodiversidade nos agroecossistemas e o impacto negativo dos inseticidas. No entanto, o desenvolvimento de programas de controle biológico de moscas-das-frutas somente foi possível devido ao desenvolvimento de métodos de criação massal de parasitoides (OVRUSKI et al., 2000).

Os programas de manejo integrado de pragas têm preconizado a utilização de diferentes métodos de controle, a fim de reduzir as populações de insetos-praga a níveis que não causem danos às culturas. Dessa forma, a liberação ou manutenção de parasitoides, associado a utilização de inseticidas na forma de iscas tóxicas e o uso de insetos estéreis, tem sido utilizado para o controle de diferentes espécies de tefritídeos (REYES; SANTIAGO; HERNANDEZ, 2000; STARK; VARGAS; MILLER, 2004; RUIZ et al., 2008; NAVA; BOTTON, 2010).

No Brasil existem diversas espécies de parasitoides que apresentam relevante importância na regulação populacional de moscas-das-frutas, e que estão presentes em diversos agroecossistemas. Estudos faunísticos demonstram que de maneira geral no Brasil, *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) é a espécie mais frequente parasitando larvas de *Anastrepha* spp. e *C. capitata* (CANAL; ZUCCHI, 2000, NUNES et al., 2012). De acordo com Nunes et al. (2012) o percentual de parasitismo desta espécie é variável de acordo com a espécie frutífera hospedeira, sendo que, em goiabeira este percentual é de cerca de 78%. Entretanto, a utilização de *D. areolatus* como agente de controle biológico em

programas de liberações inundativas ainda depende do desenvolvimento de estudos que possam dar suporte ao desenvolvimento de uma técnica de criação.

Outro ponto crítico na estruturação de programas de controle biológico se refere a seleção de uma ou mais espécies para realização de liberações inundativas (MURDOCH; BRIGGS, 1996; PEDERSEN; MILLS, 2004), uma vez que há possibilidade destas atuarem de forma sinérgica ou competitiva, implicando diretamente sobre a eficiência do programa. Assim, se duas ou mais espécies de parasitoides, que atuam sobre diferentes fases do ciclo biológico da espécie-alvo, são liberadas simultaneamente é possível que a regulação desta população seja mais eficiente (KNIPLING, 1992). As liberações de *Di. longicaudata* na região sul do estado da Flórida-USA, foram responsáveis pelo deslocamento das populações de *D. areolatus* (EITAM et al., 2004). A introdução de *Fopius arisanus* (Sonan, 1932) (Hymenoptera: Braconidae), no estado do Havaí - USA causou impacto ainda mais drástico nas populações de parasitoides previamente liberadas e estabelecidas. De acordo com Messing e Wang (2009), após a introdução desta espécie, o parasitoide *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) passou a explorar larvas da espécie não alvo *Eutreta xanthochaeta* Aldrich, 1923 (Diptera: Tephritidae).

Embora existam possibilidades de estabelecimento de programas de controle biológico que permitam a minimização dos problemas e dos custos decorrentes do controle químico, atualmente, no Brasil, o controle biológico de pragas de frutíferas de clima temperado apresenta-se como uma opção viável para um número reduzido de insetos. Assim, torna-se evidente a necessidade do desenvolvimento de novos estudos e a implantação de programas de controle biológico de pragas, como é o caso das moscas-das-frutas (NAVA et al., 2006; NAVA, 2007). Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo gerar subsídios para o estabelecimento de um programa de controle biológico de moscas-das-frutas utilizando o parasitoide nativo *Do. areolatus*. Além disso, foram realizados estudos de competição entre as espécies *Do. areolatus* e *Di. longicaudata* a fim de determinar a possibilidade do uso conjunto das mesmas em programas de controle biológico. Ademais, devido a recente importação de *F. arisanus* para o Brasil e a possibilidade de uso deste inimigo natural, foram realizados estudos biológico da espécie com o objetivo de aumentar a eficiência das criações massais e o potencial deste inseto em condições de campo. Para tal, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos: a)

conhecer uma série de informações biológicas que possam dar suporte ao desenvolvimento de uma técnica de criação para *Do. areolatus*; b) estudar a biologia de *Do. areolatus* nos hospedeiros *A. fraterculus* e *C. capitata*; c) determinar os efeitos de diferentes temperaturas sobre as fases imaturas e adulta de *Do. areolatus*; d) estudar o comportamento de forrageamento de *Do. areolatus* e *Di. longicaudata* em condições de competição extrínseca; e) estudar o processo de competição intrínseca entre *Do. areolatus* e *Di. longicaudata* em larvas de *A. fraterculus*; f) investigar os efeitos da aprendizagem sobre a eficiência de parasitismo de *F. arisanus* em *Bactrocera dorsalis* (Hendel, 1912) (Diptera: Tephritidae).

Artigo 1 - Revista: Neotropical Entomology

2 - Artigo 1

Bases biológicas para o desenvolvimento de um protocolo de criação de *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti) (Hymenoptera: Braconidae) em *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae)

RS Gonçalves¹, R Manica-Berto¹, AD Grützmacher¹, DE Nava²

¹Departamento de Fitossanidade, FAEM/UFPeL, 96010-900, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Embrapa Clima Temperado, 96010-971, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

Rafael da Silva Gonçalves

Campus Universitário Capão do Leão, Capão do Leão, Caixa Postal 354, CEP: 96010-900, Capão do Leão, RS, Brazil

Phone: +55 53 8143 4552

E-mail: rafaeldasilvagoncalves@gmail.com

Basis for rearing *D. areolatus*

Resumo

Doryctobracon areolatus (Szépligeti) é uma das principais espécies nativas de inimigos naturais de moscas-das-frutas da região Neotropical. Este braconídeo tem sido apontado como potencial agente de controle biológico à ser utilizado em programas de manejo de tefritídeos-praga. No entanto, atualmente o principal obstáculo para o uso desta e de outras espécies de parasitoides nativos se refere a falta de informações que possibilitem o desenvolvimento de técnicas de multiplicação massal. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo fornecer uma detalhada base de informações biológicas que podem ser utilizadas para a estruturação de um sistema de multiplicação de *D. areolatus* utilizando como hospedeiro larvas de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann). Foram determinados o ínstar ótimo de *A. fraterculus* para parasitismo, a capacidade de parasitismo e o tempo ideal de exposição das larvas às fêmeas, bem como, o efeito de diferentes dietas à base de mel sobre a longevidade e a vida reprodutiva de *D. areolatus*. Nossos resultados demonstram que o fornecimento de 10 larvas de segundo ínstar de *A. fraterculus* pelo período de 12 horas permitiu a maximização da produção de *D. areolatus*. Além disso, o desempenho reprodutivo dos parasitoides foi incrementado com o fornecimento de dieta com concentração de mel de 60 %.

Palavras-chave: Controle biológico, moscas-das-frutas, parasitoide larva-pupa

**Basis for the development of a rearing technique of *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti)
(Hymenoptera: Braconidae) in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae)**

Abstract

Doryctobracon areolatus (Szépligeti) is one of the main native species of natural enemies of flies in the Neotropics region. This braconid has been mentioned as a potential biological control agent to be inserted in management tephritids pest programs. However, currently the main obstacle to the use of this and other species of native parasitoids refers to lack of information to enable the development of mass rearing techniques. In this sense, this study will provide a detailed basis of biological information that can be used to structure a *D. areolatus* rearing system using as host larvae of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann). The studies determined the optimal instar of *A. fraterculus* for parasitism, parasitism capacity and the ideal exposure time of the larvae to the parasitoid and the effect of diets honey based on longevity and reproductive life of *D. areolatus*. Our results demonstrate that supplying 10 second instar larvae of *A. fraterculus* for 12 hours allowed maximizing production of *D. areolatus*. Furthermore, the performance of the insects, was increased with the supply of 60% honey concentration diet.

Key words: Biological control, fruit-fly control, larval-pupal parasitoid

Introdução

Anastrepha fraterculus é considerada a espécie de moscas-das-frutas de maior relevância na América do Sul (Nava & Botton 2010, Bisognin *et al* 2015). No Brasil, encontra-se amplamente distribuída e foi relatada em mais de 90 espécies de plantas (Zucchi 2007). As perdas podem chegar a 100 % quando medidas de controle não são adotadas (Rupp *et al* 2006). Atualmente, o manejo populacional desta praga tem sido realizado por meio da utilização de agrotóxicos, os quais são aplicados como isca-tóxica, bem como, em cobertura total (Nava & Botton 2010). Contudo, em decorrência dos problemas causados pelo uso abusivo de inseticidas, a utilização de parasitoides em programas de manejo integrado de moscas-das-frutas tem aumentado (Ovruski *et al* 2000).

Em diversos países da América o controle biológico de moscas-das-frutas foi conduzido inicialmente com parasitoides exóticos. No entanto, após numerosos esforços, poucas espécies foram capazes de se estabelecer (Ovruski *et al* 2000). No Brasil, em 1995, *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) foi liberada em diferentes regiões, porém o parasitismo médio em larvas de *Anastrepha* spp. e *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae) em diferentes frutos hospedeiros não excedeu 5%. Além disto, problemas de adaptação as condições ambientais foram relatados (Carvalho *et al* 2000). Outro potencial problema decorrente da introdução de espécies exóticas de inimigos naturais é o impacto negativo que esta pode vir a causar na comunidade de espécies nativas. Um exemplo desta situação foi observado no Hawaii após a introdução do parasitoide de moscas-das-frutas *Fopius arisanus* (Sonan, 1932) (Hymenoptera: Braconidae) (Duan & Messing 2000).

Existem no Brasil cerca de 25 espécies de parasitoides nativos de moscas-das-frutas pertencentes principalmente as famílias Braconidae e Figitidae (Nava D.E. informação pessoal). No entanto, até o momento algumas destas espécies foram estudadas apenas sob o ponto de vista taxonômico e ecológico. Pesquisas que abordem os aspectos biológicos e de

desenvolvimento de técnicas de criação massal são incipientes, mesmo havendo indícios que demonstram o potencial de uso destes parasitoides em programas de controle biológico aplicado (Nava *et al* 2011). Um exemplo desta situação é a espécie *D. areolatus*, um endoparasitoide coinobionte larva-pupa que encontra-se amplamente distribuído na região Neotropical, desde o México até a Argentina (Wharton & Marsh 1978).

Pesquisas realizadas no Brasil apontam que *D. areolatus* é a espécie mais frequente parasitando larvas de diferentes espécies do gênero *Anastrepha* e de *C. capitata* (Canal & Zucchi 2000, Nunes *et al* 2012). Ademais, estudos de campo demonstraram que *D. areolatus* explora seus hospedeiros em diferentes espécies frutíferas com níveis de parasitismo variando de 32,3 a 63,4% (Souza Filho 1999). Estes resultados são próximos aos verificados na região centro-sul da Flórida onde as taxas de parasitismo foram em média de 36% (Eitam *et al* 2003). Alguns estudos desenvolvidos em condições de laboratório apontam que a taxa média de parasitismo, em frutos de mamão infestados com larvas *A. fraterculus*, é de aproximadamente 53% (Nunes *et al* 2011).

Embora os resultados obtidos até o momento demonstrem o potencial de *D. areolatus* como agente de controle biológico, poucas são as informações biológicas disponíveis para o desenvolvimento de uma técnica de criação. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo construir uma base de informações biológicas de *D. areolatus* para o desenvolvimento de uma técnica de criação utilizando como hospedeiro larvas de *A. fraterculus* produzidas em dieta artificial.

Material e Métodos

As colônias de *A. fraterculus* e *D. areolatus* foram mantidas em salas climatizadas com temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa do ar de 70 ± 10 % e fotofase de 12 horas. A colônia de *A. fraterculus* foi conduzida conforme descrito por Gonçalves *et al* (2013). Para

estabelecimento da colônia de *D. areolatus* foram coletados frutos de araçá [*Psidium cattleianum* Sabine, 1821, (Myrtaceae)] infestados por *A. fraterculus* nos pomares de frutíferas nativas do Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (CPACT) – Embrapa Clima Temperado. Os frutos foram acondicionados em bandejas plásticas (19 cm × 13,5 cm × 3,5 cm) (l × w × h), contendo uma camada de 5 cm de vermiculita, envoltas por tecido *voile*.

Com o início da formação dos pupários a vermiculita foi peneirada diariamente, para a coleta dos mesmos. Logo após, os mesmos foram transferidos para caixas de acrílico (Gerbox®, J. Prolab Ltda, São José dos Pinhais, Paraná, Brazil) contendo vermiculita fina onde foram mantidos até a emergência. Aproximadamente cinco dias antes da emergência dos parasitoides, as caixas contendo os pupários foram transferidas para gaiolas plásticas (40 cm × 30 cm × 30 cm) (l × w × h). Com o início da emergência os parasitoides foram transferidos para gaiolas de criação (40 cm × 27 cm × 23 cm) (l × w × h).

Para manutenção dos adultos utilizou-se água, a qual foi fornecida em potes de acrílico (50 mL) por capilaridade por meio de uma tira de pano esponja vegetal. Como alimento foi utilizada uma solução aquosa de mel na concentração de 30 % fornecida em placas de acrílico (3 cm de diâmetro × 1,5 cm de altura) embebida em algodão. Para multiplicar os parasitoides, larvas de segundo ínstar de *A. fraterculus*, obtidas da criação realizada em dieta artificial, foram utilizadas como hospedeiro. Dessa forma, as larvas foram mantidas em placa de acrílico (4 cm de diâmetro × 0,2 cm de altura), a qual foi envolvida com tecido *voile* e posicionada no piso da gaiola por um período de 24 horas.

Após o término do período de exposição as larvas foram transferidas para potes plásticos contendo dieta artificial, conforme proposto por Nunes *et al* (2013), onde permaneceram até a formação dos pupários. Com o início da formação dos primeiros pupários os mesmos,

juntamente com as demais larvas que ainda encontravam-se em terceiro ínstar, foram transferidos para caixas de acrílico contendo vermiculita.

Experimento 1 - Determinação do ínstar para parasitismo

Foram realizados testes de confinamento e de livre escolha, onde foram utilizadas fêmeas de *D. areolatus* com 5 dias de idade, acasaladas e sem experiência de parasitismo. As fêmeas foram confinadas em gaiolas (copos plásticos de 1000 mL) e alimentadas com solução aquosa de mel na concentração de 50 % embebida em papel absorvente, a qual foi disponibilizada em placas de acrílico (2,2 cm de diâmetro × 0,7 cm de altura).

Para o teste de livre escolha, 40 larvas de *A. fraterculus* de cada um dos três ínstars foram oferecidas para as fêmeas. O ínstar foi determinado de acordo com Salles (2000). A fim de padronizar as larvas de cada ínstar utilizou-se como parâmetro o comprimento das mesmas, as quais foram padronizadas de acordo com as seguintes medidas: $1,488 \pm 0,028$ mm (1st ínstar - 2 dias de idade); $3,982 \pm 0,061$ mm (2nd ínstar - 6 dias de idade) e $8,110 \pm 0,098$ mm (3rd ínstar - 12 dias de idade).

As larvas foram depositadas separadamente de acordo com o ínstar em placas de acrílico (1,7 cm de diâmetro × 0,1 cm de altura) contendo dieta a base de polpa de goiaba e ágar, e envoltas com tecido *voile*. As placas contendo as larvas foram depositadas no piso das gaiolas de forma equidistante entre si e para serem expostas as fêmeas. Após 24 horas, as larvas de primeiro e segundo ínstar foram transferidas para frascos contendo dieta artificial conforme descrito no primeiro item desta seção. Quando os primeiros pupários foram formados as larvas e estes foram transferidos para frascos de acrílico contendo vermiculita extrafina. As larvas de terceiro ínstar foram transferidas diretamente para os frascos de acrílico (2,5 cm de diâmetro × 4,5 cm de altura) contendo vermiculita extrafina. Após a transferência para vermiculita, os insetos oriundos de todos os ínstars permaneceram nesta até a emergência de

parasitoides e/ou moscas. Os pupários em que não ocorreu emergência foram dissecados para verificar a existência de parasitoides.

No teste de confinamento, apenas larvas do mesmo ínstar foram expostas às fêmeas. O número de larvas de cada ínstar, o tempo de exposição das larvas e os procedimentos para o desenvolvimento larval foram conduzidos conforme descrito para o teste de livre escolha.

Tanto no teste de livre escolha como no de confinamento foram avaliados o número total de descendente (emergidos + não emergidos), número total de descendentes e razão sexual. Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições, sendo cada repetição composta por uma fêmea (unidade experimental).

Experimento 2 - Determinação do tempo ideal de exposição das larvas aos parasitoides

Fêmeas com cinco dias de idade, acasaladas e sem experiência de parasitismo foram individualizadas em gaiolas (copos plásticos de 300 mL) e alimentadas conforme descrito no Experimento 1. Foram oferecidas 30 larvas de segundo ínstar de *A. fraterculus* para cada fêmea. As larvas foram expostas aos parasitoides por 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas, utilizando-se a mesma metodologia descrita no Experimento 1.

Foram avaliados o número total de descendentes (emergidos + não emergidos), número total de descendentes emergidos e número total de fêmeas. O bioensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições, sendo cada repetição constituída por uma fêmea (unidade experimental).

Experimento 3 - Determinação da capacidade de parasitismo de *D. areolatus*

Fêmeas com cinco dias de idade, acasaladas e sem experiência de parasitismo foram individualizadas em gaiolas (copos plásticos de 300 mL), sendo alimentadas com mel a 30%, conforme descrito no experimento 1. Os tratamentos foram constituídos de diferentes

números de larvas, sendo, 5, 10, 15, 20, 25, 30 larvas de segundo ínstar de *A. fraterculus* por fêmea de *D. areolatus*. A forma e o tempo de exposição, bem como o processo de criação das larvas após a exposição para as fêmeas foram realizados conforme descrito no Experimento 1.

Foram avaliados o número total de descendentes (emergidos + não emergidos), número total de descendentes emergidos e razão sexual. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 15 repetições, sendo cada repetição constituída por uma fêmea de *D. areolatus* (unidade experimental).

Experimento 4 - Efeito de diferentes concentrações de mel na biologia de *D. areolatus*

Casais recém emergidos foram individualizados em gaiolas (copos plásticos de 300 mL). As diferentes dietas foram oferecidas em recipientes de vidro de 5 mL por meio de capilaridade utilizando roletes de algodão. Os tratamentos constituíram de dietas compostas de: D1 - sem água e alimento, D2 - água, D3 - solução aquosa de mel na concentração de 20 %, D4 - solução aquosa de mel na concentração de 50 %, D5 - solução aquosa de mel na concentração de 80 % e D6 - mel puro (100%).

Desde a formação dos casais até a morte das fêmeas, diariamente foram oferecidas 30 larvas de segundo ínstar de *A. fraterculus* por fêmea. Os procedimentos de exposição das larvas, tempo de exposição e processo de manutenção após a exposição às fêmeas foram realizados conforme descrito no Experimento 1.

Foram avaliados o número total de descendentes (emergidos + não emergidos), número de descendentes emergidos, razão sexual e longevidade de machos e fêmeas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 20 repetições, sendo cada repetição constituída por um casal de *D. areolatus*.

Análise estatística

Os dados foram verificados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley e a independência dos resíduos por análise gráfica. Entretanto, no experimento 1 verificou-se que os pressupostos não foram atendidos e dessa forma, optou-se pela utilização de testes não-paramétricos. Sendo assim, os dados referentes ao número total de descendentes e total de descendentes emergidos foram submetidos a análise de variância por meio do teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,05$), seguida da comparação múltipla das médias através do teste de Nemenyi ($p = 0,05$) (Elliott & Hynan 2011). Em relação a razão sexual, as proporções médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Z ($p = 0,05$).

Para os experimentos 2 e 3, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F. Constatando-se diferença significativa, os efeitos da densidade hospedeira e do tempo de exposição foram avaliados por modelos de regressão polinomial ($p = 0,05$). Quando não ocorreu ajuste de equação, a densidade de hospedeiros e os tempos de exposição foram comparados com intervalos de confiança a 95% (SAS Institute 2002).

No experimento 4, quando constatou-se significância estatística, os efeitos das concentrações de mel em relação às testemunhas foram avaliados pelo teste de Dunnett ($p = 0,05$). A comparação entre as concentrações de mel foram realizadas conforme descrito para os experimentos 2 e 3 utilizando-se o software SAS (SAS Institute 2002). Os dados de longevidade foram utilizados para a construção das curvas de sobrevivência por meio do estimador de Kaplan-Meier, as quais foram comparadas entre si utilizando-se o teste de log-rank (R Development Core Team 2011).

Resultados e Discussão

Doryctobracon areolatus tem sido apontado como uma das espécies com potencial para ser utilizada em programas de controle biológico de moscas das frutas do gênero *Anastrepha* spp. (Eitam *et al* 2003, Nunes *et al* 2011). Todavia, as poucas informações existentes até o momento sobre aspectos biológicos e em especial sob condições de criação do hospedeiro em dieta artificial dificultaram o processo de desenvolvimento de uma técnica de criação massiva para este parasitoide. Neste sentido, nossos resultados demonstram que a utilização de larvas de segundo ínstar de *A. fraterculus* expostas ao parasitismo por um período de 12 horas a uma taxa de 10 larvas por fêmea permitiram maximizar a produção deste parasitoide. Além disso, a alimentação dos parasitoides com solução aquosa de mel na concentração de 60 %, possibilitou o melhor desempenho dos insetos.

Larvas de 2° ínstar de *A. fraterculus* foram mais adequadas para o parasitismo de *D. areolatus* em comparação as larvas de primeiro e terceiro ínstar, tanto no teste de confinamento quanto no de livre escolha. Não foram gerados descendentes com a utilização de larvas de terceiro ínstar em ambos os testes realizados. A utilização de larvas de segundo ínstar proporcionou aumento significativo da produção de descendentes em aproximadamente 7 vezes no teste de confinamento ($\chi^2 = 22,70; df = 2; p < 0,0001$) e cerca de 16,5 vezes no teste de livre escolha ($\chi^2 = 12,46; df = 2; p = 0,002$) em relação as larvas de 1° ínstar (Tabela 1).

O ínstar larval de *A. fraterculus* também foi responsável por afetar significativamente o número total de insetos emergidos em ambos os testes realizados (confinamento: $\chi^2 = 22,70; df = 2; p < 0,0002$; livre escolha: $\chi^2 = 15,13; df = 2; p = 0,0005$) (Tabela 1). O total de descendentes emergidos foi maior em larvas de segundo ínstar diferindo significativamente dos resultados obtidos com larvas de primeiro.

Estes resultados demonstram que *D. areolatus* possui comportamento de parasitismo diferente de outros braconídeos que exploram o mesmo recurso hospedeiro, como por

exemplo, *Doryctobracon brasiliensis* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) e *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead, 1905) (Hymenoptera: Braconidae) que parasitam, principalmente, larvas de terceiro ínstar (Van Nieuwenhove & Ovruski 2011, Poncio 2015). Possivelmente esta diferença não está relacionada com a maior quantidade de recursos nutricionais nas larvas de terceiro ínstar, conforme sugerido por Poncio (2015) e Gonçalves (2012), mas sim com a especificidade de cada espécie de parasitoide em relação a maturação do hospedeiro (López *et al* 2009).

Do ponto de vista de criação massal, a utilização de larvas de segundo ínstar pode se tornar um fator complicante devido a elevação dos custos de produção, os quais estão relacionados à perdas durante o processo de criação, bem como, com a necessidade de empregar mais mão-de-obra. As perdas podem ocorrer devido a maior manipulação das larvas que necessitam retornar à dieta após o período de parasitismo para completar o desenvolvimento. Ademais, com o retorno das larvas para a dieta, aumenta o risco de contaminação da mesma. O aumento dos custos com mão-de-obra são inevitáveis, pois uma etapa é adicionada ao processo de produção, haja vista que as larvas devem ser transferidas para a dieta para completar o desenvolvimento.

A razão sexual da população descendente também foi significativamente afetada pelo ínstar larval de *A. fraterculus* tanto no teste de confinamento ($\chi^2 = 9,9; df = 2; p = 0,007$) quanto em livre escolha ($\chi^2 = 16,88; df = 2; p < 0,001$), sendo a maior proporção de fêmeas gerada com a utilização de larvas de segundo ínstar (Tabela 1). No teste de confinamento, que simula a condição de um sistema de criação massal, pois não há opções para as fêmeas, a proporção de fêmeas da população descendente foi de 71%. Este resultado é relevante, pois a razão sexual é um dos mais importantes parâmetros a serem avaliados em uma criação de parasitoides, uma vez que são as fêmeas as responsáveis por realizar a regulação populacional da espécie-praga.

Outro fator a ser considerado para a otimização de um sistema de criação é o tempo de exposição das larvas aos parasitoides. Nossos resultados revelaram que a produção média de descendentes por fêmea ($F = 10,97; df = 5; p = 0,029$) e a produção média de descendentes emergidos ($F = 12,35; df = 5; p = 0,024$) apresentaram relação linear positiva com o tempo de exposição (Fig 1A e B). A comparação entre os resultados da exposição das larvas por 10 e 12 horas com aqueles obtidos com duas horas de exposição, demonstram um acréscimo no número médio de descendentes emergidos por fêmea de 313,04 e 391,30 %, respectivamente. Este comportamento é similar ao observado para o parasitoide de ovos *Fopius arisanus* (Sonan, 1932) (Hymenoptera: Braconidae) (Bautista *et al* 1998). Estes autores verificaram que o aumento do tempo de exposição dos hospedeiros proporcionou elevação do percentual de parasitismo.

A exposição dos hospedeiros por tempo prolongado pode favorecer a ocorrência de superparasitismo em criações massivas, acarretando em perdas especialmente pela redução do percentual de parasitoides emergidos, bem como, pela morte dos hospedeiros. Para os parasitoides *D. brasiliensis* e *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes, 1924) (Hymenoptera: Figitidae) este fenômeno já foi descrito por Gonçalves (2012) e Poncio (2015), respectivamente, sendo que no presente estudo, este fenômeno não ocorreu para *D. areolatus* (Fig 1A e B).

O número de fêmeas produzidas também foi afetado pelo tempo de exposição das larvas. O modelo de regressão linear positivo proposto para descrever esta relação demonstrou ser adequado ($R^2 = 0,77$) ($F = 13,67; df = 5; p = 0,02$) e da mesma forma que para os demais parâmetros, o número de fêmeas produzidas sofreu incremento com o aumento do tempo de exposição das larvas. O acréscimo no número de fêmeas produzidas foi de aproximadamente 714 % quando o tempo de exposição aumentou de 2 para 12 horas.

A determinação da densidade de hospedeiros por fêmea é crucial para que se possa desenvolver um sistema de criação economicamente viável, pois a oferta de hospedeiros

acima da capacidade de parasitismo das fêmeas tem como consequência o desperdício de material biológico. Por outro lado, a oferta de hospedeiros abaixo do nível ótimo pode favorecer a ocorrência de superparasitismo, que também é prejudicial para a eficiência do sistema de criação.

Nossos resultados demonstram que a relação entre densidade hospedeira e produção de descendentes emergidos apresenta comportamento quadrático ($F = 61,43$; $df = 5$; $p = 0,003$) (Fig 2A). Por meio da derivação da equação gerada, verificamos que o ponto de máxima ocorreu com a oferta de 25 larvas por fêmea. No entanto, ao analisarmos a proporção entre densidade de hospedeiros e o número de descendentes emergidos, verificamos que ao ofertar apenas 10 larvas por fêmea a razão é de 50 % ao passo que a oferta de 25 larvas gera uma razão de apenas 36,8 % (Fig 2A). Nesse sentido, é razoável admitirmos que a densidade ideal de hospedeiros para uma fêmea de *D. areolatus* é de 10 larvas. Este valor é próximo ao proposto para *D. longicaudata* em que a oferta de 8 larvas por fêmea proporcionou a produção de cerca de 5 descendentes emergidos (Montoya *et al* 2000).

A relação entre número de fêmeas emergidas e densidade de hospedeiros também apresentou comportamento quadrático ($F = 27,09$; $df = 5$; $p = 0,01$) (Fig 2B). A densidade de hospedeiros definida com base no número de descendentes emergidos foi corroborada pelo resultado referente ao número de fêmeas emergidas, ou seja, a proporção entre densidade de hospedeiro e número de fêmeas emergidas, demonstra que a melhor relação, que foi de 28,40 %, se deu com a oferta de apenas 10 larvas por fêmea.

O fornecimento de alimento para *D. areolatus* teve impacto significativo sobre os parâmetros biológicos avaliados. Fêmeas alimentadas com mel produziram maior número de descendentes ($F = 15,45$; $df = 5$; $p < 0,0001$), bem como, maior número de descendentes emergidos ($F = 11,59$; $df = 5$; $p < 0,0001$) em comparação com as fêmeas mantidas apenas com água e aquelas não alimentadas (Tabela 2). Estes resultados são justificados uma vez que

D. areolatus é uma espécie sinovigênica, e, portanto, necessita ingerir carboidratos para a produção e maturação dos ovos. Além disso, a ingestão de carboidratos é fundamental não só sobre o aspecto reprodutivo, mas para a manutenção das funções vitais (Flanders 1950, Vattala *et al* 2005, Jervis *et al* 2008, Vásquez 2011).

Ao analisar conjuntamente apenas os dados referentes aos insetos mantidos com mel, verificamos que a relação dos parâmetros número total de descendentes ($F = 176,91$; $df = 3$; $p = 0,05$), descendentes emergidos ($F = 229,15$; $df = 3$; $p = 0,04$) e razão sexual ($F = 324,24$; $df = 3$; $p = 0,03$) com a concentração de mel na dieta pode ser descrita por uma regressão quadrática positiva (Fig 3). A partir da derivação das equações, determinamos que a concentração de 60 % de mel (m/v) possibilitou atingir os pontos de máxima para todos os parâmetros analisados.

Estudos realizados com *D. longicaudata* demonstraram que o fornecimento de mel puro proporcionou boas condições para o desenvolvimento e a reprodução deste parasitoide (Sivinski *et al* 2006). Entretanto, os resultados deste estudo demonstram que o fornecimento de mel puro para *D. areolatus* resulta em piora dos parâmetros biológicos (Tabela 2), assim como foi observado para os parasitoides *A. pelleranoi* e *D. brasiliensis* (Gonçalves 2012, Poncio 2015). Estes resultados podem ser explicados pela dificuldade dos insetos em ingerir um alimento com alta viscosidade como o mel, especialmente quando o mesmo é oferecido aos insetos em forma de mistura com papel absorvente.

De maneira geral a produção de descendentes concentrou-se nos primeiros dias de vida das fêmeas, porém para aquelas mantidas com mel a produção foi maior até o 15º dia de vida (Fig 4). Além disso, durante este período a razão sexual da população descendente foi de 0,4 em média. Em contra partida, considerando todo o período de vida das fêmeas mantidas sem alimento e água, cerca de 11 dias, a razão sexual média da população descendente foi de 0,67.

Estes resultados indicam que a renovação dos insetos em um sistema de criação massal poderá ser realizada até 15 dias após a emergência dos mesmos.

O efeito benéfico do fornecimento de mel sobre a longevidade de parasitoides braconídeos de moscas-das-frutas, como por exemplo, *D. longicaudata*, *Opius hirtus* Fischer, 1963, *Doryctobracon crawfordi* (Viereck, 1911) e *Utetes anastrephae* (Viereck, 1913) (Hymenoptera (Braconidae) já foi demonstrado por Stuhl *et al* (2011). Em nosso estudo as diferentes dietas impactaram de forma significativa a longevidade dos machos ($\chi^2 = 46,20$; $df = 5$; $p < 0,0001$) e das fêmeas ($\chi^2 = 70,20$; $df = 5$; $p < 0,0001$) de *D. areolatus* (Fig 5).

O tempo médio de sobrevivência dos machos apresentou relação direta com o aumento da concentração de mel na dieta. Contudo, não foi observada diferença significativa na sobrevivência dos machos alimentados com mel nas concentrações de 50, 80 e 100 % de mel (Fig 5A). Em relação as fêmeas, o TMS aumentou até a concentração de 80 % e então reduziu em cerca de 4 dias quando os insetos foram alimentados com mel puro (100 %) (Fig 5B). Da mesma forma que para os machos, não foi verificada diferença significativa na sobrevivência de fêmeas mantidas com as dietas contendo 50, 80 e 100 % de mel. De acordo com Nunes *et al* (2011) machos e fêmeas de *D. areolatus* alimentados com solução aquosa de mel na concentração de 30 % sobreviveram cerca de 16 e 10 dias, respectivamente. No entanto, em nosso estudo todas as fêmeas mantidas com as diferentes dietas à base de mel sobreviveram por mais de 10 dias (Fig 5B).

A utilização de *D. areolatus* em programas de manejo integrado de moscas das frutas, especialmente, *A. fraterculus*, tem como primeiro e principal obstáculo o desenvolvimento de um sistema de criação que permita a produção massal deste inimigo natural. Neste sentido, os resultados obtidos em nosso estudo fornecem uma importante base biológica para o desenvolvimento de uma técnica de criação para este parasitoide.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pelo financiamento deste estudo.

Referências bibliográficas

- Bautista RC, Harris EJ, Lawrence PO (1998) Biology and rearing of the fruit fly parasitoid *Biosteres arisanus*: clues to insectary propagation. *Entomol Exp Appl* 89:79–86. doi: 10.1046/j.1570-7458.1998.00384.x
- Bisognin M, Nava DE, Diez-Rodríguez GI, Valgas RA, Garcia MS, Krolow ACR, Antunes LEC (2015) Development of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) related to the phenology of blueberry, blackberry, strawberry guava, and surinam cherry fruits. *J Econ Entomol* 1:1–9. doi: 10.1093/jee/tou002
- Canal NA, Zucchi RA (2000) Parasitóides - Braconidae. In: Malavasi A, Zucchi RA (eds) *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*. Holos, Ribeirão Preto, pp 119–126
- Carvalho ES, Nascimento SS, Matrangolo WJR (2000) Controle biológico. In: Malavasi A, Zucchi RA (eds) *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*. Holos, Ribeirão Preto, pp 113–117
- Duan JJ, Messing RH (2000) Evaluating nontarget effects of classical biological control: fruit fly parasitoids in Hawaii as a case study. In: Follett PA, Duan JJ (eds) *Nontarget effects of biological control*. Springer US, pp 95–109
- Eitam A, Holler T, Sivinski J, Aluja M (2003) Use of host fruit chemical cues for laboratory rearing of *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of

- Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae). Fla Entomol 86:211–216. doi: 10.1653/0015-4040(2003)086[0211:UOHFCC]2.0.CO;2
- Elliott AC, Hynan LS (2011) A SAS® macro implementation of a multiple comparison post hoc test for a Kruskal–Wallis analysis. Comput Methods Programs Biomed 102:75–80. doi: 10.1016/j.cmpb.2010.11.002
- Flanders SE (1950) Regulation of ovulation and egg disposal in the parasitic Hymenoptera. Can Entomol 82:134–140. doi: 10.4039/Ent82134-6
- Gonçalves RS (2012) Técnica de criação e bioecologia do parasitoide larval *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes, 1924) (Hymenoptera: Figitidae) em duas espécies de moscas-das-frutas. Mestrado. Dissertação, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil, p 118
- Gonçalves RS, Nava DE, Pereira HC, Lisboa H, Grützmacher AD, Valgas RA (2013) Biology and fertility life table of *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae) in larvae of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Ann Entomol Soc Am 106:791–798. doi: 10.1603/AN13044
- Jervis MA, Ellers J, Harvey JA (2008) Resource acquisition, allocation, and utilization in parasitoid reproductive strategies. Annu Rev Entomol 53:361–385. doi: 10.1146/annurev.ento.53.103106.093433
- López OP, Hénaut Y, Cancino J, Lambim M, Cruz-López L, Rojas JC (2009) Is host size an indicator of quality in the mass-reared parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae)? Fla Entomol 92:441–449. doi: 10.1653/024.092.0305
- Montoya P, Liedo P, Benrey B, Barrera J, Cancino J, Martin A (2000) Functional response and superparasitism by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit flies (Diptera: Tephritidae). Ann Entomol Soc Am 93:47–54. doi: 10.1603/0013-8746(2000)093[0047:FRASBD]2.0.CO;2

- Nava DE, Botton M (2010) Bioecologia e controle de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* em pessegueiro. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, p 29
- Nava DE, Jahnke SM, Botton M, Cunha US, Diez-Rodríguez GI, Antunes LEC (2011) Controle biológico de insetos e ácaros praga na fruticultura de clima temperado no Sul do Brasil. *Ciênc Ambiente* 43:197–210.
- Nunes AM, Costa KZ, Faggioni KM, Costa MLZ, Gonçalves RS, Walder JMM, Garcia MS, Nava DE (2013) Artificial diets for the rearing of adult and larvae of South-American fruit fly. *Pesqui Agropec Bras* 48:1309–1314. doi: 10.1590/S0100-204X2013001000001
- Nunes AM, Nava DE, Müller FA, Gonçalves RS, Garcia MS (2011) Biology and parasitic potential of *Doryctobracon areolatus* on *Anastrepha fraterculus* larvae. *Pesqui Agropec Bras* 46:669–671. doi: 10.1590/S0100-204X2011000600014
- Nunes A, Müller FA, Gonçalves RS, Garcia MS, Costa VA, Nava DE (2012) Moscas frugívoras e seus parasitoides nos municípios de Pelotas e Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciênc Rural* 42:6–12.
- Ovruski S, Aluja M, Sivinski J, Wharton R (2000) Hymenopteran parasitoids on fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the Southern United States: diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. *Integr Pest Manag Rev* 5:81–107. doi: 10.1023/A:1009652431251
- Poncio S (2015) Bioecologia e técnicas de criação de parasitoides (Hymenoptera) nativos de três espécies de *Anastrepha* no Brasil e no México. Doutorado. Tese, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil, p 134
- R Development Core Team (2011) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- Rupp LCD, Boff MIC, Botton M, Boff P (2006) Percepção do agricultor frente à mosca-das-frutas, na produção orgânica de pêssego. *Agropecuária Catarin.* 53–56.
- Salles LAB (2000) Bioecologia e ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus*. In: Malavasi A, Zucchi RA (eds) *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*. Holos, Ribeirão Preto, pp 81-86
- SAS Institute (2002) SAS System - SAS/STAT.
- Sivinski J, Aluja M, Holler T (2006) Food sources for adult *Diachasmimorpha longicaudata*, a parasitoid of tephritid fruit flies: effects on longevity and fecundity. *Entomol Exp Appl* 118:193–202. doi: 10.1111/j.1570-7458.2006.00379.x
- Souza Filho MF (1999) Biodiversidade de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) e seus parasitóides (Hymenoptera) em plantas hospedeiras no estado de São Paulo. Doutorado. Tese, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil, p 152
- Stuhl C, Cicero L, Sivinski J, Teal P, Lapointe S, Paranhos BJ, Aluja M (2011) Longevity of multiple species of tephritid (Diptera) fruit fly parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae) provided exotic and sympatric-fruit based diets. *J Insect Physiol* 57:1463-1470. doi: 10.1016/j.jinsphys.2011.07.015
- Van Nieuwenhove GA, Ovruski SM (2011) Influence of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) larval instars on the production of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) progeny and their sex ratio. *Fla Entomol* 94:863–868. doi: 10.1653/024.094.0421
- Vásquez C (2011) Efecto de diferentes recursos alimenticios sobre longevidad, metabolismo de carbohidratos y dinámica ovárica en dos parasitoides de moscas de la fruta (Diptera: Tephritidae). Magister. Tesis, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, p 53

- Vattala H, Wratten S, Phillips C, Wäckers F, Worner S (2005) Measuring parasitoid carbohydrate levels to improve biological control. *N Z Plant Prot* 58:135–139.
- Wharton RA, Marsh PM (1978) New World Opiinae (Hymenoptera: Braconidae) Parasitic on Tephritidae (Diptera). *J Wash Acad Sci* 68:147–167.
- Zucchi RA (2007) Diversidad, distribución y hospederos del género *Anastrepha* en Brasil. In: *Moscas de la fruta en Latinoamérica (Diptera: Tephritidae): Diversidad, biología y manejo*. (Ed) Hernández-Ortiz V, Distrito Federal, México, pp 77–100

- 1 Tabela 1 - Médias (\pm EP) do total de descendentes, descendentes emergidos e razão sexual de *Doryctobracon areolatus* criados em larvas de
 2 *Anastrepha fraterculus* de diferentes ínstares em teste de livre escolha e confinamento. Temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa do ar de $70 \pm$
 3 10% e fotofase de 12horas.

Teste	Parâmetros biológicos	Ínstar		
		1°	2°	3°
Confinamento	Total de descendentes ^{1/}	1,00 \pm 0,48b	7,13 \pm 0,82a	0,00 \pm 0,00b
	Total de descendentes emergidos ^{1/}	1,00 \pm 0,48b	7,10 \pm 0,82a	0,00 \pm 0,00b
	Razão sexual ^{2/}	0,30b	0,71a	0,00c
Livre escolha	Total de descendentes ^{1/}	0,23 \pm 0,11ab	3,80 \pm 0,96a	0,00 \pm 0,00b
	Total de descendentes emergidos ^{1/}	0,07 \pm 0,07b	3,77 \pm 0,96a	0,00 \pm 0,00b
	Razão sexual ^{2/}	0,10b	0,49a	0,00c

- 4 ^{1/} Médias seguidas por mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Nemenyi ($p \leq 0,05$). ^{2/} Valores seguidos pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de comparação de
 5 proporções ($p \leq 0,05$). EP - Erro padrão.

- 6
 7
 8

Tabela 2 - Número total (\pm EP) de descendentes, descendentes emergidos e razão sexual de *Doryctobracon areolatus* mantidos com diferentes dietas à base de mel. Temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa do ar de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h.

Tratamento	Número total de descendentes	Número total de descendentes emergidos	Razão sexual
Sem água e alimento	24,85 \pm 4,71 ^{1/}	21,30 \pm 4,08	0,43 \pm 0,07
Água	29,75 \pm 5,32	27,80 \pm 5,22	0,17 \pm 0,06
Mel 20%	52,50 \pm 14,35 ^{ns} α	63,44 \pm 15,50 ^{ns} α	0,20 \pm 0,08 ^{ns} α
Mel 50%	146,28 \pm 22,00* β	132,78 \pm 21,58* β	0,37 \pm 0,08 ^{ns} α
Mel 80%	134,61 \pm 20,47* β	118,14 \pm 19,71* β	0,32 \pm 0,07 ^{ns} α
Mel 100%	54,00 \pm 8,73 ^{ns} α	51,85 \pm 10,33 ^{ns} α	0,17 \pm 0,07 ^{ns} α

^{1/} Média de 20 determinações \pm erro padrão. *^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, em relação à testemunha 1 (sem água e alimento) pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). β , α Significativo e não significativo, respectivamente, em relação à testemunha 2 (água) pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$).

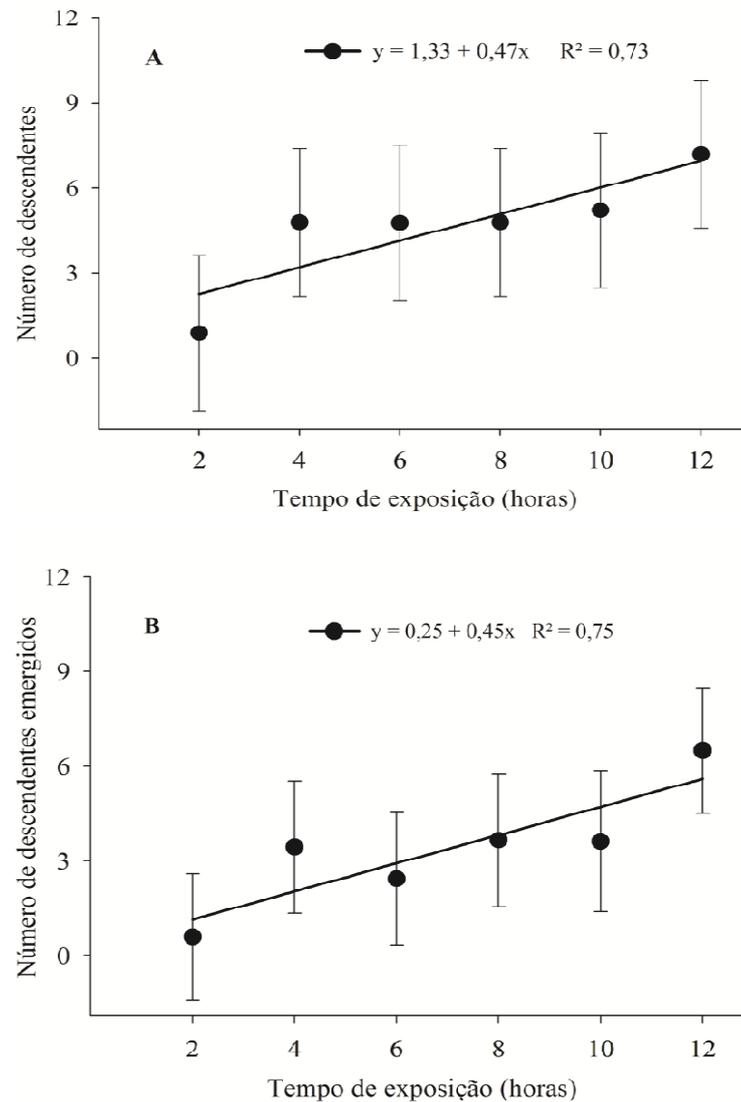


Fig 1 Número de descendentes (A) e descendentes emergidos (B) de *Doryctobracon areolatus* em relação ao tempo de exposição das larvas ao parasitismo (2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas) (Temperatura: 25 ± 2 °C, Umidade relativa: 70 ± 10 % Fotofase: 12 horas). As barras verticais representam os intervalos de confiança ($p < 0,05$).

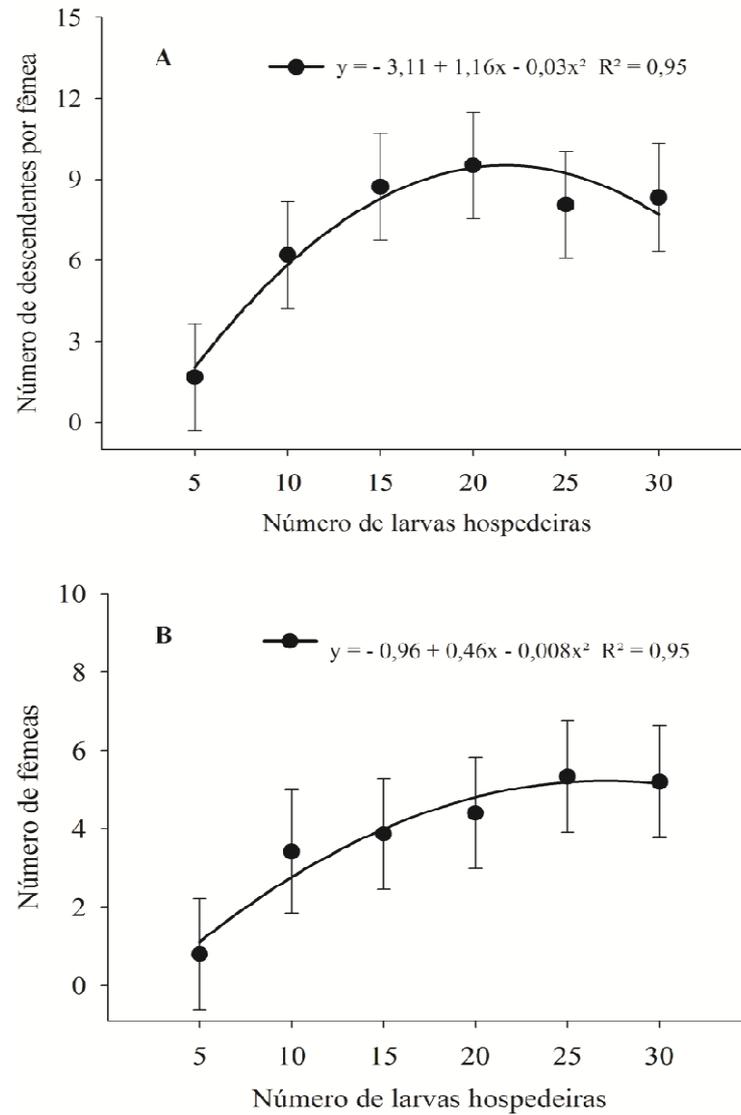


Fig 2 Número de descendentes (A) e de fêmeas (B) de *Doryctobracon areolatus* produzidos em função da densidade de larvas de *Anastrepha fraterculus* (5, 10, 15, 20, 25 e 30) (Temperatura: 25 ± 2 °C, Umidade relativa: 70 ± 10 % Fotofase: 12 horas). Barras verticais representam os intervalos de confiança ($p < 0,05$).

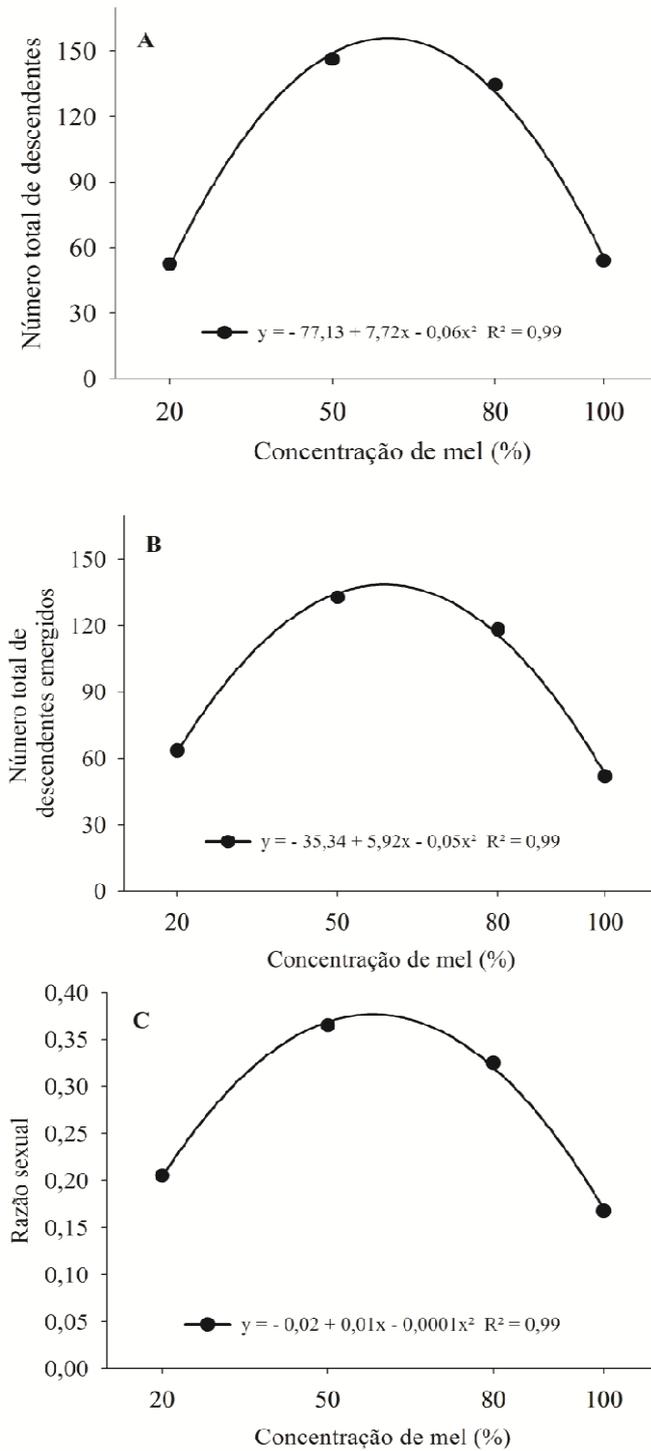


Fig 3 Número de descendentes (A) descendentes emergidos (B) e razão sexual (C) produzidos por fêmeas de *Doryctobracon areolatus* alimentadas com dietas contendo diferentes concentrações de mel (20, 50, 80 e 100 %) (Temperatura: 25 ± 2 °C, Umidade relativa: 70 ± 10 % Fotofase: 12 horas).

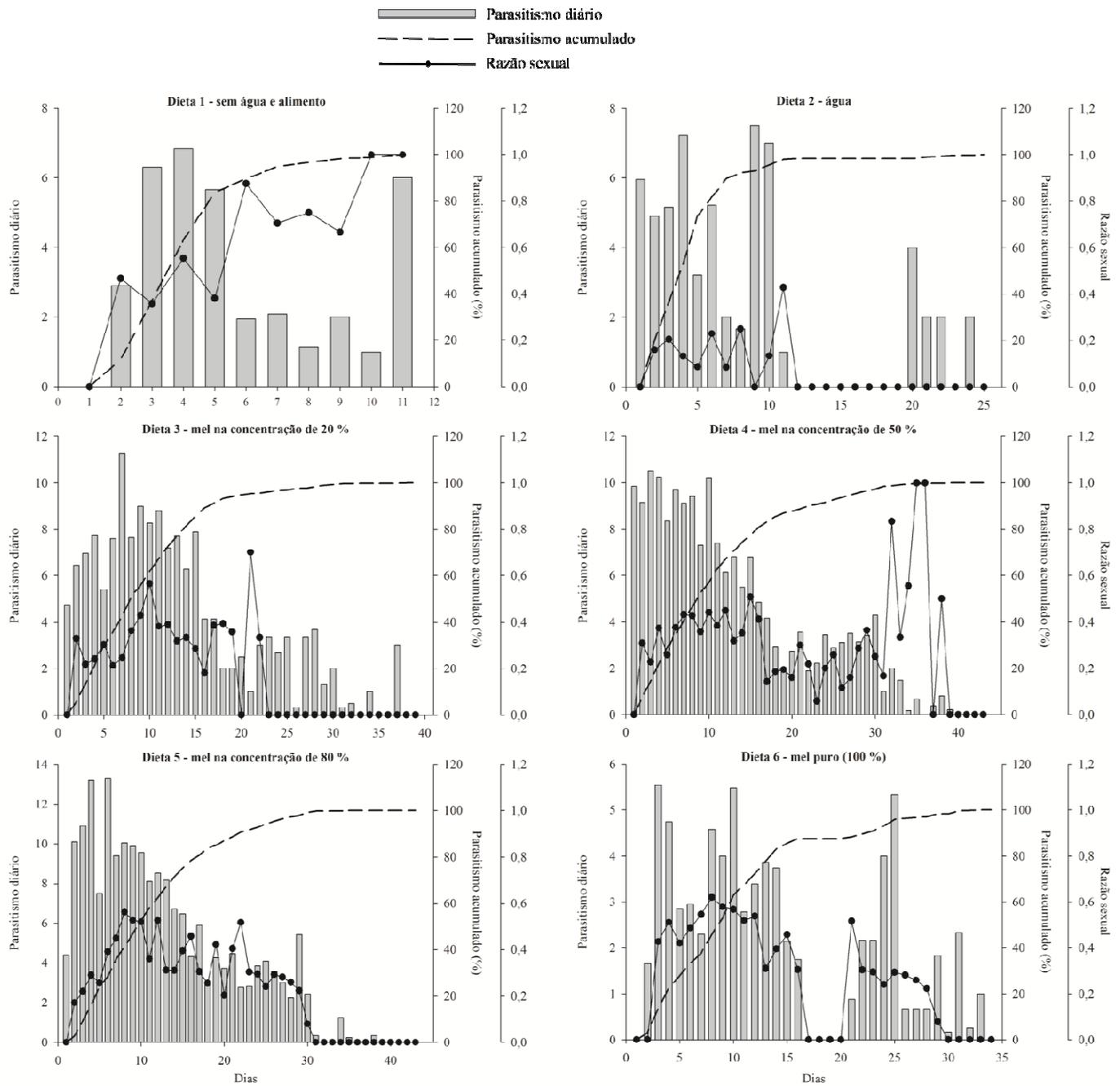


Fig 4 Parasitismo diário e acumulado de fêmeas de *Doryctobracon areolatus*, em larvas de *Anastrepha fraterculus*, alimentadas com dietas contendo diferentes concentrações de mel (Temperatura: 25 ± 2 °C, Umidade relativa: 70 ± 10 % Fotofase: 12horas).

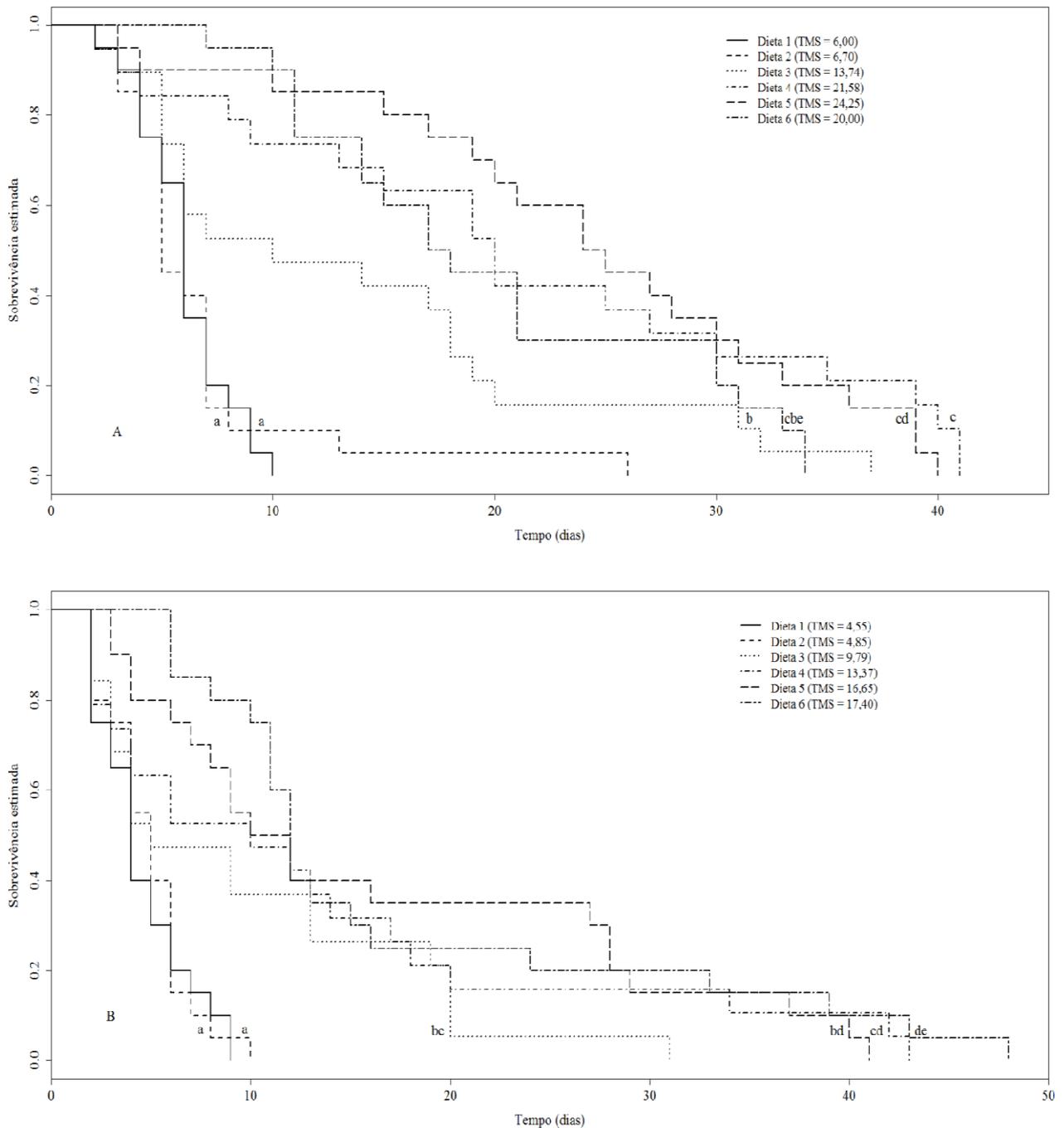


Fig 5 Curvas de sobrevivência de fêmeas (A) e machos (B) de *Doryctobracon areolatus* alimentados com dietas contendo diferentes concentrações de mel (Temperatura: 25 ± 2 °C, Umidade relativa: 70 ± 10 % Fotofase: 12 horas). Curvas identificadas com a mesma letra, para cada sexo, não diferem entre si. TSM - tempo médio de sobrevivência.

Artigo 2 - Revista: Annals of Applied Biology

3 - Artigo 2

Biologia de *Doryctobracon areolatus* em larvas de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitidis capitata*

Rafael da Silva Gonçalves¹, Roberta Manica-Berto², Anderson Dionei Grützmacher¹ Dori

Edson Nava²

¹Departamento de Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, 96010-900, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil.

²Laboratório de Entomologia, Embrapa Clima Temperado, 96001-970, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

Resumo

Este trabalho examinou os efeitos dos hospedeiros *A. fraterculus* e *C. capitata* sobre a performance de *D. areolatus*, a fim de identificar a espécie que fornece as melhores condições para a produção deste parasitoide. O experimento foi realizado em salas climatizadas como temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 70 ± 10 % e fotofase de 12 horas. Foram determinados o peso de pupários, número de descendentes, percentual de emergência, razão sexual, longevidade peso de adultos de tamanho da tibia posterior. Com os dados biológicos elaborou-se a tabela de vida de fertilidade. *D. areolatus* parasitou larvas de ambas as espécies hospedeiras, no entanto, verificamos que o desempenho dos adultos oriundos de *A. fraterculus* foi superior. A taxa líquida de reprodução (R_0) da população criada em *A. fraterculus* foi 30.5 vezes superior a de *C. capitata*. A razão sexual da população descendente foi significativamente superior quando os insetos foram multiplicados com larvas de *A. fraterculus*. Além disso, parasitoides criados em larvas de *A. fraterculus* apresentaram maior peso corporal e comprimento de tibia do que aqueles criados em *C. capitata*. O presente

estudo apresenta resultados inéditos sobre a biologia de *D. areolatus* em diferentes hospedeiros e as suas implicações em um contexto de multiplicação massal deste parasitoide para programas de controle biológico de moscas-das-frutas.

Palavras-chave: controle biológico, moscas-das-frutas, parasitoide, Tephritidae, Braconidae

Biology of *Doryctobracon areolatus* in larvae of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata*

Abstract

The present study examined the effects of the hosts *A. fraterculus* and *C. capitata* on the performance of *D. areolatus* in order to identify the specie that provides the best conditions for the production of this parasitoid. *D. areolatus* parasitized larvae of both host species, however, we find that the performance of adults from *A. fraterculus* was superior. The net reproductive rate (R_0) of the population reared in *A. fraterculus* was 30.5 times higher than that from *C. capitata*. The sex ratio of the offspring population was significantly higher when the insects were multiplied with larvae of *A. fraterculus*. In addition, *D. areolatus* reared on *A. fraterculus* larvae were heavier and had longer hind tibia than those reared on *C. capitata*. This study presents new results on the biology of *D. areolatus* on different hosts. The implications of our results are discussed in a context of mass multiplication of this parasitoid.

Key words: biological control, fruit fly, parasitoid, Tephritidae, Braconidae

Introdução

A utilização do controle biológico para o manejo de tefritídeos praga teve notável ressurgimento ao redor do mundo nas últimas duas décadas. Dessa forma, diversos programas de supressão e erradicação de espécies quarentenárias de moscas-das-frutas incorporaram ao *roll* de tecnologias, liberações inundativas e inoculativas de parasitoides (Cancino-Diaz *et al.*, 1992; Montoya *et al.*, 2000). Além disso, devido a baixa eficiência e dificuldade de estabelecimento de espécies exóticas de parasitoides (Carvalho *et al.*, 2000), a utilização de espécies nativas tem recebido especial atenção devido ao longo período de co-evolução com seus hospedeiros e por estarem adaptadas as condições ambientais locais.

Doryctobracon areolatus (Szepligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) é um endoparasitoide, coinobionte de vida solitária, nativo da região Neotropical e amplamente distribuído desde o sul dos EUA até a Argentina (Ovruski *et al.*, 2000; Aluja *et al.*, 2003; Nunes *et al.*, 2012). Esta espécie tem sido comumente encontrada atacando larvas de espécies do gênero *Anastrepha* spp. Schiner, bem como, de *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae) em diferentes espécies frutíferas (Canal & Zucchi, 2000; Sivinski *et al.*, 2000; Nunes *et al.*, 2012).

Estudos faunísticos conduzidos em áreas frutícolas comerciais e nativas em diversos países, demonstram que *D. areolatus* é a espécie dominante (Leonel Jr *et al.*, 1995; Matrangolo *et al.*, 1998; Eitam *et al.*, 2003; Garcia & Corseuil, 2004; Nunes *et al.*, 2012). Na região centro sul da Flórida Eitam *et al.* (2003) verificaram que esta espécie representa de 61 a 100% de todas as espécies de parasitoides encontradas, além disso, foram observadas taxas de parasitismo de 36 %. No Brasil, pesquisas demonstraram que *D. areolatus* é capaz de explorar seus hospedeiros em mais de 20 espécies de plantas frutíferas, e no caso de pitangueira o percentual de parasitismo pode chegar a 100 % (Leonel Jr *et al.*, 1995; Matrangolo *et al.*, 1998).

Matrangolo *et al.* (1998) observaram que em pomares de pitanga (*Eugenia uniflora*) frutos ainda verdes são explorados por fêmeas de *D. areolatus*. De acordo com os autores frutos com esta característica encontravam-se infestados por larvas jovens, de primeiro e/ou segundo ínstar. Além disso, os pesquisadores verificaram que em frutos de pitanga colhidos ainda verdes 100 % do parasitismo foi realizado por *D. areolatus*. Estes resultados sugerem que este parasitoide possui vantagem temporal em relação a outras espécies de parasitoides que atacam a fase larval, como por exemplo o braconídeo *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead, 1905) (Hymenoptera: Braconidae), que de acordo com Purcell *et al.* (1994) restringe-se a parasitar larvas mais desenvolvidas.

Embora existam diversos estudos demonstrando o potencial de *D. areolatus* como agente de controle biológico, poucas são as informações sobre sua biologia, especialmente em hospedeiros multiplicados em dieta artificial. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi determinar os parâmetros biológicos de *D. areolatus* em larvas de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) e *C. capitata*, bem como, determinar os parâmetros demográficos da espécie em ambos hospedeiros.

Material e Métodos

Colônias de insetos

Os insetos utilizados neste trabalho foram obtidos das criações de manutenção do laboratório de Entomologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Clima Temperado em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. As colônias de *A. fraterculus* e *C. capitata* tem sido mantidas por mais de quatro anos com base em técnicas padronizadas (Nunes *et al.*, 2013; Gonçalves *et al.*, 2013).

A colônia de manutenção de *D. areolatus* teve início com a coleta de frutos de araçá (*Psidium cattleianum*, Sabine, 1821 - Myrtaceae) infestados com larvas de *A. fraterculus*, nos pomares de frutíferas nativas da EMBRAPA Clima Temperado. Os adultos foram mantidos

em gaiolas de criação (40 cm × 27 cm × 23 cm - l × w × h) e alimentados com solução aquosa de mel na concentração de 30 % e água. Para a multiplicação dos parasitoides foram ofertadas larvas de segundo ínstar de *A. fraterculus* (6 dias de idade) e *C. capitata* (5 dias de idade).

A oferta das larvas foi realizada em uma unidade de parasitismo, onde as mesmas ficavam alocadas em uma placa de acrílico (4 cm de diâmetro × 0,2 cm de altura) envolta em tecido *voile*. As larvas foram expostas ao parasitismo pelo período de 24 horas, sendo posteriormente transferidas para dieta artificial conforme descrito por Nunes *et al.* (2013). Após o início da formação dos primeiros pupários os mesmos, juntamente com as demais larvas que ainda encontravam-se em terceiro ínstar, foram transferidos para caixas de acrílico contendo vermiculita. Todas as criações de manutenção bem como os experimentos foram mantidos em salas climatizadas como temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa do ar de 70 ± 10 % e fotofase de 12 horas.

Biologia de *D. areolatus*

Para o estudo da biologia de *D. areolatus*, 25 casais de cada população (*A. fraterculus* e *C. capitata*) foram formados quando os mesmos possuíam três dias de idade. Cada casal foi mantido em gaiola plástica (300 ml) com tela e alimentados com dieta a base de mel (mistura de mel com papel absorvente). Um dia após a formação dos casais até a morte das fêmeas, foram fornecidas 20 larvas de segundo ínstar (\approx 6 dias de idade para *A. fraterculus* e \approx 4 dias para *C. capitata*) por fêmea. As larvas foram oferecidas em uma unidade de parasitismo constituída por uma placa de acrílico (1,7 cm de diâmetro × 0,1 cm de altura) contendo dieta artificial, composta pela mistura de polpa de goiaba e ágar, envolta por tecido *voile*. Como controle, diariamente, cinco unidades de parasitismo foram preparadas e mantidas nas mesmas condições experimentais, porém não foram apresentadas à fêmeas de *D. areolatus*.

Após oito horas de exposição às fêmeas, as larvas foram transferidas frascos (4 cm de diâmetro × 4,5 cm de altura) contendo dieta artificial (Nunes *et al.*, 2013), onde permaneceram até a formação dos primeiros pupários. Os pupários foram mantidos em frascos (2,5 cm de diâmetro × 4,5 cm de altura) contendo vermiculita, onde permaneceram até a emergência de parasitoides e/ou moscas. Os pupários em que não foi observado emergência foram dissecados para verificar a presença de parasitoides e/ou moscas.

Com base nos dados de emergência determinou-se a fertilidade e a fecundidade das populações de *D. areolatus*, bem como, a razão sexual da população descendente. Para determinação da longevidade de *D. areolatus*, os 25 casais oriundos de cada hospedeiro foram checados diariamente até a verificação da morte dos mesmos.

Após 48 horas da emergência dos primeiros descendentes gerados, 50 indivíduos de cada sexo foram individualizados e mortos, para aferição do peso corporal e do tamanho da tibia posterior. Para determinar o peso utilizou-se balança de precisão Shimadzu modelo AUY220, e para medir o tamanho da tibia posterior foi utilizado microscópio estereoscópico (Zeiss, Jena, Germany) com ocular de graduada, utilizando aumento de 4×. A partir da determinação dos parâmetros biológicos, elaborou-se a tabela de vida de fertilidade, estimando-se o intervalo entre gerações (T), o tempo de duplicação da população (T_d), a taxa líquida de reprodução (R_0), a taxa intrínseca de crescimento (r_m) e a taxa finita de aumento (λ).

Análise Estatística

Os dados referentes as variáveis número de descendentes, percentual de emergência e razão sexual não atenderam os pressupostos para análise paramétrica, dessa forma, os tratamentos foram comparados utilizando-se o teste de Wilcoxon ($P < 0,05$). O peso médio de pupários das duas espécies hospedeiras e de adultos de *D. areolatus*, bem como, o comprimento da

tíbia posterior dos mesmos, foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste *t* ao nível de 5% de significância.

Os parâmetros demográficos foram estimados utilizando a técnica de "Jackknife" (Meyer *et al.*, 1986) utilizando os procedimentos propostos por Maia *et al.* (2000) e os tratamentos comparados pelo teste de Wilcoxon ($P < 0,05$). A longevidade dos adultos foi analisada por meio da construção das curvas de sobrevivência utilizando o estimador de Kaplan-Meier, as quais foram comparadas pelo teste de log-rank. Todas análises foram realizadas utilizando-se a versão 3.1.3 do software R (R Development Core Team, 2015).

Resultados

A produção de descendentes foi significativamente afetada pela espécie hospedeira ($W = 538,5$; $df = 1$; $p < 0,001$). Fêmeas de *D. areolatus* oriundas de larvas de *A. fraterculus* produziram em média 45,32 descendentes enquanto fêmeas criadas em larvas de *C. capitata* geraram apenas 6,56 descendentes (Tabela 1). Em contrapartida, o percentual de emergência não foi afetado significativamente pela espécie hospedeira ($W = 114$; $df = 1$; $p = 0,07$) (Tabela 1).

A população de *D. areolatus* originada de larvas de *A. fraterculus* apresentou proporção significativamente superior de fêmeas (0,61) do que aquela oriunda de *C. capitata* (0,26) ($W = 271$; $df = 1$; $p = 0,004$). Além disso, os insetos emergidos de *A. fraterculus* apresentaram peso (machos: $F = 197,39$; $df = 1$; $p = 0$; fêmeas: $F = 185,23$; $df = 1$; $p = 0$) e comprimento da tíbia posterior (machos: $F = 219,35$; $df = 1$; $p = 0$; fêmeas: $F = 164,31$; $df = 1$; $p = 0$) significativamente superior aos oriundos de *C. capitata* (Tabela 2).

A análise conjunta dos parâmetros demográficos sumarizados na tabela 3, demonstram a superioridade de *A. fraterculus* como hospedeiro para *D. areolatus*. A taxa líquida de reprodução (R_0) apresentada pela população criada em *A. fraterculus* foi aproximadamente

30,5 vezes superior ao dos insetos multiplicados em *C. capitata*. Diferença significativa ($W = 668$; $df = 1$; $p < 0,0001$) foi observada para o intervalo entre gerações (T), o qual foi de apenas 16 dias para a população de *A. fraterculus* de de aproximadamente 24 dias para a população de *C. capitata* (Tabela 3).

Em relação a sobrevivência, desconsiderando o hospedeiro, as fêmeas foram mais longevas do que os machos. O resultado do teste de log-rank demonstrou que a longevidade, tanto de machos ($\chi^2 = 1,3$; $df = 1$; $p = 0,259$) quanto de fêmeas ($\chi^2 = 0,5$; $df = 1$; $p = 0,461$), não foi significativamente afetada pela espécie hospedeira (Fig. 1).

Discussão

No contexto de um programa de controle biológico, a seleção de uma espécie hospedeira é um dos processos fundamentais para a multiplicação do inimigo natural em laboratório, pois o desempenho do mesmo está relacionado com a qualidade do hospedeiro (Dias *et al.*, 2010). Esta escolha torna-se ainda mais importante para espécies de parasitoides polípagos, como no caso de *D. areolatus* (Aluja *et al.*, 1996; Eitam *et al.*, 2004; Garcia & Corseuil, 2004; Nunes *et al.*, 2011).

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que *D. areolatus* oriundo do hospedeiro *A. fraterculus* possui desempenho superior aos insetos obtidos com a utilização de *C. capitata*. As fêmeas da população de *A. fraterculus* produziram aproximadamente 7 vezes mais descendentes do que as fêmeas de *C. capitata* (Tabela 1). Esta diferença de fertilidade torna-se ainda mais evidente com a análise da taxa líquida de reprodução (Ro) das populações (Tabela 2). A utilização de *A. fraterculus* como hospedeiro, possibilitou um crescimento populacional da ordem de 12,78 vezes a cada geração, ou seja, 30 vezes superior ao proporcionado por *C. capitata*. Estes valores são próximos aos encontrados por Gonçalves *et al.* (2013) ao avaliar o potencial das mesmas espécies hospedeiras para a multiplicação do

parasitoide *Aganaspis pelleranoi* (Bréthes, 1924) (Hymenoptera: Figitidae). De acordo com estes autores a Ro da população criada em *A. fraterculus* foi 10 vezes superior a daquela mantida em larvas de *C. capitata*.

Segundo Godfray (1994) o tamanho de um parasitoide pode estar diretamente condicionado ao tamanho da espécie hospedeira. Verificamos que esta condição é aplicável à *D. areolatus*, pois os pupários de *A. fraterculus*, os quais apresentaram peso médio significativamente superior aos de *C. capitata* (Tabela 1), foram responsáveis pela produção de parasitoides com maior peso corporal e comprimento de tibia. Segundo Jervis (2005) parasitoides maiores podem apresentar maior fertilidade e fecundidade conforme demonstrado para *D. areolatus* neste estudo. Além disso, insetos maiores apresentam maior capacidade de busca por hospedeiros em condições de campo, o que é extremamente desejado na produção de agentes de controle biológico (Lawrence *et al.*, 1976).

Para programas de controle biológico é desejável que a proporção de fêmeas seja igual ou superior a 50% e o mais próximo possível de 100%. De acordo com Godfray (1994), a espécie hospedeira é um fator limitante para a razão sexual de uma população de parasitoides. Nossos resultados demonstram que a melhor proporção de fêmeas foi obtida quando os insetos foram multiplicados em *A. fraterculus* (Tabela 1). A análise de λ demonstra que fêmeas oriundas deste hospedeiro são capazes de adicionar, diariamente, mais fêmeas a população do que aquelas que descenderam de *C. capitata* (Tabela 2). Resultados semelhantes foram obtidos com *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead, 1905) (Hymenoptera: Braconidae) por Ovruski *et al.* (2011). Segundo os autores, a utilização de larvas de *A. fraterculus* possibilitou a obtenção de uma proporção de fêmeas de aproximadamente 79,5 %, enquanto *C. capitata* apenas 55%.

O tempo de sobrevivência de um parasitoide esta diretamente relacionado com o tamanho do hospedeiro, assim insetos desenvolvidos em hospedeiros maiores são mais

longevos (Sagarra *et al.*, 2001). De acordo com Rivero & West (2002) e Ellers & Jervis (2003) esta relação é explicada pela maior disponibilidade de recursos nutricionais em hospedeiros maiores. Esta condição já foi descrita para *D. longicaudata* (López *et al.*, 2009), entretanto, os resultados demonstram que esta mesma relação não se aplicou à *D. areolatus*, haja visto que não foram observadas diferenças significativas entre a longevidade dos insetos criados em *A. fraterculus* e *C. capitata* (Figure 1). Nossos resultados vão de encontro aos observados por Gonçalves *et al.* (2013) que verificaram que fêmeas de *A. pelleranoi* foram mais longevos quando multiplicados em larvas de *A. fraterculus*. Contudo, estes autores também verificaram que a longevidade dos machos não foi influenciada pela espécie hospedeira.

A utilização de *A. fraterculus* como hospedeiro, além de permitir a produção de parasitoides com elevada capacidade reprodutiva, propiciou a redução do intervalo médio entre gerações (T) em aproximadamente 9 dias em relação a *C. capitata* (Tabela 2). Esta redução é relevante do ponto de vista de criação massal porque possibilita a multiplicação em menor espaço de tempo. Além disso, a utilização de *A. fraterculus* permitiu reduzir o tempo de duplicação (Td) da população de *D. areolatus* em aproximadamente 65 % em comparação à *C. capitata*.

A análise da taxa intrínseca de crescimento (rm) das duas populações de *D. areolatus* demonstra a melhor adaptação deste parasitoide em *A. fraterculus* (rm: 0,16) (Tabela 2). Este resultado é próximo ao encontrado por Meirelles *et al.* (2013) para *D. longicaudata* (rm: 0,17) criada no mesmo hospedeiro. Além disso, nosso resultado vai de encontro a hipótese sugerida por Aluja *et al.* (2009) de que *D. longicaudata* deveria ser preferida em relação a *D. areolatus*, como agente de controle biológico, devido sua reduzida taxa intrínseca de crescimento. Ademais, cabe ressaltar que *D. areolatus*, por ser nativo da região Neotropical, já encontra-se adaptado a estas condições ambientais. Dessa forma, sua utilização nestas

regiões não enfrentaria problemas de adaptação conforme demonstrado para espécies exóticas introduzidas à exemplo do que ocorreu com *D. longicaudata* no Brasil (Carvalho *et al.*, 2000; Sugayama, 2000). Cabe ressaltar que do ponto de vista evolutivo, o melhor desenvolvimento de *D. areolatus* em *A. fraterculus* pode ser explicado pela longa história co-evolutiva destas espécies, haja visto que as mesmas possuem origem Neotropical.

Nosso estudo apresenta informações inéditas sobre a biologia de *D. areolatus* em hospedeiros multiplicados em dieta artificial. Além disso, demonstramos que embora seja possível multiplicá-lo em ambas as espécies hospedeiras estudadas, *A. fraterculus* proporcionou as melhores condições para o desenvolvimento deste inimigo natural. Estes resultados possibilitarão que as pesquisas com este importante agente de controle biológico sejam aceleradas e avancem em diversas áreas do conhecimento, especialmente no que diz respeito ao desenvolvimento de sistemas de criação massal.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo financiamento deste estudo.

Referências

Aluja M., Celedonio-Hurtado H., Liedo P., Cabrera M., Castillo F., Guillén J., Rios E. (1996) Seasonal population fluctuations and ecological implications for management of *Anastrepha* Fruit Flies (Diptera: Tephritidae) in commercial mango orchards in southern Mexico. *Journal of Economic Entomology*, **89**, 654–667.

- Aluja M., Rull J., Sivinski J., Norrbom A.L., Wharton R.A., Macías-Ordóñez R., Díaz-Fleischer F., López M. (2003) Fruit flies of the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) and associated native parasitoids (Hymenoptera) in the tropical rainforest biosphere reserve of Montes Azules, Chiapas, Mexico. *Environmental Entomology*, **32**, 1377–1385.
- Aluja M., Sivinski J., Ovruski S., Guillén L., López M., Cancino J., Torres-Anaya A., Gallegos-Chan G., Ruíz L. (2009) Colonization and domestication of seven species of native New World hymenopterous larval-prepupal and pupal fruit fly (Diptera: Tephritidae) parasitoids. *Biocontrol Science and Technology*, **19**, 49–79.
- Canal, N.A., Zucchi, R.A (2000) Parasitóides - Braconidae, *In: Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*, pp. 119– 126. (Eds) Malavasi, A.; Zucchi R.A. Ribeirão Preto: Holos.
- Cancino-Diaz, J., Enkerlin, D., Martinez, L., Guillen, J. (1992) Evaluaciones del efecto de las liberaciones de parasitoides sobre poblaciones de moscas de la fruta, *In VI Curso Internacional sobre moscas de la fruta, Tomo II*, pp. 51–59. México: Programa Moscamed.
- Carvalho, E.S., Nascimento, S.S., Matrangolo, W.J.R. (2000) Controle Biológico, *In: Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*, pp. 113–117. (Eds) Malavasi, A.; Zucchi R.A. Ribeirão Preto: Holos.
- Dias N. da S., Parra J.R.P., Dias C.T. dos S. (2010) Fertility life table of three neotropical species of Trichogrammatidae on factitious hosts as a criterion for selection of hosts. *Revista Brasileira de Entomologia*, **54**, 120–124.
- Eitam A., Holler T., Sivinski J., Aluja M. (2003) Use of host fruit chemical cues for laboratory rearing of *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, **86**, 211–216.

- Eitam A., Sivinski J., Holler T., Aluja M. (2004) Biogeography of braconid parasitoids of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Florida. *Annals of the Entomological Society of America*, **97**, 928–939.
- Ellers J., Jervis M. (2003) Body size and the timing of egg production in parasitoid wasps. *Oikos*, **102**, 164–172.
- Garcia F.R.M., Corseuil E. (2004) Native hymenopteran parasitoids associated with fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Santa Catarina state, Brazil. *Florida Entomologist*, **87**, 517–521.
- Godfray H.C.J. (1994) *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*, New Jersey: Princeton University Press.
- Gonçalves R.S., Nava D.E., Pereira H.C., Lisbôa H., Grützmacher A.D., Valgas R.A. (2013) Biology and fertility life table of *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae) in larvae of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **106**, 791–798.
- Jervis M. (2005) *Insects as Natural Enemies: A Practical Perspective*, Dordrecht: Springer Science & Business Media.
- Lawrence P.O., Baranowski R.M., Greany P.D. (1976) Effect of host age on development of *Biosteres* (= *Opius*) *longicaudatus*, a parasitoid of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. *The Florida Entomologist*, **59**, 33–39.
- Leonel Jr F.L., Zucchi R.A., Wharton R.A. (1995) Distribution and tephritid hosts (Diptera) of braconid parasitoids (Hymenoptera) in Brazil. *International Journal of Pest Management*, **41**, 208–213.
- López O.P., Hénaut Y., Cancino J., Lambin M., Cruz-López L., Rojas J.C. (2009) Is host size an indicator of quality in the mass-reared parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae)? *Florida Entomologist*, **92**, 441–449.

- Maia A. de H.N., Luiz A.J.B., Campanhola C. (2000) Statistical inference on associated fertility life table parameters using Jackknife technique: computational aspects. *Journal of Economic Entomology*, **93**, 511–518.
- Matrangolo W.J.R., Nascimento A.S., Carvalho R.S., Melo E.D., Jesus M.D. (1998) Fruit fly parasitoids associated with tropical fruits. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, **27**, 593–603.
- Meirelles R.N., Redaelli L.R., Ourique C.B. (2013) Comparative biology of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) reared on *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, **96**, 412–418.
- Meyer J.S., Ingersoll C.G., McDonald L.L., Boyce M.S. (1986) Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs. Bootstrap Techniques. *Ecology*, **67**, 1156–1166.
- Montoya P., Liedo P., Benrey B., Cancino J., Barrera J.F., Sivinski J., Aluja M. (2000) Biological control of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in mango orchards through augmentative releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control*, **18**, 216–224.
- Nunes A.M., Costa K.Z., Faggioni K.M., Costa M. de L.Z., Gonçalves R. da S., Walder J.M.M., Garcia M.S., Nava D.E. (2013). Artificial diets for the rearing of adult and larvae of South-American fruit fly. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **48**, 1309–1314.
- Nunes A.M., Nava D.E., Müller F.A., Gonçalves R. da S., Garcia M.S. (2011) Biology and parasitic potential of *Doryctobracon areolatus* on *Anastrepha fraterculus* larvae. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **46**, 669–671.
- Nunes, A., Müller, F.A., Gonçalves, R.S., Garcia, M.S., Costa, V.A., Nava, D.E. (2012) Moscas frugívoras e seus parasitoides nos municípios de Pelotas e Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, **42**, 6–12.

- Ovruski S., Aluja M., Sivinski J., Wharton R. (2000) Hymenopteran parasitoids on fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the Southern United States: diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. *Integrated Pest Management Reviews*, **5**, 81–107.
- Ovruski S.M., Bezdjian L.P., Van Nieuwenhove G.A., Albornoz-Medina P., Schliserman P. (2011) Host Preference by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymneoptera: Braconidae) reared on larvae of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist*, **94**, 195–200.
- Purcell M.F., Jackson C.G., Long J.P., Batchelor M.A. (1994) Influence of guava ripening on parasitism of the Oriental fruit-fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae), by *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) and other parasitoids. *Biological Control*, **4**, 396–403.
- R Development Core Team (2015) *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <http://www.R-project.org/>.
- Rivero A., West S.A. (2002) The physiological costs of being small in a parasitic wasp. *Evolutionary Ecology Research*, **4**, 407–420.
- Sagarra L. A., Vincent C., Stewart R. K. (2001) Body size as an indicator of parasitoid quality in male and female *Anagyrus kamali* (Hymenoptera: Encyrtidae). *Bulletin of Entomological Research*, **91**, 363–367.
- Sivinski J., Piñero J., Aluja M. (2000) The distributions of parasitoids (Hymenoptera) of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) along an altitudinal gradient in Veracruz, Mexico. *Biological Control*, **18**, 258–269.

Sugayama, R. L. (2000) *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) na região produtora de maçãs do Rio Grande do Sul: relação com os inimigos naturais e potencial para o controle biológico. Doutorado - Tese. Universidade de São Paulo.

Tabela 1 - Peso de pupários de *A. fraterculus* e *C. capitata*, número total de descendentes, percentual de emergência e razão sexual de *D. areolatus* criados em ambos hospedeiros

Parâmetros biológicos	<i>Anastrepha fraterculus</i>			<i>Ceratitis capitata</i>		
	Mediana	Média	Desvio padrão	Mediana	Média	Desvio padrão
Peso de pupários (g)	19,10 a	19,10	2,00	10,50 b	10,50	1,00
Número de descendentes	58,00 a	45,32	34,46	1,00 b	6,56	11,29
Emergência (%)	76,71 a	70,92	20,63	94,21a	68,57	45,28
Razão sexual	0,63 a	0,61	0,23	0,13 b	0,26	0,32

Medianas seguidas pelas mesmas letras na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon ($P < 0,05$).

Tabela 2 - Valores médios (\pm EP) do comprimento da tíbia posterior e do peso de adultos machos e fêmeas de *D. areolatus* criados em larvas de *A. fraterculus* e *C. capitata*

Parâmetros biológicos	Hospedeiro	
	<i>Anastrepha fraterculus</i>	<i>Ceratitis capitata</i>
Comprimento da tíbia posterior (mm)		
Machos	1,21 \pm 0,009 a	0,94 \pm 0,014 b
Fêmeas	1,37 \pm 0,016 a	1,07 \pm 0,016 b
Peso de adultos (g)		
Machos	3,58 \pm 0,08 a	1,89 \pm 0,08 b
Fêmeas	4,32 \pm 0,09 a	2,54 \pm 0,08 b

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si pelo teste *t* ($P < 0,05$).

Tabela 3 - Parâmetros demográficos de *D. areolatus* criado em larvas de *A. fraterculus* e *C. capitata*

Parâmetros demográficos	Hospedeiro					
	<i>Anastrepha fraterculus</i>			<i>Ceratitis capitata</i>		
	Mediana	Média	Desvio padrão	Mediana	Média	Desvio padrão
Taxa líquida de reprodução (Ro)	12,78 a	9,99	7,59	0,16 b	0,33	0,49
Taca intrínseca de aumento (rm)	0,11 a	0,16	0,09	0,08 b	0,07	0,03
Intervalo entre gerações (T)	16,00 b	14,66	5,46	23,45 a	23,38	8,78
Tempo de duplicação (Td)	5,45 b	4,57	2,00	7,90 a	13,04	14,21
Razão finita de aumento (λ)	1,12 a	1,17	0,11	0,93 b	0,95	0,06

Medianas seguidas pela mesma letra na linha não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon ($P < 0,05$).

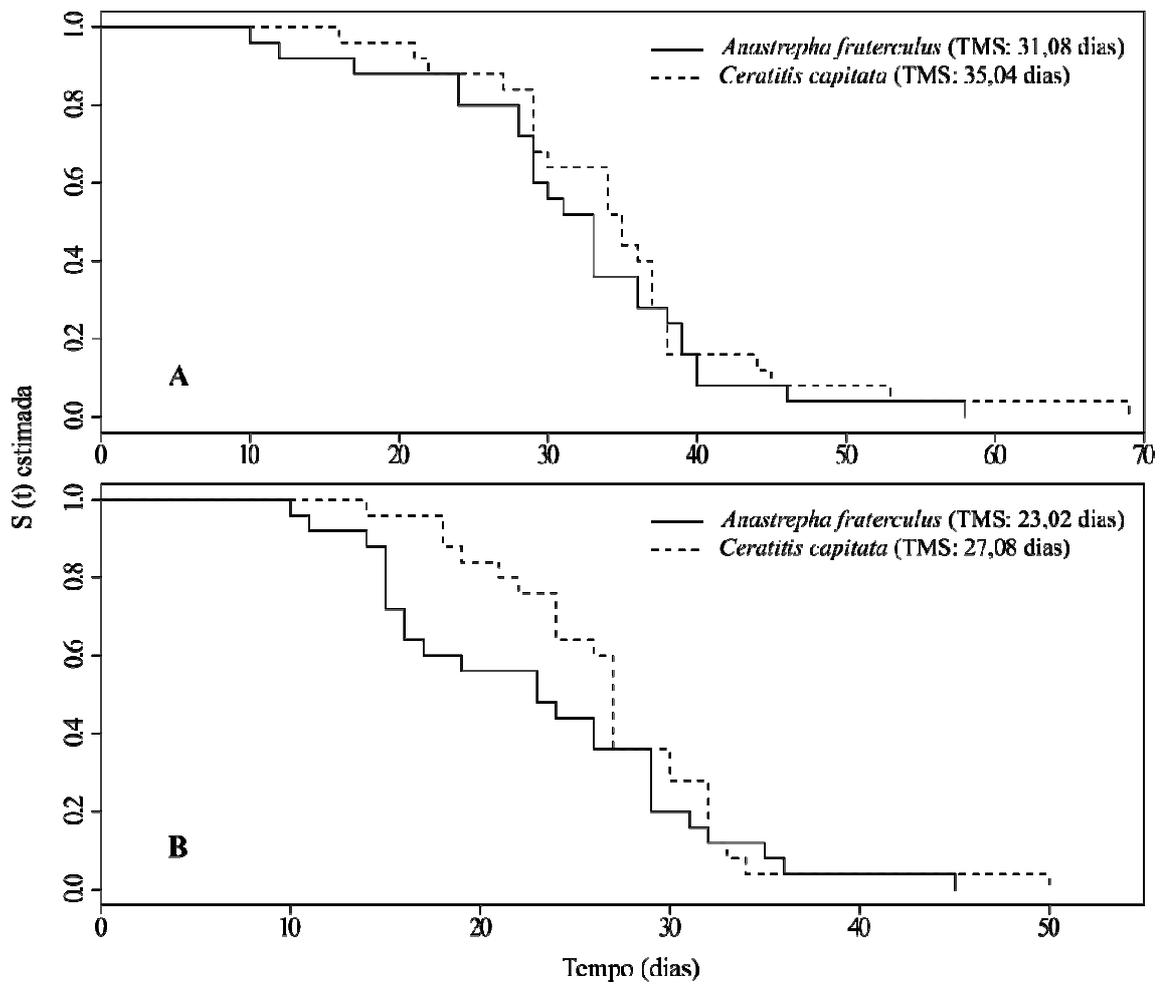


Figura 1 - Curvas de sobrevivência de fêmeas (A) e machos (B) adultos de *D. areolatus* criados em larvas de *A. fraterculus* e *C. capitata*. Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $70 \pm 10\%$; fotofase: 12 horas. Curvas em (A) e (B) não diferem significativamente entre si. TMS: tempo médio de sobrevivência.

Artigo 3 - Revista: PlosOne

4 - Artigo 3

Bionomia, exigências térmicas e tabela de vida de fertilidade de *Doryctobracon areolatus* em diferentes condições térmicas

Bionomia de *D. areolatus* em diferentes temperaturas

Rafael da Silva Gonçalves^{1*}, Adrise Medeiros Nunes¹, Sonia Poncio¹, Roberta Manica-Berto², Anderson Dionei Grützmacher¹, Dori Edson Nava²

¹ Departamento de Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil

² Laboratório de Entomologia, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

* Corresponding author

E-mail: rafaeldasilvagoncalves@gmail.com

Resumo

Doryctobracon areolatus é um endoparasitoide larva-pupa de moscas-das-frutas e que possui potencial para ser utilizado em programas de controle biológico. O trabalho teve por objetivo conhecer a bionomia, determinar as exigências térmicas e o efeito de temperaturas constantes sobre os parâmetros demográficos de *D. areolatus* utilizando larvas de *A. fraterculus* como hospedeiro. A bionomia de *D. areolatus* foi estudada em câmaras climatizadas mantidas nas temperaturas de 18, 20, 25, 28 e 30 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. Observou-se o desenvolvimento de imaturos em todas as temperaturas estudadas. A temperatura base para machos e fêmeas de *D. areolatus* foi de 8,04 e 8,15 °C, respectivamente. As fêmeas (399,97 DD) requerem maior acúmulo de graus dias do que os machos (358,05 DD). A análise conjunta dos parâmetros demográficos demonstra que a faixa térmica ideal para manutenção dos adultos varia entre 22 e 25 °C. A máxima taxa líquida de reprodução (R_0) foi estimada para ocorrer a 23,6 °C, sendo que nesta temperatura a população de *D. areolatus* aumenta aproximadamente 31 vezes a cada geração. A longevidade tanto de machos quanto de fêmeas apresentou relação inversa com a temperatura, variando de 27,83 a 8,41 dias para machos e de 42,75 a 16,58 dias para fêmeas. Em todas as temperaturas estudadas as fêmeas foram mais longevas do que os machos. Os resultados obtidos são discutidos tendo em vista suas aplicações para um sistema de criação massal, bem como, sobre o aspecto de algumas implicações a nível de campo.

Palavras-chave: temperatura base, graus dias, Braconidae, controle biológico

Bionomics, thermal requirements and fertility life table of *Doryctobracon areolatus* under different thermal conditions

Abstract

Doryctobracon areolatus is a larval-pupal endoparasitoid larval-pupal of fruit flies with potential to be used in biological control programs. This study aimed to know the bionomics, determine thermal requirements and effects of constant temperatures on demographic parameters of *D. areolatus* using larvae of *A. fraterculus* as host. The bionomics of *D. areolatus* was studied in air-conditioned chambers at temperatures 18, 20, 25, 28 and 30°C, relative humidity (RH) 70±10% and a photophase of 12 h. Immature development was investigated at all temperatures studied. The base temperature for males and females of *D. areolatus* was 8.04 and 8.15°C, respectively. Females (399.97 DD) required greater accumulation of degree/days than males (358.05 DD). The joint analysis of demographic parameters showed that the ideal thermal range for adult maintenance varied between 22 and 25°C. The maximum net reproduction rate (R_0) was estimated for 23.6°C and, at this temperature, the population of *D. areolatus* increased approximately 31 times every generation. Longevity of both males as females showed inverse relationship with temperature, ranging from 27.83 to 8.41 d for males and from 42.75 to 16.58 d for females. At all temperatures studied, females had greater longevity than males. The results are discussed considering the use of the species in a massive rearing system and aspects of some field conditions were also approached.

Key words: lower thermal threshold, degree days, Braconidae, biological control

Introdução

As moscas-das-frutas representam um dos maiores problemas para a fruticultura mundial. A espécie *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae), também conhecida por mosca-das-frutas sul-americana, possui origem Neotropical e encontra-se distribuída desde o Sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina [1]. Esta espécie é considerada uma das principais pragas da fruticultura na América do Sul [2–4]. No Brasil *A. fraterculus* encontra-se amplamente distribuída e utiliza como hospedeiros mais de 90 espécies de plantas em 20 famílias botânicas [5]. Estudos demonstram que as perdas causadas por *A. fraterculus* podem chegar a 100% quando medidas de controle não são adotadas [6].

Atualmente, o controle desta praga tem sido realizado basicamente com o uso de agrotóxicos por meio de iscas-tóxicas e/ou em aplicações em cobertura total [2]. Entretanto, o uso de inseticidas tem como conseqüências, a redução populacional de inimigos naturais e polinizadores, surgimento de pragas secundárias, poluição ambiental e contaminação de trabalhadores [7]. Em virtude destes problemas, tem crescido o interesse pela utilização de agentes de controle biológico nos programas de manejo integrado de tefritídeos-praga [8].

Nas últimas duas décadas, a utilização do controle biológico para o manejo de populações de tefritídeos praga teve notável ressurgimento no âmbito mundial [9]. Neste sentido, diversos programas de controle e erradicação de espécies quarentenárias de moscas-das-frutas na América incorporaram ao *roll* de ferramentas, liberações massivas de parasitoides [10–13].

No Brasil, historicamente o controle biológico foi realizado por meio da utilização de espécies exóticas de parasitoides. Em 1937, *Tetrastichus giffardianus* Silvestri, 1915 (Hymenoptera: Eulophidae) foi introduzido para o controle de *Ceratitidis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae) e em 1994 importou-se *Diachasmimorpha longicaudata*

(Ashmead, 1905) (Hymenoptera: Braconidade) com o objetivo de manejar populações de *C. capitata* e *A. fraterculus* [12,14]. Ambas espécies de parasitóides foram capazes de se estabelecer, porém a taxa de parasitismo não foi a esperada [15]. No caso de *D. longicaudata* a taxa de parasitismo não atingiu o nível de 12 % [12].

Em virtude dos insucessos com espécies exóticas, o interesse pela utilização de espécies nativas de parasitoides tem se tornado cada vez maior, pois estas possuem longa relação de co-evolução com suas espécies hospedeiras. Ademais, as populações de parasitoides nativas encontram-se adaptadas as condições ambientais locais. Contudo, um dos entraves para a utilização de tais espécies é a falta de informações que possibilitem a produção massal de forma eficiente [16].

Doryctobracon areolatus (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) é um endoparasitoide coinobionte larva-pupa e encontra-se amplamente distribuído na região Neotropical, desde o México até a Argentina [17]. No Brasil diversos estudos demonstram que *D. areolatus* é a espécie mais frequente parasitando larvas de diferentes espécies do gênero *Anastrepha* e de *C. capitata* [18,19].

Estudos realizados em condições de campo demonstraram que o nível de parasitismo de *D. areolatus* variou de 32,3 a 63,4 % de acordo a espécie frutífera hospedeira [20]. Resultados obtidos em condições de laboratório demonstram que a taxa médio de parasitismo, em frutos de mamão infestados com larvas de *A. fraterculus*, é de aproximadamente 53 % [21]. Estudos faunísticos realizados na região centro-sul da Flórida demonstraram que as taxas de parasitismo foram superiores a 36 % [22].

Embora os resultados demonstrem o potencial de uso de *D. areolatus* como agente de controle biológico, são escassas as informações a respeito de fatores abióticos sobre sua biologia. É sabido que dentre estes, a temperatura pode afetar diferentes aspectos biológicos dos insetos, como por exemplo, fecundidade, razão sexual, longevidade, duração do ciclo de

vida e a viabilidade dos diferentes estágios de desenvolvimento [23–25]. Além disso, o conhecimento das exigências térmicas dos insetos permite o controle da produção em laboratório, o desenvolvimento de modelos para estudos de zoneamento ecológico, bem como, na previsão de liberações no campo [26–28]. Nesse sentido, o presente trabalho tem por objetivo estudar a bionomia de *D. areolatus* visando determinar as exigências térmicas e a tabela de vida de fertilidade em diferentes temperaturas, utilizando como hospedeiro larvas de *A. fraterculus*.

Materiais e Métodos

Colônias de manutenção

As criações foram mantidas em sala climatizada, com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa do ar de 70 ± 10 % e fotofase de 12 horas. Para a criação de *A. fraterculus* foram utilizadas técnicas já descritas para esta espécie [29]. O estabelecimento da criação de manutenção de *D. areolatus* teve início com a coleta de frutos de araçá [*Psidium cattleianum* Sabine, 1821 (Myrtaceae)] infestados com larvas de *A. fraterculus* nos pomares de frutíferas nativas do Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (CPACT). Após a coleta dos frutos, os procedimentos realizados com os mesmos, foram acondicionados em bandejas contendo vermiculita até a coleta dos pupários.

Os parasitoides adultos foram mantidos com água, fornecida em pote de acrílico de 50 mL por capilaridade por meio de uma tira de pano esponja vegetal (Spontex, Ilhéus, Bahia, Brazil). Ademais, os insetos foram alimentados com uma solução aquosa de mel na concentração de 80 %, a qual foi fornecida aos parasitoides em placa de acrílico (3 cm de diâmetro \times 1,5 cm de altura) embebida em algodão. Para a multiplicação dos parasitoides, larvas de segundo ínstar de *A. fraterculus* foram oferecidas aos parasitoides por um período de

24 horas. Assim, as larvas foram depositadas em placa de acrílico (4 cm de diâmetro × 0,2 cm de altura), a qual foi envolta com tecido *voile* e posicionada no piso da gaiola.

Logo após o período de exposição as larvas foram transferidas para potes plásticos contendo dieta artificial [30], onde permaneceram até a formação dos primeiros pupários, quando então foram transferidas para caixas de acrílico com vermiculita. Parte dos adultos de *D. areolatus* coletados em campo e da primeira geração criada em laboratório foram armazenados em *vials* contendo álcool 70 % e enviados para identificação ao Dr. Valmir Antônio Costa do Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios em Campinas, São Paulo.

Biologia das fases imaturas de *D. areolatus* e determinação das exigências térmicas

Larvas de segundo ínstar de *A. fraterculus* foram expostas por 24 horas à fêmeas de *D. areolatus* com 13 dias de idade em sala climatizada com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 70 ± 10 % e fotofase de 12 horas. As larvas foram colocadas em placa de acrílico (3 cm de diâmetro × 0,3 cm de altura), sendo esta, envolta por tecido *voile*, e expostas às fêmeas.

Logo após o término do período de exposição as larvas foram transferidas para potes plásticos (4,5 cm × 5 cm de altura) contendo dieta artificial, conforme descrito na primeira seção. Em seguida os insetos foram transferidos para câmaras climatizadas nas temperaturas de 18, 20, 25, 28 e 30 ± 1 °C. Diariamente as larvas foram observadas e quando os primeiros pupários foram formados as larvas foram transferidas para frascos de acrílico (2,5 cm de diâmetro × 4,5 cm de altura) com vermiculita extra-fina como substrato de pupação.

Após 10 dias da formação dos pupários, os mesmos foram observados diariamente a fim de determinar o momento da emergência de machos e fêmeas de *D. areolatus*. Com base

nos dados de emergência determinou-se o percentual de parasitoides emergidos, a duração média do período ovo-adulto, bem como a razão sexual para cada uma das temperaturas estudadas. Além disso, determinou-se a temperatura-base (T_b) e a constante térmica (K) para machos e fêmeas. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos e 100 repetições, onde cada larva de *A. fraterculus* foi considerada como uma repetição (unidade experimental).

Biologia dos adultos e determinação dos parâmetros demográficos de *D. areolatus*

Casais com 24 horas de idade foram formados e mantidos individualizados em gaiolas constituídas por copos de acrílico (500 mL) fechados na porção inferior com tecido *voile* para permitir aeração, e na porção oposta colocou-se uma placa de acrílico que serviu como base para a gaiola. Os insetos foram mantidos em câmaras climatizadas nas temperaturas de 18, 20, 25, 28 e 30 ± 1 °C.

Os insetos foram alimentados com solução aquosa de mel na concentração de 80 % embebida em papel absorvente fornecido em placa de acrílico (2,2 cm de diâmetro \times 0,7 cm de altura). Diariamente desde a formação dos casais até a morte das fêmeas foram oferecidas 20 larvas de segundo ínstar de *A. fraterculus*. As larvas foram dispostas em placas de acrílico (1,7 cm de diâmetro \times 0,2 cm de altura), contendo dieta artificial à base de polpa de goiaba e ágar, envoltas por tecido *voile*.

As larvas foram expostas aos parasitoides por 24 horas e logo em seguida foram transferidas para potes plásticos (4,5 cm \times 5 cm de altura) contendo dieta artificial conforme descrito na segunda seção. Quando verificou-se a formação dos primeiros pupários as larvas foram transferidas para frascos de acrílico (2,5 cm de diâmetro \times 4,5 cm de altura) contendo vermiculita extra-fina como substrato de pupação. Logo após os insetos foram acondicionados

em sala climatizada com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 70 ± 10 % e fotofase de 12 horas.

Após a emergência, foram contabilizados o número total de parasitoides e moscas emergidas. Ademais, as pupas intactas foram dissecadas para verificar a presença de parasitoides não emergidos. Foram avaliados o número total de parasitoides, percentual de emergência, parasitismo diário e acumulado, razão sexual (número de fêmeas/número de fêmeas + machos), e longevidade de machos e fêmeas.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos (temperaturas), com 12 repetições, sendo cada unidade experimental um casal de *D. areolatus*. Os dados dos parâmetros biológicos, obtidos nos estudos da biologia de imaturos e de adultos de *D. areolatus*, foram utilizados para a construção da tabela de vida de fertilidade, e para a proposição de modelos polinomiais para descrever a influência da temperatura nos parâmetros demográficos de *D. areolatus*.

Análise estatística

A determinação da temperatura base, bem como, da constante térmica de machos e fêmeas foi realizada por meio do método da hipérbole, utilizando-se o software MOBAE (Modelos Bioestatísticos Aplicados à Entomologia) [31]. Os dados de duração do período ovo-adulto foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste t ($p \leq 0,05$). Para a razão sexual, da população de adultos oriundos dos imaturos mantidos nas diferentes temperaturas, as proporções médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Z ($p \leq 0,05$), protegido pelo teste de Qui-quadrado ($p \leq 0,05$). As análises de duração do período ovo-adulto e razão sexual foram realizadas com o software R [32].

Os parâmetros da tabela de vida de fertilidade foram estimados por meio da técnica de “jackknife” [33] utilizando a programação “Lifetable.sas” [34] no programa SAS. Os dados

obtidos foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, a independência dos resíduos por análise gráfica. Na sequência, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, os efeitos de temperatura foram avaliados por modelos de regressão polinomial ($p \leq 0,05$) representados pelas equações: $y = y_0 + ax$ ou $y = y_0 + ax + bx^2$, onde: y = variável resposta; y_0 = variável resposta correspondente ao ponto mínimo da curva; a = valor máximo estimado para a variável resposta; b = declividade da curva; x = temperatura [35]. Para avaliação da longevidade, as curvas de sobrevivência foram construídas com a utilização do estimador de Kaplan-Meier e posteriormente comparadas pelo teste de log-rank utilizando-se o software R [32].

Resultados

Biologia das fases imaturas de *D. areolatus* e determinação das exigências térmicas

O desenvolvimento de imaturos de *D. areolatus* foi observado em todas as temperaturas estudadas. A duração do período ovo-adulto para ambos os sexos no intervalo de temperatura de 18 a 30 °C apresentou relação inversa com a temperatura, variando de 44,26 a 19,26 dias para fêmeas ($F = 2348,48$; d.f. = 4; $p = 0$) e de 41,31 a 17,40 dias para machos ($F = 1337,69$; d.f. = 4; $p = 0$) (Tabela 1).

Com base na duração média do tempo de desenvolvimento do período ovo-adulto verificou-se que a temperatura-base de fêmeas e machos de *D. areolatus* foi de 8,04 e 8,15 °C, respectivamente. A constante térmica (K) para fêmeas e machos foi de 399,97 e 358,05 graus-dias, respectivamente (Fig. 1).

A razão sexual dos adultos oriundos dos imaturos não foi significativamente afetada

pelas diferentes temperaturas ($\chi^2 = 1,35$; d.f. = 4; $p = 0,85$) (Tabela 1). Entretanto, se compararmos os resultados obtidos em 18 e 30 °C verificar-se-á que a diferença na produção de fêmeas entre estas temperaturas é de aproximadamente de 20 %.

Biologia dos adultos e determinação dos parâmetros demográficos de *D. areolatus*

Os dados obtidos para a taxa líquida de reprodução (R_0) ajustaram-se ao modelo de regressão polinomial quadrático positivo ($F = 93,6130$; d.f. = 4; $p = 0,01$) (Fig. 2A). A partir da equação, a máxima R_0 foi obtida com a temperatura de 23,6 °C. Comparando os resultados observou-se que fêmeas mantidas a 20 e 25 °C apresentaram acréscimo na R_0 de 126,7 e 204,3 %, respectivamente, quando comparadas com as fêmeas mantidas a 18 °C.

As diferentes temperaturas influenciaram significativamente o parâmetro intervalo entre gerações (IMG) ($F = 108,7773$; d.f. = 4; $p = 0,001$) (Fig. 2B). O máximo IMG foi obtido na temperatura de 22,8 °C. Populações mantidas a 20 e 25 °C apresentaram redução do IMG de 9,8 e 34,4 %, respectivamente, quando comparadas com aquela mantida a 18 °C.

Para o parâmetro taxa intrínseca de crescimento (r_m) verificou-se que os dados ajustaram-se ao modelo de regressão polinomial quadrático positivo ($F = 32,5364$; d.f. = 4; $p = 0,02$) com R^2 de 0,97 (Fig. 2C). A partir da derivação da equação de regressão verificou-se que o ponto de máxima para r_m ocorreu a 24,3 °C.

A temperatura também influenciou significativamente a razão finita de crescimento (λ) ($F = 50,6352$; d.f. = 4; $p = 0,01$) (Fig. 2D). Comparando as temperaturas, observou-se que fêmeas expostas a 20 e 25 °C obtiveram acréscimos na razão finita de crescimento (λ), respectivamente de 13 e 33 %, quando comparadas a temperatura de 18 °C.

Em relação a taxa de parasitismo diária, verificou-se que para as fêmeas mantidas a 18 e 20 °C o valor máximo observado foi de 4 e 4,6, respectivamente. Na temperatura de 25 °C a

taxa máxima de parasitismo diária observada foi 6,69 larvas por fêmea, a qual foi a maior entre todas as temperaturas estudadas (Fig. 3). O parasitismo acumulado nas temperaturas de 28 e 30 °C atingiu o nível de 80 % aos 20 e 11 dias de vida das fêmeas, respectivamente (Fig. 3). Para as temperaturas de 18, 20 e 25 °C o mesmo nível somente foi atingido aos 34, 33 e 23 dias, respectivamente (Fig. 3).

A longevidade de machos ($\chi^2 = 30,1$; d.f. = 4; $p < 0,0001$) e fêmeas ($\chi^2 = 47,1$; d.f. = 4; $p < 0,0001$) foi afetada pela temperatura e apresentou relação inversa com a mesma (Figs. 4A e B). Em todas as temperaturas estudadas as fêmeas de *D. areolatus* foram mais longevas do que os machos. O tempo médio de vida das fêmeas variou de 42,75 (18 °C) a 16,58 dias (30 °C) e o dos machos de 27,83 (18 °C) a 8,41 dias (30 °C).

Discussão

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que temperaturas amenas (18 a 25 °C) foram mais favoráveis ao desenvolvimento das formas imaturas de *D. areolatus* haja vista que o percentual de insetos emergidos nas temperaturas de 28 e 30 °C foi menor que nas demais temperaturas estudadas. Ademais, os imaturos foram capazes de se desenvolver em um gradiente amplo de temperatura (18 a 30 °C). Estes resultados sugerem que *D. areolatus* apresenta vantagens em relação a seus heteroespecíficos no que diz respeito a multiplicação em laboratório e plasticidade térmica em condições de campo. Imaturos de *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes, 1924) (Hymenoptera: Figitidae) submetidos as mesmas condições utilizadas no presente trabalho (temperatura e hospedeiro), não foram capazes de se desenvolver em 28 e 30 °C [25].

Do ponto de vista de multiplicação em laboratório, a plasticidade dos imaturos de *D. areolatus* e sua capacidade de desenvolvimento em altas temperaturas, possibilita que em situações de necessidade, o desenvolvimento dos insetos pode ser acelerado ou retardado. No

que concerne as condições de campo, é possível que tanto populações naturais de *D. areolatus*, como as produzidas para liberações massivas, tenham maior sucesso em aumentar suas populações em ambientes onde temperaturas elevadas ocorrem por períodos mais extensos.

A temperatura base tanto dos machos (8,15 °C) quanto das fêmeas (8,04 °C) e a constante térmica (machos: 358,05; fêmeas: 399,97 graus dia) de *D. areolatus* são inferiores a de *A. fraterculus* ($T_b = 10,7^{\circ}\text{C}$, $K = 430,6$ graus dia), importante espécie hospedeira [36]. Em todas as temperaturas estudadas observou-se que as moscas emergiram antes dos parasitoides. Os resultados do parâmetro duração do período ovo-adulto de *D. areolatus* à 25 °C, tanto de machos (19,25 dias) quanto de fêmeas (21,85 dias), são próximos aos obtidos em trabalhos anteriores para fêmeas (22,1 dias) e machos (20,6 dias) [22], os quais utilizaram como hospedeiro larvas de *Anastrepha suspensa* (Loew, 1862) (Diptera Tephritidae). Esta diferença do período ovo-adulto de parasitoide e hospedeiro é útil do ponto de vista de criação massal, pois pode ser utilizada para segregação dos mesmos, tornando o processo de criação menos laborioso.

As equações de regressão que descrevem a relação entre velocidade de desenvolvimento, de machos e fêmeas de *D. areolatus*, e temperatura são apresentadas na Figura 2. Observa-se que tanto para machos quanto para fêmeas há uma relação inversamente proporcional entre velocidade de desenvolvimento e temperatura. Esta relação é explicada pelo fato dos insetos serem organismos ectotérmicos, portanto, a temperatura corporal varia de acordo com a temperatura do ambiente onde os mesmos se encontram [37]. Em virtude disto, com a elevação da temperatura ambiental e conseqüentemente da corporal, ocorre o aumento na velocidade das reações químicas e em função deste fenômeno a velocidade de desenvolvimento dos insetos aumenta e o tempo de desenvolvimento é reduzido. Contudo, esta relação direta ocorre dentro de um limite que é inerente de cada espécie [38], e no caso de *D. areolatus* a temperatura máxima deste limite é superior a 30 °C.

Nossos resultados demonstram que a temperatura não afetou significativamente a razão sexual da população de adultos oriundos dos imaturos mantidos nas diferentes temperaturas estudadas (Tabela 1). Entretanto, embora não tenhamos encontrado diferença estatística significativa, é possível observar um aumento gradual na proporção de fêmeas com o aumento da temperatura. Ao compararmos os dados de 18 e 30 °C podemos observar que a diferença na proporção de fêmeas é cerca de 20 % maior a 30 °C. Estes resultados sugerem que as fêmeas imaturas de *D. areolatus* são mais tolerantes a altas temperaturas que os machos. Esta constatação vai de encontro ao comportamento observado em *Psytalia corsyrae* (Wilkinson, 1927) (Hymenoptera: Braconidae), em que as fêmeas imaturas foram menos tolerantes a altas temperaturas [39].

As diferentes temperaturas estudadas também afetaram de forma significativa os parâmetros biológicos mensurados na fase adulta de *D. areolatus*. Ao analisarmos conjuntamente os parâmetros demográficos de uma espécie de insetos podemos comparar a performance da mesma sobre diferentes condições bióticas e abióticas, como por exemplo em diferentes temperaturas.

Dessa forma, podemos verificar que de maneira geral para *D. areolatus* os melhores resultados foram obtidos entre as temperaturas de 22 e 25 °C (Fig. 2). A única exceção a esse intervalo de temperatura foi observada para o parâmetro λ , onde o ponto de máxima foi observado a 28 °C.

O maior valor observado para o parâmetro R_0 foi de 31,06 e foi obtido a 23,6 °C (ponto de máxima), ou seja, uma população de *D. areolatus* mantida nesta temperatura aumenta a cada geração aproximadamente 30 vezes. Portanto, para otimizar o processo de multiplicação desta espécie em laboratório é recomendável que os adultos sejam mantidos em temperaturas próximas a 23,6 °C. Ao comparar os resultados de 23,6 °C em relação aos obtidos a 18 °C, onde a R_0 foi de 9,8, verificar-se-á um acréscimo da ordem de 217,03 %.

Analisando as variáveis que compõem a R_0 verifica-se que o motivo deste comportamento se deveu em função da redução da taxa de sobrevivência dos imaturos, mas especialmente pelo impacto das temperaturas extremas na fase adulta, onde verificou-se a redução da proporção de fêmeas da população descendente. Além disso, em altas temperaturas a situação foi agravada devido a menor longevidade das fêmeas (Fig. 4).

O impacto das variáveis da fase adulta sobre a R_0 indicam a existência de um *trade-off* entre longevidade e produção de descendentes. Esta evidência é suportada pelas informações apresentadas na Figura 3 (parasitismo diário e acumulado), onde é possível observar que um mesmo índice de parasitismo acumulado, 80 % por exemplo, é atingido em diferentes idades. Assim para insetos mantidos a 30 °C, este índice foi atingido com 11 dias, ao passo que fêmeas mantidas a 18 °C somente atingiram o mesmo índice aos 34 dias de vida. Além disso, o índice de parasitismo diário demonstra que em média, fêmeas mantidas em temperaturas extremas produziram menor número de descendentes. Este *trade-off* ocorre pois as reservas de gordura acumuladas durante a fase imatura são essenciais para diversos processos fisiológicos da fase adulta, como a manutenção de processos vitais, bem como, fonte de recurso para o processo de oogênese [40].

Em relação ao parasitismo diário, observa-se na Figura 3 que ocorreram oscilações na produção de descendentes em todas as temperaturas estudadas, entretanto, a 30 °C houve uma concentração da produção de descendentes nos primeiros dias de vida das fêmeas. Esse comportamento é similar ao observado para *A. pelleranoi* nesta mesma temperatura e condições de trabalho [25]. *Doryctobracon brasiliensis* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) também concentra a produção de descendentes no início da vida, porém isto pode ser observado para fêmeas mantidas no intervalo de temperatura entre 15 e 28 °C [41].

Nossos resultados indicam que o maior número de descendentes foi gerado por fêmeas mantidas a 25 °C, sendo esta produção distribuída homoganeamente ao longo da vida das

fêmeas, no entanto, 80 % dos descendentes foram gerados até o vigésimo dia de vida. A maior amplitude do período de produção de descendentes pode ser vantajosa do ponto de vista de criação massal, pois as fêmeas podem ser utilizadas por um período maior de tempo.

O intervalo médio entre gerações (IMG) foi o único parâmetro que apresentou relação inversamente proporcional com a temperatura. Estes resultados eram esperados, haja visto que a principal variável a impactar neste parâmetro é a longevidade das fêmeas, a qual também apresentou relação inversa com a temperatura (Fig. 4). A relação inversa entre longevidade e temperatura, que também foi observada nos machos, ocorre pois os insetos são organismos ectotérmicos, e portanto, a temperatura corporal varia conforme a ambiental [37].

O IMG das populações mantidas nas temperaturas de 18 e 30 °C, foi de 15,7 e 6,46, respectivamente. Ao compararmos estes resultados podemos verificar que com o aumento da temperatura, uma população de *D. areolatus* teria seu IMG reduzido em cerca de 58,85 %. Embora seja desejável que uma população apresente um índice baixo de IMG, é preciso considerar que de maneira geral quando este é reduzido outros parâmetros biológicos são afetados, porém de forma negativa, como por exemplo o R_0 . Na temperatura de 25 °C o IMG determinado em nosso estudo foi de 10,31 dias, valor este um pouco superior ao obtido em outro estudo que foi de 8,65 dias [42]. Esta diferença entre os resultados pode estar relacionada com a variabilidade genética das populações de *D. areolatus*, bem como, pelo fato das espécies hospedeiras utilizadas serem diferentes.

A taxa intrínseca de crescimento (r_m) é uma das principais informações obtidas com a determinação dos parâmetros demográficos, pois serve como indicativo para determinar se a espécie será bem sucedida em determinado ambiente [43]. Nossos resultados demonstram que o ponto de máxima para r_m foi obtido a 24,3 °C, onde o índice atingiu o valor de 0,46. Este resultado é bastante superior aos 0,03 obtidos com uma população mexicana de *D. areolatus* utilizando como hospedeiro larvas de *Anastrepha ludens* (Loew, 1873) (Diptera: Tephritidae)

e mantida a 25 °C [42]. As diferenças entre os resultados podem ser atribuídas a diversos fatores como a variabilidade genética das populações de *D. areolatus* e a espécie hospedeira utilizada. A existência do efeito da interação entre espécie hospedeira e temperatura já foi demonstrada para o parasitoide de ovos de lepidópteros *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae) [44]. Entretanto, para parasitoides de moscas-das-frutas esse tipo de informação é escassa e já é alvo de investigação por parte dos autores deste trabalho.

A razão finita de aumento (λ), que representa o número de fêmeas adicionadas a população por fêmea, também foi impactada pelo efeito da temperatura. O modelo polinomial quadrático negativo proposto para descrever o comportamento dos dados é semelhante aos propostos para os parâmetros R_0 e r_m . A redução dos valores de λ em temperaturas extremas ocorreu devido a redução da produção de fêmeas nestas temperaturas. O modelo proposto neste estudo é diferente daquele proposto para *A. pelleranoi* [25] que apresentou comportamento linear e diretamente proporcional entre λ e temperatura. Estas diferenças demonstram que embora utilizem o mesmo recurso hospedeiro, sob as mesmas condições de temperatura, as espécies de parasitoides de moscas-das-frutas respondem de forma diferenciada a estes estímulos.

De acordo com o modelo proposto neste trabalho a máxima λ ocorreu a 28 °C e atingiu o valor de 1,88, no entanto, para os demais parâmetros, esta temperatura demonstrou ser prejudicial. Em contrapartida a 25 °C a λ apresentou valor bastante próximo (1,83) ao ponto de máxima. Portanto, se analisarmos conjuntamente os dados, buscando associar as temperaturas onde obtivemos os pontos de máxima ou aquelas em que os resultados são próximos a estes pontos, podemos verificar que a manutenção de uma colônia de adultos de *D. areolatus* em temperaturas entre 22 e 25 °C é ideal para a otimização da mesma.

A redução da produção do número de fêmeas, em ambos os sentidos a partir do ponto

de máxima pode estar relacionada ao efeito da temperatura sobre os processos fisiológicos que envolvem a liberação de espermatozóides pela espermateca [45]. Espécies de parasitoides da ordem himenóptera apresentam um tipo usual de reprodução e desenvolvimento, em que as fêmeas acasalam logo ao emergir e armazenam os espermatozóides na espermateca. Assim ao liberar os espermatozóides os ovos são fecundados e originam fêmeas, ao passo que quando os ovos são depositados sem terem sido fecundados os mesmos dão origem a machos [46]. Nesse sentido, podemos sugerir que as fêmeas de *D. areolatus* mantidas em temperaturas que se afastam do ponto de máxima para λ , são estimuladas a reduzir a liberação de espermatozóides. Isto porque as condições ambientais passam a ser adversas para sua progênie, em especial às fêmeas que são as responsáveis por manter a existência da população.

Com base nos resultados apresentados nesse estudo verifica-se que as fases imaturas de *D. areolatus* se desenvolveram em um gradiente amplo de temperatura (18 a 30 °C). Em função desta característica é possível acelerar ou retardar o desenvolvimento dos imaturos quando necessário. A respeito da fase adulta, a análise conjunta dos dados da tabela de vida de fertilidade indicam que a maximização da criação ocorre entre 22 e 25 °C. Entretanto, é importante ressaltar que *D. areolatus* é capaz de produzir descendentes no intervalo de 18 a 30 °C.

Referências

1. Malavasi A, Zucchi RA, Sugayama RL. Biogeografia. In: Malavasi A, Zucchi RA, editors. Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado. 1 st. Ribeirão Preto: Holos; 2000. pp. 93–98.
2. Nava DE, Botton M. Bioecologia e controle de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* em pessegueiro. 1 st. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; 2010.

3. Cladera JL, Vilardi JC, Juri M, Paulin LE, Giardini M, Gómez Cendra P V, Segura DF, Lanzavecchia SB. Genetics and biology of *Anastrepha fraterculus*: research supporting the use of the sterile insect technique (SIT) to control this pest in Argentina. BMC Genet. BioMed Central Ltd; 2014;15: S12. doi:10.1186/1471-2156-15-S2-S12
4. Bisognin M, Nava DE, Diez-Rodríguez GI, Valgas RA, Garcia MS, Krolow ACR, Antunes LEC. Development of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) related to the phenology of blueberry, blackberry, strawberry guava, and surinam cherry fruits. J Econ Entomol. 2015;1: 1–9. doi:10.1093/jee/tou002
5. Zucchi RA. Diversidad, distribución y hospederos del género *Anastrepha* en Brasil. In: Ortiz VH, editor. Moscas de La Fruta en Latinoamérica (Diptera: Tephritidae): Diversidad, biología y manejo. 1 st. Distrito Federal, México: S y G; 2007. pp. 77–100.
6. Rupp LCD. Percepção dos agricultores orgânicos em relação à *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) e efeito de preparados homeopáticos no controle da espécie em pomares de pessegueiro. Mestrado. Dissertação. Universidade do Estado de Santa Catarina. 2005.
7. Norris R, Caswell-Chen E, Kogan M. Pesticides. In: Norris R, Caswell-Chen E, Kogan M, editors. Concepts in integrated pest management. 1 st. Upper Saddle River: Prentice Hall; 2002. pp. 242–313.
8. Ovruski S, Aluja M, Sivinski J, Wharton R. Hymenopteran parasitoids on fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the southern United States: diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. Integr Pest Manag Rev. 2000;5: 81–107. doi:10.1023/A:1009652431251
9. Ovruski SM, Colin C, Soria A, Oroño LE, Schliserman P. Introducción y producción en

- laboratorio de *Diachasmimorpha tryoni* y *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) para el control biológico de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) en la Argentina. Rev Soc Entomol Argent. 2003;62: 49–59.
10. Cancino-Diaz J, Enkerlin D, Martinez L, Guillen J. Evaluaciones del efecto de las liberaciones de parasitoides sobre poblaciones de moscas de la fruta. In: Cancino-Diaz J, Enkerlin D, Martinez L, Guillen J, editors. VI Curso Internacional sobre moscas de la fruta, Tomo II,. México: Programa Moscamed; 1992. pp. 51–59.
 11. Sivinski JM, Calkins CO, Baranowski R, Harris D, Brambila J, Diaz J, et al. Suppression of a Caribbean Fruit Fly (*Anastrepha suspensa*(Loew) Diptera: Tephritidae) population through augmented releases of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). Biol Control. 1996;6: 177–185. doi:10.1006/bcon.1996.0022
 12. Carvalho ES, Nascimento SS, Matrangolo WJR. Controle Biológico. In: Malavasi A, Zucchi RA, editors. Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado. 1 st. Ribeirão Preto: Holos; 2000. pp. 113–117.
 13. Montoya P, Liedo P, Benrey B, Cancino J, Barrera JF, Sivinski J, et al. Biological control of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in mango orchards through augmentative releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). Biol Control. 3rd ed. 2000;18: 216–224. doi:10.1006/bcon.2000.0819
 14. Autuori A. Notas sobre a introdução e multiplicação do parasita *Tetrastichus giffardianus* Silv. no Brasil. O Biol. 1938;4: 128–129.
 15. Nava DE, Paranhos BAJ. Controle biológico de moscas-das-frutas com parasitoides nativos. Goiânia: Sociedade Entomológica do Brasil; 2014.

16. Nava DE. Controle biológico de insetos-praga em frutíferas de clima temperado: uma opção viável, mas desafiadora. 1 st. Pelotas: Embrapa Clima Temperado; 2007.
17. Wharton RA, Marsh PM. New world opiinae (Hymenoptera: Braconidae) parasitic on Tephritidae (Diptera). J Wash Acad Sci. 68th ed. 1978;68: 147–167.
18. Canal NA, Zucchi R. Parasitóides - Braconidae. In: Malavasi A, Zucchi RA, editors. Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado. 1 st. Ribeirão Preto: Holos; 2000. pp. 119–126.
19. Nunes AM, Müller FA, Gonçalves R da S, Garcia MS, Costa VA, Nava DE. Moscas frugívoras e seus parasitoides nos municípios de Pelotas e Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. Ciênc Rural. 2012;42: 6–12. doi:10.1590/S0103-84782012000100002
20. Souza Filho MF. Biodiversidade de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) e seus parasitoides (Hymenoptera) em plantas hospedeiras no estado de São Paulo. Doutorado. Tese. Universidade de São Paulo. 1999.
21. Nunes AM, Nava DE, Müller FA, Gonçalves R da S, Garcia MS. Biology and parasitic potential of *Doryctobracon areolatus* on *Anastrepha fraterculus* larvae. Pesqui Agropecuária Bras. 2011;46: 669–671. doi:10.1590/S0100-204X2011000600014
22. Eitam A, Holler T, Sivinski J, Aluja M. Use of host fruit chemical cues for laboratory rearing of *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae). Fla Entomol. 2003;86: 211–216. doi:10.1653/0015-4040(2003)086[0211:UOHFCC]2.0.CO;2
23. Harrison WW, King EG, Ouzts JD. Development of *Trichogramma exiguum* and *T. pretiosum* at five temperature regimes. Environ Entomol. 1985;14: 118–121.

doi:10.1093/ee/14.2.118

24. Chapman RF. The insects: structure and function. 4 th. Cambridge: Cambridge University Press; 1998.
25. Gonçalves RS, Nava DE, Andreazza F, Lisbôa H, Nunes AM, Grützmacher AD, et al. Effect of constant temperatures on the biology, life table, and thermal requirements of *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae), a parasitoid of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). Environ Entomol. 2014;43: 491–500. doi:10.1603/EN13072
26. Parra JRP. Técnicas de criação de *Anasgasta kuehniella*, hospedeiro alternativo para produção de *Trichogramma*. In: Parra JRP, Zucchi RA, editors. *Trichogramma e o controle biológico aplicado*. 1 st. Piracicaba: FEALQ; 1997. pp. 121–150.
27. Cividanes FJ. Uso de graus-dias em entomologia: com particular referência ao controle de percevejos pragas da soja. 1 st. Jaboticabal: FUNEP; 2000.
28. Pratisoli D. Bioecologia de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879, nas traças *Scrobipalpuloides absoluta* (Meyrick, 1917) e *Phthorimaea aperculella* (Zeller, 1873), em tomateiro. Doutorado. Tese. Universidade de São Paulo. 1995.
29. Gonçalves RS, Nava DE, Pereira HC, Lisbôa H, Grützmacher AD, Valgas RA. Biology and fertility life table of *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae) in larvae of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Ann Entomol Soc Am. 2013;106: 791–798. doi:10.1603/AN13044
30. Nunes AM, Costa KZ, Faggioni KM, Costa M de LZ, Gonçalves R da S, Walder JMM, Garcia MS, Nava DE. Artificial diets for the rearing of adult and larvae of South-American fruit fly. Pesqui Agropecuária Bras. 2013;48: 1309–1314. doi:10.1590/S0100-

204X2013001000001

31. Haddad ML, Parra JRP, Moraes RCB. Métodos para estimar os limites térmico inferior e superior de desenvolvimento de insetos. 1 st. Piracicaba: FEALQ; 1999.
32. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2011.
33. Meyer JS, Ingersoll CG, McDonald LL, Boyce MS. Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs. Bootstrap techniques. *Ecology*. 1986;67: 1156–1166. doi:10.2307/1938671
34. Maia A de HN, Luiz AJB, Campanhola C. Statistical inference on associated fertility life table parameters using Jackknife technique: computational aspects. *J Econ Entomol*. 2000;93: 511–518. doi:10.1603/0022-0493-93.2.511
35. SAS Institute. SAS System - SAS/STAT. 2002.
36. Salles LAB. Bioecologia e ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus*. In: Malavasi A, Zucchi RA, editors. 1 st. Ribeirão Preto: Holos; 2000.
37. Davidowitz G, Nijhout HF. The physiological basis of reaction norms: the interaction among growth rate, the duration of growth and body size. *Integr Comp Biol*. 2004;44: 443–449. doi:10.1093/icb/44.6.443
38. Leon G, Higley LPP. DEGDAY: A program for calculating degree-days, and assumptions behind the degree-day approach. *Environ Entomol*. 1986;15: 999–1016. doi:10.1093/ee/15.5.999
39. Mohamed SA, Overholt DWA, Wharton RA, Lux SA. Effect of temperature on

- developmental time and longevity of *Psytalia cosyrae* (Hymenoptera: Braconidae). *Biocontrol Sci Technol*. 2006;16: 717–726. doi:10.1080/09583150600700016
40. Casas J, Pincebourde S, Mandon N, Vannier F, Poujol R, Giron D. Lifetime nutrient dynamics reveal simultaneous capital and income breeding in a parasitoid. *Ecology*. 2005;86: 545–554. doi:10.1890/04-0812
41. Poncio S. Bioecologia e técnicas de criação de parasitoides (Hymenoptera) nativos de três espécies de *Anastrepha* no Brasil e no México. Doutorado. Tese. Universidade Federal de Pelotas. 2015.
42. Aluja M, Sivinski J, Ovruski S, Guillén L, López M, Cancino J, et al. Colonization and domestication of seven species of native New World hymenopterous larval-prepupal and pupal fruit fly (Diptera: Tephritidae) parasitoids. *Biocontrol Sci Technol*. 2009;19: 49–79. doi:10.1080/09583150802377373
43. Pedigo LP, Zeiss MR. Developing a degree-day model for predicting insect development. In: Pedigo LP, Zeiss MR, editors. *Analysis in insect ecology and management*. 1 st. Iowa: John Wiley & Sons, Incorporated; 1996. pp. 67–74.
44. Pratisoli D, Parra JRP. Development and thermal requirements of *Trichogramma pretiosum* Riley, rearing in two tomato leafminer. *Pesqui Agropecuária Bras*. 2000;35: 1281–1288. doi:10.1590/S0100-204X2000000700001
45. Deng YX, Tsai JH. Development of *Lysiphlebia japonica* (Hymenoptera: Aphidiidae), a parasitoid of *Toxoptera citricida* (Homoptera: Aphididae) at five temperatures. *Fla Entomol*. 1998;81: 415. doi:10.2307/3495931
46. DeBach P. *Biological control by natural enemies*. 1 st. London: Cambridge University

Press; 1974.

Tabela 1. Duração do período de desenvolvimento ovo-adulto (média \pm erro padrão) de machos e fêmeas e razão sexual de *Doryctobracon areolatus* em diferentes temperaturas.

Umidade Relativa de 70 ± 10 % e fotofase de 12 horas.

Temperatura (°C)	Tempo de desenvolvimento (dias) ^a		Razão Sexual ^b
	Machos	Fêmeas	
18	41,31 \pm 0,35 a	44,26 \pm 0,15 a	0,41 a
20	29,00 \pm 0,26 b	32,47 \pm 0,14 b	0,48 a
25	19,25 \pm 0,19 c	21,85 \pm 0,23 c	0,49 a
28	17,86 \pm 0,16 d	19,61 \pm 0,20 d	0,55 a
30	17,40 \pm 0,45 d	19,26 \pm 0,20 d	0,60 a

^aValores seguidos pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste *t* ($P < 0,05$).

^bValores seguidos pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de comparação de proporções ($P < 0,05$).

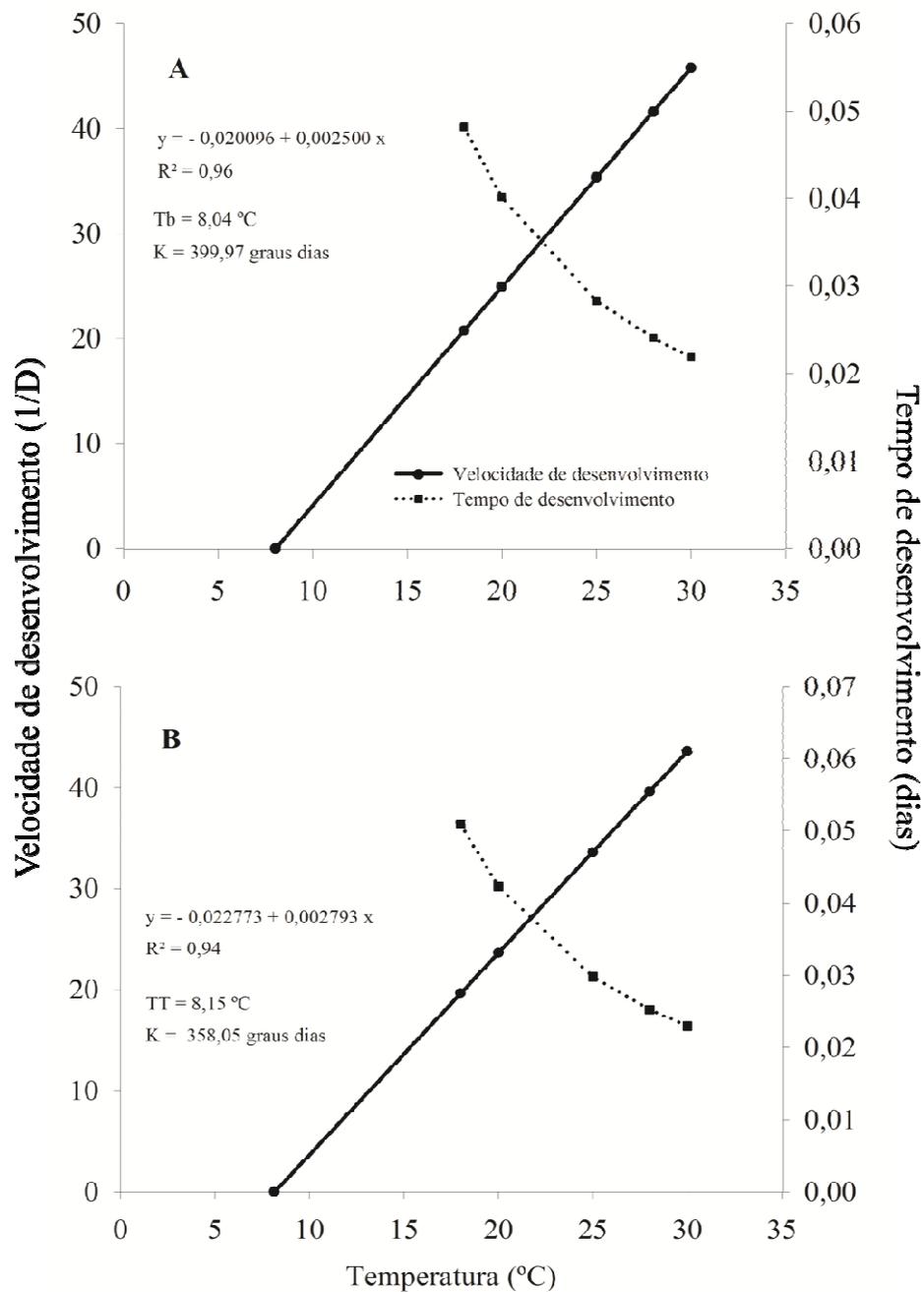


Fig 1. Curva de velocidade de desenvolvimento do período ovo-adulto de *Doryctobracon areolatus* em diferentes temperaturas. (A) Fêmeas, (B) Machos. Umidade relativa de $70 \pm 10 \%$ e fotofase de 12 horas.

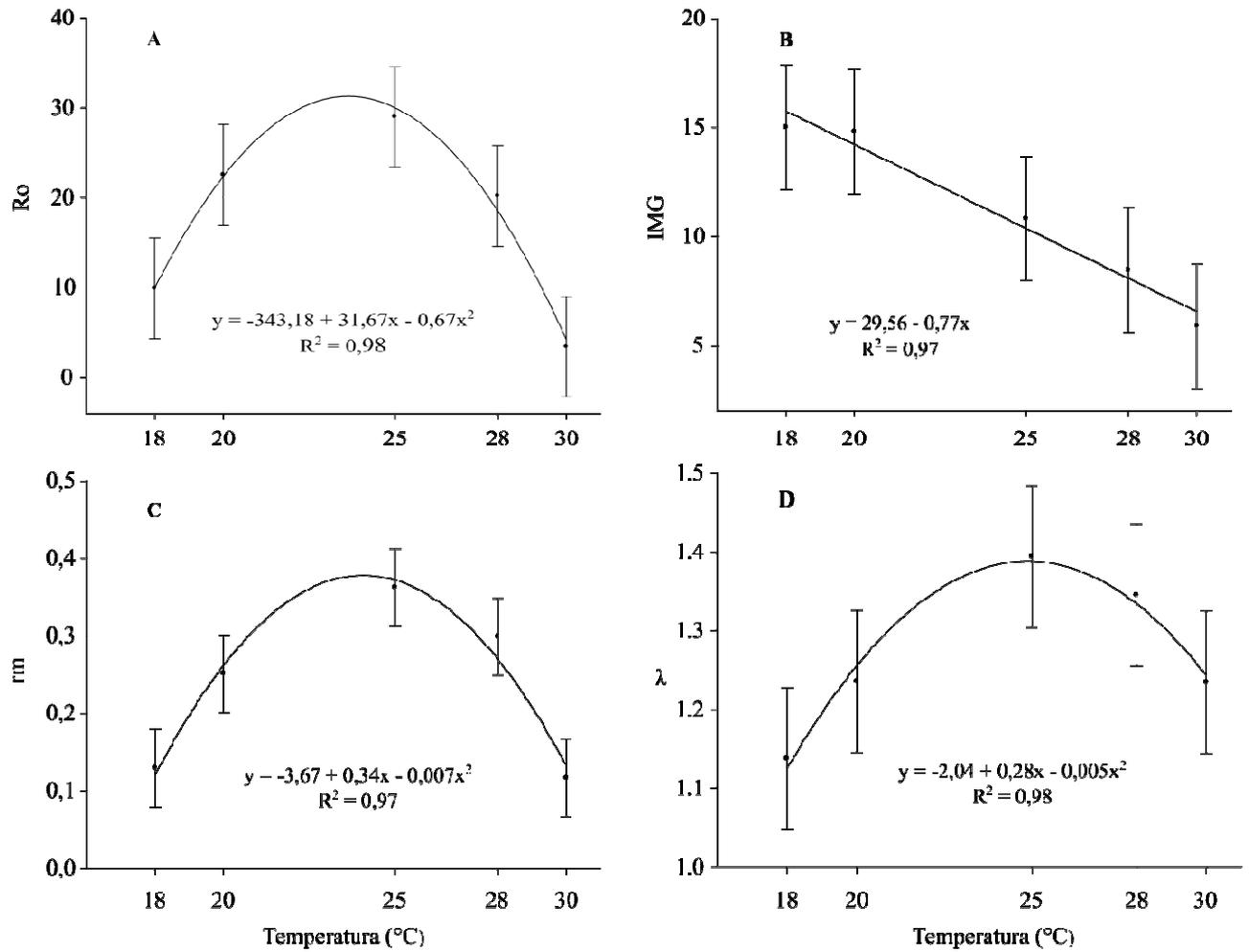


Fig 2. Modelos de regressão utilizadas para descrever a influência da temperatura nos parâmetros demográficos de *Doryctobracon areolatus*. (A) Taxa líquida de reprodução. (B) Taxa intrínseca de crescimento. (C) Taxa finita de aumento. (D) Intervalo médio entre gerações. Barras verticais representam os intervalos de confiança.

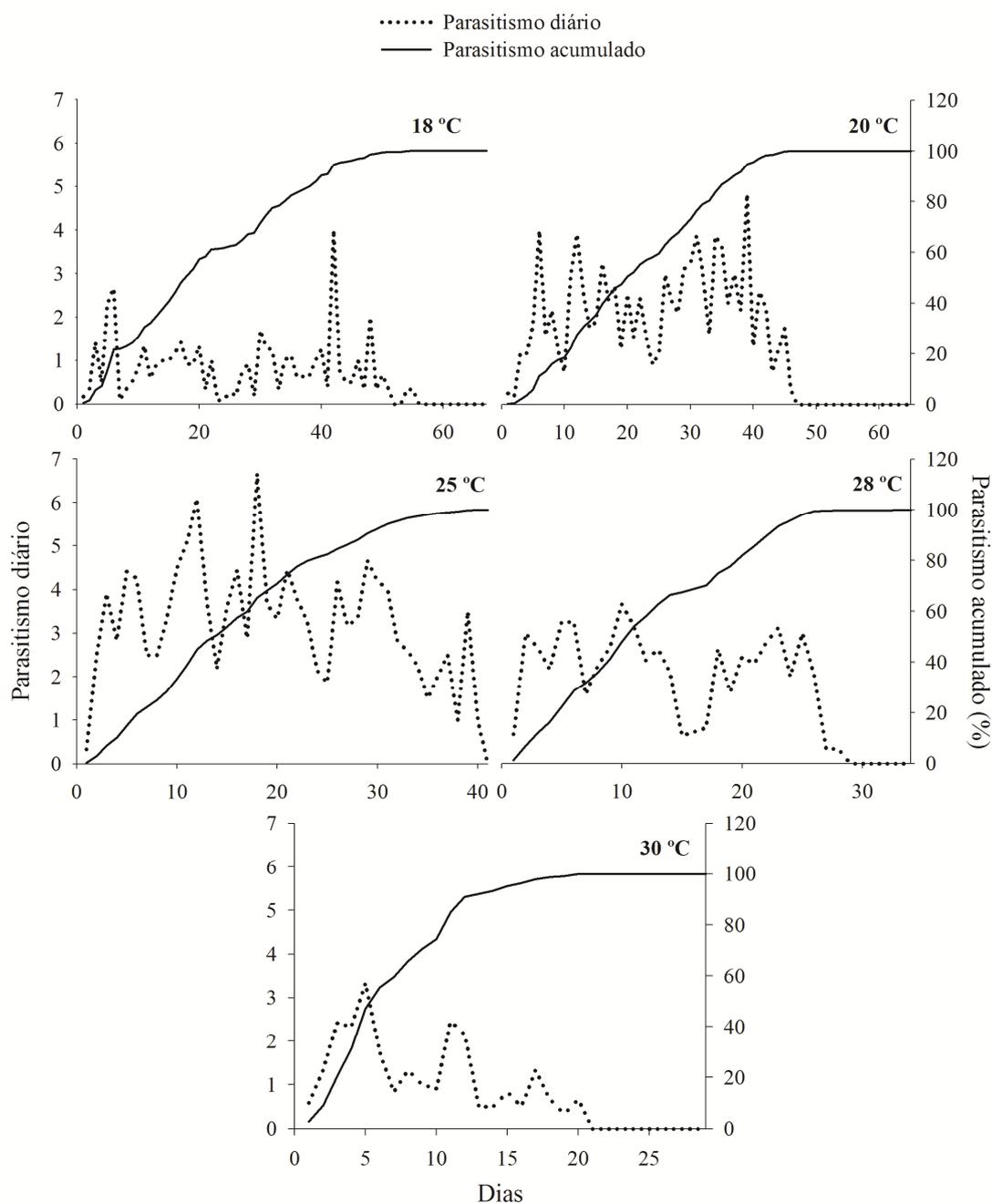


Fig 3. Parasitismo diário e acumulado de *Doryctobracon areolatus* em larvas de *Anastrepha fraterculus* em diferentes temperaturas. Umidade relativa de 70 ± 10 % e fotofase de 12 horas.

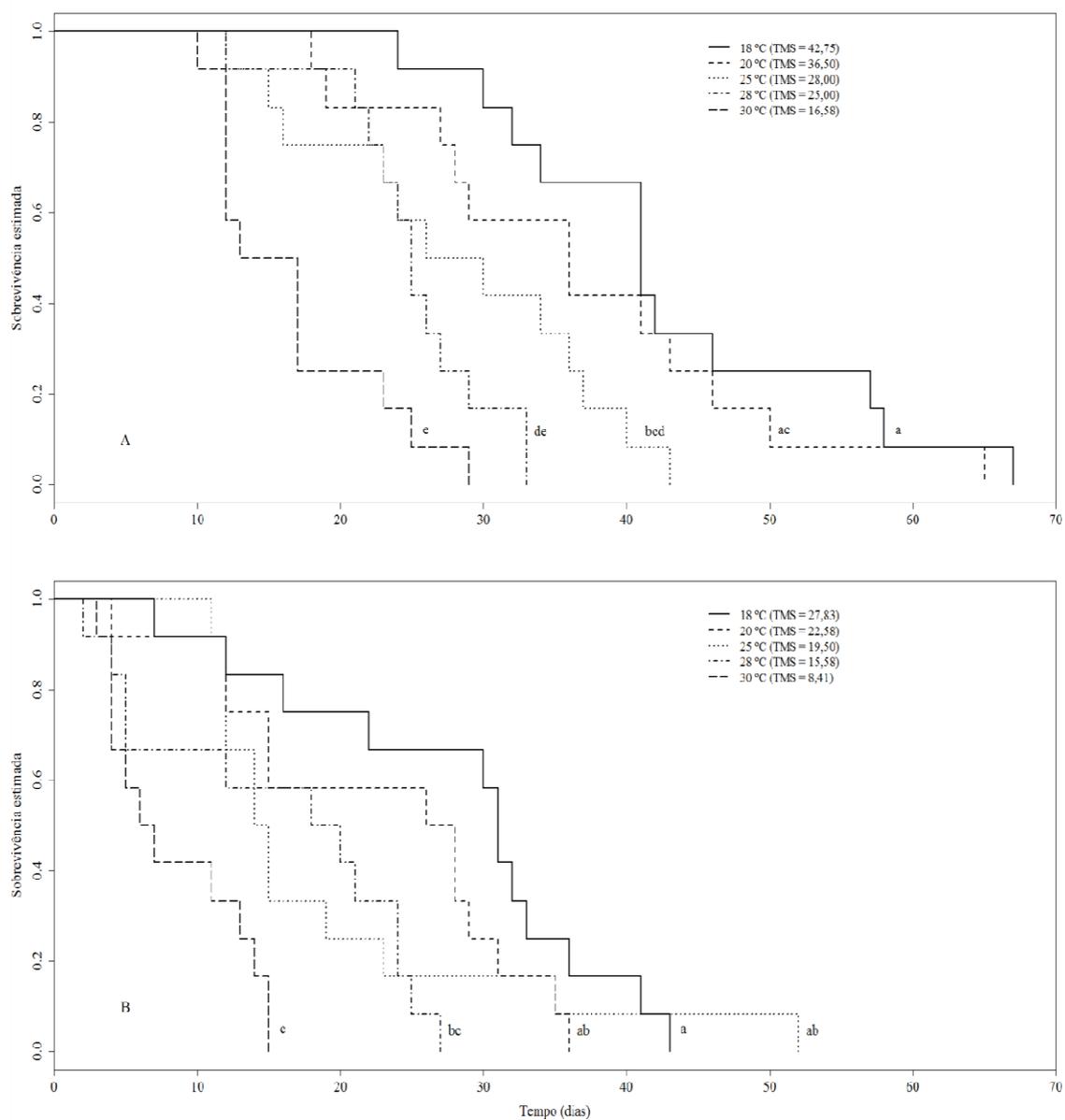


Fig 4. Curvas de sobrevivência de *Doryctobracon areolatus* mantidos em diferentes temperaturas. (A) Fêmeas, (B) Machos. Curvas seguidas pelas mesmas letras, para cada sexo, não diferem entre si pelo teste de log-rank. (TMS - tempo médio de sobrevivência).

Artigo 4 - Revista: Biological Control

5 - Artigo 4

Competição extrínseca entre o parasitoide nativo *Doryctobracon areolatus* e o exótico *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae): evidências comportamentais do reconhecimento heteroespecífico

Rafael S. Gonçalves^{a*}, Roberta Manica-Berto^b, Ricardo A. Valgas², Dori E. Nava^b

^a Departamento de Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, 96010-900, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil.

^b Laboratório de Entomologia, Embrapa Clima Temperado, 96001-970, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

*Autor correspondente

Destaques

- *Do. areolatus* utiliza pistas químicas para reconhecer frutos explorados por *Di. longicaudata*.
- A competição extrínseca altera o comportamento de forrageamento de *Do. areolatus* e *Di. longicaudata*.

Resumo

A capacidade de discriminar frutos hospedeiros explorados por espécies competidoras pode ser considerada uma habilidade importante para espécies de endoparasitoides, pois assim as fêmeas podem evitar que seus descendentes tenham que enfrentar ambientes de competição. O reconhecimento de pistas químicas por coespecíficos é comum entre algumas espécies de parasitoides de moscas-das-frutas. No entanto, informações sobre o reconhecimento destes sinais entre heteroespecíficos são escassas. Neste estudo nós investigamos a competição extrínseca entre *Do. areolatus* e *Di. longicaudata*, com o objetivo de verificar a capacidade de *Do. areolatus* reconhecer frutos previamente explorados por seu competidor *Di. longicaudata*. Nossos resultados demonstram que, por meio de sinais químicos, diferentemente de seu heteroespecífico, as fêmeas de *Do. areolatus* são capazes de discriminar frutos previamente explorados pelo seu competidor. Ademais, observamos que alguns dos eventos comportamentais envolvidos no processo de forrageamento destas espécies, sofrem alterações quantitativas quando as mesmas são expostas à frutos explorados pela espécie competidora.

Palavras-chave: Braconidae, *Anastrepha fraterculus*, sinais químicos

Extrinsic competition between the native parasitoid *Doryctobracon areolatus* and exotic *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae): behavioral evidences of heterospecific recognition

Highlights

- *Do. areolatus* use chemical cues to recognize fruits exploited by *Di. longicaudata*.
- Extrinsic competition changes the foraging behavior of *Do. areolatus* and *Di. longicaudata*.

Abstract

The ability to discriminate host fruits exploited by competing species can be considered an important skill for species of endoparasitoids, because the females can avoid that their offspring have to face competition environments. Recognition of chemical cues by conspecifics is common among some species of parasitoids of fruit flies. However, information about the recognition of these cues between heterospecific are scarce. In this study we investigated the extrinsic competition between *Do. areolatus* and *Di. longicaudata*, in order to verify the ability to *Do. areolatus* recognize fruits previously exploited by *Di. longicaudata*. Our results demonstrate that, through chemical signals, unlike its heterospecific, the females of *Do. areolatus* are able to discriminate fruits previously exploited by its competitor. Furthermore, we observed that some of the behavioral events involved in the host foraging process of these species undergo quantitative changes when they are exposed to fruit exploited by competitor species.

Key words: Braconidae, *Anastrepha fraterculus*, chemical cues

1. Introdução

A escolha por uma ou mais espécies de parasitoides em um programa de controle biológico aplicado de mosca-das-frutas deve levar em consideração, entre outros fatores, a capacidade de coexistência entre as espécies, as quais passarão a competir pelo mesmo recurso. Esta característica torna-se ainda mais relevante quando uma das espécies é exótica, pois sua liberação em um ambiente pode deslocar as espécies nativas presentes (Harvey et al., 2013; Miranda et al., 2015; Wang et al., 2008). A competição envolvendo parasitoides pode ser intrínseca, quando ocorre dentro do hospedeiro e esta relacionada com a interação entre as fases imaturas, ou extrínseca, quando ocorre externamente ao hospedeiro e neste caso diz respeito exclusivamente a fase adulta durante a busca hospedeira (Harvey et al., 2013).

No Brasil, existem diversas espécies nativas de parasitoides de moscas-das-frutas, sendo que *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) tem sido a espécie mais frequente e relacionada ao parasitismo especialmente larvas de *Anastrepha* spp. e de *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae) (Canal e Zucchi, 2000; Nunes et al., 2012).

O parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) foi introduzido no Brasil para ser utilizado em programas de controle biológico de diversas espécies do gênero *Anastrepha* Schiner e *C. capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) (Carvalho, 2005). Esta espécie destaca-se por sua relativa facilidade de criação e rápida adaptação aos meios naturais onde é liberada (Ovruski et al., 2000).

Estudos demonstram que em competições interespecíficas os imaturos de *Di. longicaudata* geralmente superam seus competidores (Wang et al. 2008; Paranhos et al. 2013; Miranda et al. 2015). Paranhos et al. (2013) observaram que em ensaios com parasitismo subsequente, *Di. longicaudata* suprimiu o desenvolvimento da espécie nativa *Do. areolatus*. Miranda et al. (2015) avaliaram alguns eventos comportamentais e características morfológicas relacionadas

a busca hospedeira em duas espécies de parasitoides e concluíram que *D. longicaudata* é capaz de superar *Doryctobracon crawfordi* (Viereck, 1911) (Hymenoptera: Braconidae). Estes autores sugerem que em termos de controle biológico aumentativo, na maioria dos casos, as libertações apenas de *D. longicaudata* seriam mais eficaz do que a liberação conjunta de ambas as espécies

Em contrapartida, para *Do. areolatus* os estudos de competição interespecífica tem demonstrado desvantagem em relação a outras espécies, como *Di. longicaudata* (Paranhos et al., 2013) e *Utetes anastrephae* (Viereck, 1913) (Hymenoptera: Braconidae) (Aluja et al., 2013). Entretanto, todos estes estudos tem sido realizados com foco na competição intrínseca, ou seja, considerando apenas a competição das fases imaturas dentro do hospedeiro.

Para algumas espécies de parasitoides sabe-se que as fêmeas são capazes de discriminar frutos hospedeiros explorados por heteroespecíficos daqueles não explorados. A espécie *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) dificilmente parasita hospedeiros já parasitados por *Fopius arisanus* (Sonan, 1932) (Hymenoptera: Braconidae) (Wang and Messing, 2003a) enquanto que *U. anastrephae* mostrou-se menos propenso a parasitar um hospedeiro previamente parasitado por *Do. areolatus* (Aluja et al., 2013).

Esta discriminação por parte dos parasitoides pode ser por meio da utilização de estímulos físicos ou químicos na busca hospedeira (Godfray, 1994). Sinais químicos de hospedeiros de parasitoides e dos substratos (sobre os quais os hospedeiros se desenvolvem) são pistas importantes para a orientação durante o forrageamento (Carrasco et al., 2005; Segura et al., 2012; Stuhl et al., 2011). Estas pistas químicas podem ser voláteis de frutos induzidos (Pérez et al., 2013) ou ainda compostos químicos deixados pelas moscas, como feromônio de marcação ou fezes (Rousse et al., 2007).

O reconhecimento dos feromônios de marcação hospedeira por coespecíficos é comum e difundido em algumas espécies de parasitoides de mosca-das-frutas, como por exemplo em

Diachasma alloem (Muesebeck, 1956) (Hymenoptera: Braconidae) (Stelinski et al., 2010). Contudo, poucas são as informações sobre o reconhecimento por heteroespecíficos, especialmente considerando a interação entre as espécies *Di. longicaudata* e *Do. areolatus*.

Neste sentido, em um contexto de competição extrínseca, e baseado nas evidências relatadas para outras espécies, nossa hipótese é de que *Do. areolatus* possui a capacidade de reconhecer hospedeiros previamente explorados por *Di. longicaudata*. Assim, visando testar essa hipótese, o trabalho objetivou avaliar duas etapas presentes no comportamento de forrageamento dos parasitoides larvais *Di. longicaudata* e *Do. areolatus*, tendo como hospedeiro *A. fraterculus*. Para tanto, foram realizados ensaios comportamentais visando: (i) avaliar as respostas olfativas e, (ii) o comportamento de forrageamento sobre frutos em condições de laboratório.

2. Material e Métodos

2.1. Material biológico

Os insetos utilizados neste estudo foram obtidos das colônias de criação do Laboratório de Entomologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (Embrapa-CPACT), em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. A colônia de *A. fraterculus* foi mantida conforme a metodologia descrita por Nunes et al. (2013). Para criação de *Di. longicaudata* foram utilizados os procedimentos propostos por Carvalho e Nascimento (2002), porém utilizando como hospedeiro larvas de *A. fraterculus*.

Para *Do. areolatus*, os adultos foram mantidos em gaiolas plásticas teladas (40 cm × 27 cm × 23 cm - l × w × h) e alimentados com solução aquosa de mel na concentração de 30 % e água. Para multiplicar os insetos ofertou-se larvas de segundo ínstar de *A. fraterculus* (6 dias de idade). As larvas foram ofertadas aos parasitoides por 24 horas em unidades de parasitismo, constituídas por uma placa de acrílico (4 cm de diâmetro × 0,2 cm de altura)

envolta em tecido *voile*. Ao final do período de exposição as larvas foram transferidas para frascos contendo dieta artificial conforme descrito por Nunes et al. (2013). Com a formação dos primeiros pupários, aos 12 dias de vida das larvas, os mesmos juntamente com as demais larvas que ainda se encontravam no terceiro ínstar, foram transferidos para caixas de acrílico contendo vermiculita. Todas as criações de manutenção, bem como, os bioensaios foram mantidos em salas climatizadas com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa do ar de 60 ± 10 % e fotofase de 12 horas.

2.2. Bioensaios olfatométricos

A resposta olfativa dos parasitoides braconídeos à voláteis oriundos de frutos hospedeiros foi observada em olfatômetro tipo "Y" de 1,5 cm de diâmetro, com braços secundários e principal de 10 e 15 cm de comprimento, respectivamente. Na extremidade de cada braço secundário foi conectado, em série, um conjunto de três câmaras de vidro (500 mL). A câmara localizada logo após a saída do olfatômetro foi utilizada para conter as amostras a serem testadas. As câmaras seguintes continham água destilada (para umidificação do ar filtrado) e carvão ativado (granulometria: 1-2 mm), respectivamente. Rotômetros foram conectados a entrada de ar de cada um dos braços secundários para calibrar o fluxo de ar, que foi de $150 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (determinado em testes preliminares).

Na extremidade do braço principal, onde os insetos eram introduzidos no sistema, conectou-se uma bomba de vácuo, responsável por gerar fluxo de ar no sentido dos braços secundários para o principal. Os testes foram conduzidos em sala climatizadas (temperatura: 25 ± 2 °C, umidade relativa: 60 ± 10 %) com iluminação homogênea proporcionada por lâmpadas fluorescentes entre 8 e 16 horas, haja visto que neste período os insetos encontravam-se em maior atividade.

As amostras testadas consistiram de frutos de goiaba (*Psidium guajava* L., Myrtaceae), em estágio inicial de maturação, submetidos as seguintes condições: frutos sadios (FS), frutos infestados (FI) com larvas de segundo ínstar de *A. fraterculus* e frutos infestados com larvas de segundo ínstar de *A. fraterculus* e explorados por heteroespecíficos [(FE_{Da} - explorado por *Do. areolatus*, FE_{DI} - explorado por *Di. longicaudata*). A resposta olfativa das fêmeas de cada espécie de parasitoide foi avaliada, submetendo-se as mesmas as seguintes combinações de amostras: A) ar limpo × FI, B) FS × FI e C) FI × FE.

Para obtenção das amostras FI e FE, frutos de goiaba vermelha foram expostos para 10 fêmeas de *A. fraterculus* com 20 dias de idade, sexualmente maduras e presumidamente acasaladas, por um período de 24 horas. Logo após, os frutos foram acondicionados em copos plásticos cobertos com tecido *voile*. Após seis dias da infestação, a obtenção dos frutos das amostras FE, foi realizada expondo-se os frutos para fêmeas de *Do. areolatus* (10 dias de idade) e de *Di. longicaudata* (7 dias de idade) sexualmente maduras, presumidamente acasaladas e com experiência de parasitismo. O período de exposição dos frutos foi de 24 horas.

As avaliações iniciaram após as combinações de amostras terem sido preparadas no olfatômetro e, a estabilização do fluxo de ar em 150 mL.min⁻¹. A inserção de cada uma das fêmeas testadas, foi realizada pela abertura na porção distal do braço principal. Para isto o tubo ligado a bomba de sucção foi desconectado e o inseto inserido no olfatômetro. Logo após a movimentação do inseto (cerca de 1 cm) o fluxo de ar foi re-estabelecido. Cada fêmea foi observada durante 10 minutos, nos quais foram registradas a escolha final, bem como, o tempo de latência (tempo que a fêmea permaneceu no braço escolhido) em cada escolha. A escolha final do parasitoide pelo tratamento foi considerada após o cruzamento da metade do comprimento do braço secundário e de sua permanência por pelo menos 3 minutos (180 segundos). Após o encerramento do tempo de teste, a fêmea utilizada foi descartada.

Para evitar uma possível marcação e consequente interferência na resposta das fêmeas para um dos braços, foi adotada a troca de olfatômetro a cada 5 repetições. Além disso, entre cada repetição o olfatômetro foi rotacionado em 180°. Ao final de cada bioensaio, os olfatômetros e as câmaras que continham as amostras foram lavadas com detergente Extran® na concentração (v/v) de 20% em água destilada, e posteriormente com acetona e n-hexano, sendo em seguida secos em estufa a 200°C.

Para cada espécie de parasitoide e combinação de amostras, foram avaliadas 30 fêmeas (repetições), as quais foram utilizadas uma única vez para evitar aprendizagem associativa (Vet, 1982). As fêmeas não responsivas, foram substituídas e descartadas das análises. Em relação a análise estatística, os dados de escolha, para cada combinação de amostras, foram comparadas pelo teste de qui-quadrado ($\alpha = 0,05$). Os dados referentes ao tempo de latência foram analisados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro Wilk, à homocedasticidade pelo teste de Hartley e a independência dos resíduos por análise gráfica. Os dados foram então submetidos a análise de variância ($\alpha = 0,05$) e as médias comparadas pelo teste de "t" ($\alpha = 0,05$). Os procedimentos estatísticos foram realizados com o auxílio do software R (R Development Core Team, 2015).

2.3. Bioensaios comportamentais

Visando avaliar o comportamento de forrageamento de *Do. areolatus* e *Di. longicaudata*, em situação de competição e não competição, este estudo foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa, denominada de estudo qualitativo, foram determinados e caracterizados os principais eventos comportamentais envolvidos no processo de forrageamento hospedeiro de *Do. areolatus* e *Di. longicaudata* quando na presença de frutos infestados com larvas de *A. fraterculus*. A segunda etapa do estudo consistiu na quantificação dos eventos comportamentais de ambas espécies, em situação de não competição (FI - frutos infestados

com larvas de *A. fraterculus*) e de competição (FE - frutos infestados com larvas de *A. fraterculus* e explorados por uma espécie competidora). Os testes foram realizados em salas climatizadas com temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12h.

Em ambas as etapas foram utilizadas fêmeas de *Do. areolatus* e *Di. longicaudata*, com 10 e 7 dias de idade, respectivamente, sexualmente maduras, presumidamente acasaladas, e sem experiência de parasitismo. As observações foram realizadas em uma arena de vidro (20 cm de diâmetro \times 20 cm de altura) com fêmeas individualizadas. Cada fêmea foi avaliada uma única vez, e então descartada, e somente aquelas que exploraram o fruto tiveram seus eventos comportamentais registrados. Para registrar o tempo de cada evento comportamental foi utilizado o software Etholog (versão 2.25). Os eventos comportamentais, obtidos no teste qualitativo, foram descritos em ordem de acontecimento.

Para cada uma das etapas do experimento 2, foram avaliadas 30 fêmeas de cada espécie. As informações obtidas no estudo qualitativo foram utilizadas para descrever o comportamento de forrageamento de cada uma das espécies. Os dados referentes ao tempo de cada evento comportamental foram analisados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro Wilk, à homocedasticidade pelo teste de Hartley e a independência dos resíduos por análise gráfica. Entretanto, verificou-se que os mesmos não atenderam aos pressupostos de uma análise paramétrica, e, portanto os dados foram submetidos a um teste não paramétrico. Assim os tratamentos (FI e FE) foram comparados, dentro de cada evento comportamental, pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$). Todos os procedimentos estatísticos foram realizados com o auxílio do software R (R Development Core Team, 2015).

3. Resultados

3.1. Bioensaios olfatométricos

Os resultados apresentados nas figuras 1 e 2, demonstram que nosso sistema de olfatometria foi bem calibrado, pois na combinação ar limpo vs. fruto infestado, o número de insetos que apresentaram preferência por fruto infestado foi significativamente maior (*Da. areolatus*: $\chi^2 = 12,90$; gl = 1; $p < 0,001$ / *Di. longicaudata*: $\chi^2 = 18,58$; gl = 1; $p < 0,0001$). Ambas espécies de parasitoides foram capazes de distinguir os voláteis de frutos infestados e frutos sadios, pois a maioria dos insetos demonstrou preferência significativamente maior por frutos infestados (*Da. areolatus*: $\chi^2 = 8,83$; gl = 1; $p = 0,002$ / *Di. longicaudata*: $\chi^2 = 4,96$; gl = 1; $p = 0,02$) (Fig. 1 e 2).

Fêmeas de *Do. areolatus* foram capazes de discriminar os voláteis oriundos por frutos apenas infestados daqueles explorados por seu heteroespecífico *Di. longicaudata* ($\chi^2 = 9,03$; gl = 1; $p = 0,002$) (Fig. 1). Em relação ao tempo de latência, observamos que o mesmo foi significativamente superior no braço que continha os voláteis oriundos de frutos infestados ($F = 5,90$; gl = 1; $p = 0,02$) (Tabela 1). No que diz respeito a *Di. longicaudata* não detectamos diferença significativa entre o número de fêmeas observadas no braço contendo voláteis de frutos infestados e aquele com frutos explorados por *Do. areolatus* ($\chi^2 = 2,37$; gl = 1; $p = 0,12$) (Fig. 2). Ademais, também não foi verificada diferença significativa entre os tempos de latência ($F = 2,69$; gl = 1; $p = 0,11$) (Tabela 1).

3.2. Bioensaios comportamentais

Observamos que o comportamento de forrageamento de *Do. areolatus* envolve maior número de eventos que o de *Di. longicaudata* (Tabela 2). Os eventos *Parasitismo* e *Marcação*, considerados pós forrageamento, também estão descritos na tabela 1, porém não foram alvos de quantificação na segunda etapa do estudo.

Os tempos médios de cada evento comportamental de *Do. areolatus* são apresentados na tabela 3. Não verificamos diferença significativa entre os tratamentos para os eventos comportamentais, *Busca do fruto* ($\chi^2 = 0,73$; gl = 1; p = 0,393), *Caminhamento* ($\chi^2 = 0$; gl = 1; p = 0,949) e *Caminhamento e antenação* ($\chi^2 = 0,40$; gl = 1; p = 0,529). Para os eventos de *Parada* ($\chi^2 = 16,36$; gl = 1; p = 0) e *Prova* ($\chi^2 = 5,64$; gl = 1; p = 0,018) o tempo foi significativamente superior quando as fêmeas foram expostas à frutos explorados pelo competidor *Di. longicaudata*. Já para o evento de *Movimento em círculo* as fêmeas despenderam significativamente mais tempo quando expostas à frutos apenas infestados com larvas de *A. fraterculus* ($\chi^2 = 5,54$; gl = 1; p = 0,019).

No que diz respeito a *Di. longicaudata*, verificamos que para os eventos *Busca do fruto* ($\chi^2 = 3,68$; gl = 1; p = 0,055) e *Caminhamento e Antenação* ($\chi^2 = 2,91$; gl = 1; p = 0,088) não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 4). No entanto, observamos que o tempo para execução dos eventos de *Parada* ($\chi^2 = 13,16$; gl = 1; p = 0) e *Prova* ($\chi^2 = 4,14$; gl = 1; p = 0,042) foram significativamente superiores quando as fêmeas foram expostas à frutos explorados pelo heteroespecífico *Do. areolatus* (Tabela 4).

4. Discussão

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que *Do. areolatus* é capaz de evitar frutos explorados pelo heteroespecífico *Di. longicaudata*, por meio do reconhecimento de voláteis oriundos destes frutos (Fig. 1). Contudo, o mesmo não foi observado para fêmeas de *Di. longicaudata*, as quais foram igualmente atraídas pelos voláteis de frutos apenas infestados com larvas de *A. fraterculus* e aqueles explorados por *Do. areolatus* (Fig. 2). Além disso, verificamos que o comportamento de forrageamento de ambas as espécies de parasitoides foi quantitativamente alterado quando as fêmeas foram colocadas em situação de competição (exposição à fruto explorado pelo heteroespecífico) (Tabelas 3 e 4).

No processo de competição extrínseca, que ocorre fora do corpo do hospedeiro, as espécies competidoras podem evitar ou reduzir a concorrência por hospedeiros por meio de diferentes estratégias. Dessa forma, as espécies de inimigos naturais podem se dispersar no ambiente e explorar outros nichos (Amarasekare, 2003), ou em casos mais drásticos, passar a utilizar outra espécie como hospedeiro (Messing e Wang, 2009). Outra estratégia também utilizada por parasitoides é o forrageamento condicional, onde as fêmeas identificam e evitam os hospedeiros já parasitados (Sivinski e Aluja, 2012).

Nossos resultados indicam que o forrageamento condicional é uma estratégia utilizada por *Do. areolatus* para evitar colocar sua descendência em situação de competição com *Di. longicaudata* (Fig. 1). Além disso, considerando que em bioensaios em olfatômetro apenas os estímulos químicos são avaliados, podemos concluir que os estímulos utilizados por *Do. areolatus* para discriminar frutos hospedeiros já explorados por heteroespecíficos, são pistas químicas. No entanto, não podemos afirmar a origem exata de tais compostos, pois esta etapa não foi objeto de estudo do presente trabalho. Uma possível fonte destes sinais químicos é o próprio fruto hospedeiro, que pode emitir compostos voláteis induzidos pelo inseto hospedeiro (Kaplan, 2012). Outra possibilidade são os compostos derivados da espécie competidora, como por exemplo feromônio de marcação ou mesmo excrementos deixados pelas fêmeas de *Di. longicaudata* durante a exploração do fruto (Cancino et al., 2012; Wang e Messing, 2003a).

A identificação de hospedeiros explorados por co-específicos por meio do reconhecimento de feromônios de marcação é comum em algumas espécies de parasitoides de moscas-das-frutas, como por exemplo em *Diachasma alloeum* (Muesebeck, 1956) (Hymenoptera: Braconidae) (Stelinski et al., 2010). Entretanto, há poucas informações sobre o reconhecimento de feromônios de marcação por heteroespecíficos (Sivinski e Aluja, 2012). De acordo com (Wang e Messing, 2003a) o parasitoide *Di. tryoni* é capaz de reconhecer

larvas hospedeiras oriundas de ovos parasitados por *Fopius arisanus* (Sonan, 1932) (Hymenoptera: Braconidae). O mesmo é relatado para o parasitoide de pupas *Coptera haywardi* (Loiácono, 1981) (Hymenoptera: Braconidae) que é capaz de reconhecer hospedeiros previamente parasitados por *Di. longicaudata* (Cancino et al., 2012).

O fato das fêmeas de *Di. longicaudata* não terem discriminado os voláteis oriundos de frutos infestados daqueles oriundos de frutos explorados pelo heteroespecífico *Do. areolatus*, pode estar relacionado a ampla gama de hospedeiros utilizados por esta espécie (Clancy et al., 1952; Leyva et al., 1991; Meirelles et al., 2013; Sivinski, 1991; Sivinski et al., 1997; Vargas e Nishida, 1985; Wong e Ramadan, 1987). Estudos demonstram que *Di. longicaudata* se orienta por meio de estímulos gerais, tais como, voláteis liberados pelos frutos hospedeiros (Carrasco et al., 2005; Stuhl et al., 2012), voláteis liberados por fungos associados com a decomposição dos frutos hospedeiros e compostos químicos gerais, aparentemente emitidos por todas as espécies de tefritídeos (Duan e Messing, 2000; Messing e Jang, 1992; Stuhl et al., 2011).

No que diz respeito ao comportamento de forrageamento de *Do. areolatus* e *Di. longicaudata*, observamos que de maneira geral os eventos comportamentais são semelhantes, porém algumas diferenças foram observadas. Os primeiros eventos comportamentais observados para *Di. longicaudata* foram a busca do fruto e o caminhamento e antenação sobre o mesmo. Para *Do. areolatus* além destes, verificamos que as fêmeas realizam caminhamento nos frutos sem tocar as antenas. Possivelmente, durante estes eventos as fêmeas de ambas as espécies se utilizem de compostos químicos para localização mais precisa dos hospedeiros, conforme já descrito para as espécies *F. arisanus*, *Aganaspis pelleranoi* (Bréthes, 1924) (Hymenoptera: Figitidae) e *Odontosema albinerve* Kieffer, 1909 (Hymenoptera: Figitidae) (Guimarães e Zucchi, 2004; Wang e Messing, 2003b). Para estes eventos comportamentais o

tempo despendido pelas fêmeas para a execução dos mesmos não diferiu entre os tratamentos (FI e FE) (Tabelas 3 e 4).

Após os movimentos de caminhamento e antenação, e possivelmente localização de um ponto com hospedeiros, as fêmeas de ambas as espécies se mantiveram imóveis com as antenas dispostas perpendicularmente ao corpo. Consideramos que a partir deste momento as fêmeas passam a utilizar os sinais vibratórios oriundos da movimentação realizada pelas larvas. Segundo Sivinski e Aluja (2012) a utilização de tais vibrações é uma etapa importante no processo de forrageamento de parasitoides de moscas-das-frutas, já tendo sido observada em outras espécies como por exemplo *Di. tryoni*, *Di. longicaudata* e *D. alloeum* (Duan e Messing, 2000; Glas e Vet, 1982; Lawrence, 1981).

Durante a etapa de parada, ambas as espécies observadas, expenderam maior tempo nos frutos já explorados por heteroespecíficos. Possivelmente o maior tempo gasto se deveu a redução dos sinais vibratórios, pois larvas parasitadas tem sua mobilidade diminuída (Glas e Vet, 1982; Lawrence, 1981). Contudo, é possível que pistas químicas também estejam envolvidas e por este motivo novos estudos necessitam ser desenvolvidos. Logo após o evento de parada, apenas as fêmeas de *Do. areolatus* executaram movimentos circulares, sobre seu próprio eixo, tocando as antenas no fruto, indicando que tais estruturas também podem estar envolvidas no reconhecimento dos sinais vibratórios.

Para a espécie *F. arisanus* o movimento de prova é relacionado a detecção dos hospedeiros no interior dos frutos (Wang e Messing, 2003b). Possivelmente a realização deste tipo de comportamento tenha a mesma função para *Do. areolatus* e *Di. longicaudata*. Durante a quantificação, verificamos que o tempo gasto com o evento de prova foi significativamente superior quando as fêmeas de ambas as espécies foram expostas aos frutos explorados por seus competidores (Tabelas 3 e 4). De acordo com Greany et al., (1977) *Di. longicaudata* possui sensilas quimiorreceptoras no ovipositor, as quais podem estar relacionadas com a

detecção de substâncias deterrentes de oviposição presentes na hemolinfa dos hospedeiros indicando. Esta função já foi descrita para o parasitoide *Leptopilina heterotoma* (Thomson, 1862) (Hymenoptera: Figitidae) que por meio de seu ovipositor também é capaz de discriminar hospedeiros de acordo com a densidade de ovos da espécie competidora (Ruschioni et al., 2015).

Logo após o evento de prova, observou-se que as fêmeas de ambas as espécies permaneceram imóveis e com o ovipositor no interior do fruto. Este tipo de comportamento, pode configurar o parasitismo (deposição de ovos no interior do hospedeiro) ou uma etapa avançada da prova em que as fêmeas introduzem o ovipositor no corpo do hospedeiro para uma avaliação mais detalhada sobre as condições do hospedeiro, como por exemplo, a presença de imaturos de um heteroespecífico. Cabe considerar, que a diferenciação entre estas duas possibilidades é difícil de ser esclarecida sem intervir no comportamento natural dos parasitoides. No entanto, se o evento que denominamos de parasitismo fosse na verdade uma extensão do evento de prova, deveríamos ter observado diferença significativa entre os tratamentos, o que não foi verificado.

Durante as avaliações de *Do. areolatus* observou-se que algumas fêmeas apresentaram comportamento de arraste do ovipositor após o evento de parasitismo. Nosso estudo não permite afirmar que o arraste do ovipositor possa ser considerado uma espécie de marcação, entretanto, se esta hipótese for verdadeira, é provável que as fêmeas depositem algum tipo de secreção deterrente de oviposição.

Neste contexto, concluímos que fêmeas da espécie *Do. areolatus* são capazes de reconhecer frutos hospedeiros explorados pelo competidor *Di. longicaudata* por meio do reconhecimento de sinais químicos. Além disso, ambas as espécies alteram quantitativamente alguns dos eventos comportamentais durante o processo de forrageamento hospedeiro quando na presença de frutos explorados por seus respectivos competidores.

As implicações práticas dos nossos resultados dizem respeito a estratégia de liberação de ambas as espécies, especialmente, se a possibilidade de utilizá-las conjuntamente em um programa de manejo de moscas-das-frutas for considerada. Um dos pontos cruciais para que a implementação de programas de manejo de tefritídeos seja bem sucedida é a atuação em uma ampla área, pois o controle populacional apenas nas áreas comerciais é ineficiente devido a re-entrada de insetos que se multiplicam em áreas nativas.

De acordo com Zhang e Schlyter (2004) o aumento na diversidade de compostos voláteis em um determinado ambiente está diretamente relacionado com aumento da diversidade de espécies de plantas. Assim, ambientes de mata nativa apresentam maior complexidade de voláteis do que os agroecossistemas convencionais. Dessa forma, partindo do princípio de que fêmeas de *Do. areolatus* apresentam maior capacidade de discriminação e busca hospedeira, pois evitaram frutos hospedeiros explorados pelo heteroespecífico, podemos sugerir que o desempenho desta espécie em áreas de mata nativa seria superior ao de *Di. longicaudata*. Neste sentido, uma opção para a utilização conjunta destas espécies seria a liberação de *Di. longicaudata* em pomares comerciais e *Do. areolatus* em áreas nativas.

5. Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo financiamento deste estudo.

6. Referências

Aluja, M., Ovruski, S.M., Sivinski, J., Córdova-García, G., Schliserman, P., Nuñez-Campero, S.R., Ordano, M., 2013. Inter-specific competition and competition-free space in the

- tephritid parasitoids *Utetes anastrephae* and *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae). *Ecol. Entomol.* 38, 485–496. doi:10.1111/een.12039
- Amarasekare, P., 2003. Competitive coexistence in spatially structured environments: a synthesis. *Ecol. Lett.* 6, 1109–1122. doi:10.1046/j.1461-0248.2003.00530.x
- Canal, N.A., Zucchi, R.A., 2000. Parasitóides - Braconidae, in: *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado*. Malavasi, A.; Zucchi R.A., Ribeirão Preto, pp. 119–126.
- Cancino, J., Liedo, P., Ruiz, L., López, G., Montoya, P., Barrera, J.F., Sivinski, J., Aluja, M., 2012. Discrimination by *Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae) of hosts previously attacked by conspecifics or by the larval parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Biocontrol Sci. Technol.* 22, 899–914. doi:10.1080/09583157.2012.696088
- Carrasco, M., Montoya, P., Cruz-lopez, L., Rojas, J.C., 2005. Response of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) to mango fruit volatiles. *Environ. Entomol.* 34, 576–583. doi:10.1603/0046-225X-34.3.576
- Carvalho, R. da S., 2005. Avaliação das liberações inoculativas do parasitóide exótico *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) em pomar diversificado em Conceição do Almeida, BA. *Neotrop. Entomol.* 34, 799–805. doi:10.1590/S1519-566X2005000500012
- Carvalho, R. S., Nascimento, S. S., 2002. Criação e utilização de *Diachasmimorpha longicaudata* para o controle biológico de moscas-das-frutas (Tephritidae). In: *Controle Biológico no Brasil: Parasitoides e Predadores*. Parra, J.R.P; Corrêa-Ferreira, B.S.; Bento, J.M.S, Barueri, pp. 165–177.
- Clancy, D.W., Marucci, P.E., Dresner, E., 1952. Importation of natural enemies to control the oriental fruit fly in Hawaii. *J. Econ. Entomol.* 45, 85–90. doi:10.1093/jee/45.1.85

- Duan, J.J., Messing, R.H., 2000. Effects of host substrate and vibration cues on ovipositor-probing behavior in two larval parasitoids of tephritid fruit flies. *J. Insect Behav.* 13, 175–186. doi:10.1023/A:1007780029320
- Glas, P.C.G., Vet, L.E.M., 1982. Host-habitat location and host location by *Diachasma Alloeum* Muesebeck (Hym.; Braconidae), a parasitoid of *Rhagoletis Pomonella* Walsh (Dipt.; Tephritidae). *Neth. J. Zool.* 33, 41–54. doi:10.1163/002829683X00039
- Godfray, H.C.J., 1994. *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press.
- Greany, P.D., Hawke, S.D., Carlyle, T.C., Anthony, D.W., 1977. Sense organs in the ovipositor of *Biosteres (Opius) longicaudatus*, a parasite of the Caribbean Fruit Fly *Anastrepha suspensa*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 70, 319–321. doi:10.1093/aesa/70.3.319
- Guimarães, J.A., Zucchi, R.A., 2004. Parasitism behavior of three species of Eucilinae (Hymenoptera: Cynipoidea: Figitidae) fruit fly parasitoids (Diptera) in Brazil. *Neotrop. Entomol.* 33, 217–224. doi:10.1590/S1519-566X2004000200012
- Harvey, J.A., Poelman, E.H., Tanaka, T., 2013. Intrinsic inter- and intraspecific competition in parasitoid wasps. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 333–351. doi:10.1146/annurev-ento-120811-153622
- Kaplan, I., 2012. Attracting carnivorous arthropods with plant volatiles: The future of biocontrol or playing with fire? *Biol. Control* 60, 77–89. doi:10.1016/j.biocontrol.2011.10.017
- Lawrence, P.O., 1981. Host vibration — A cue to host location by the parasite, *Biosteres longicaudatus*. *Oecologia* 48, 249–251. doi:10.1007/BF00347971
- Leyva, J.L., Browning, H.W., Gilstrap, F.E., 1991. Effect of host fruit species, size, and color on parasitization of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) by *Diachasmimorpha*

- longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). Environ. Entomol. 20, 1469–1474.
doi:10.1093/ee/20.5.1469
- Meirelles, R.N., Redaelli, L.R., Ourique, C.B., 2013. Comparative biology of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) reared on *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Fla. Entomol. 96, 412–418.
doi:10.1653/024.096.0204
- Messing, R.H., Jang, E.B., 1992. Response of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) to host-fruit stimuli. Environ. Entomol. 21, 1189–1195. doi:10.1093/ee/21.5.1189
- Messing, R.H., Wang, X.-G., 2009. Competitor-free space mediates non-target impact of an introduced biological control agent. Ecol. Entomol. 34, 107–113. doi:10.1111/j.1365-2311.2008.01046.x
- Miranda, M., Sivinski, J., Rull, J., Cicero, L., Aluja, M., 2015. Niche breadth and interspecific competition between *Doryctobracon crawfordi* and *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), native and introduced parasitoids of *Anastrepha* spp. fruit flies (Diptera: Tephritidae). Biol. Control 82, 86–95.
doi:10.1016/j.biocontrol.2014.12.008
- Nunes, A.M., Costa, K.Z., Faggioni, K.M., Costa, M. de L.Z., Gonçalves, R. da S., Walder, J.M.M., Garcia, M.S., Nava, D.E., 2013. Dietas artificiais para a criação de larvas e adultos da mosca-das-frutas sul-americana. Pesqui. Agropecuária Bras. 48, 1309–1314.
- Nunes, A., Müller, F.A., Gonçalves, R.S., Garcia, M.S., Costa, V.A., Nava, D.E., 2012. Moscas frugívoras e seus parasitoides nos municípios de Pelotas e Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. Ciênc. Rural 42, 6–12.

- Ovruski, S., Aluja, M., Sivinski, J., Wharton, R., 2000. Hymenopteran parasitoids on fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the Southern United States: diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. *Integr. Pest Manag. Rev.* 5, 81–107. doi:10.1023/A:1009652431251
- Paranhos, B.J., Sivinski, J., Stuhl, C., Holler, T., Aluja, M., 2013. Intrinsic competition and competitor-free-space influence the coexistence of parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae) of Neotropical Tephritidae (Diptera). *Environ. Entomol.* 42, 717–723. doi:10.1603/EN12282
- Pérez, J., Rojas, J.C., Montoya, P., Liedo, P., Castillo, A., 2013. *Anastrepha* egg deposition induces volatiles in fruits that attract the parasitoid *Fopius arisanus*. *Bull. Entomol. Res.* 103, 318–325. doi:10.1017/S0007485312000739
- R Development Core Team, 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rousse, P., Chiroleu, F., Veslot, J., Quilici, S., 2007. The host- and microhabitat olfactory location by *Fopius arisanus* suggests a broad potential host range. *Physiol. Entomol.* 32, 313–321. doi:10.1111/j.1365-3032.2007.00575.x
- Ruschioni, S., van Loon, J.J.A., Smid, H.M., van Lenteren, J.C., 2015. Insects can count: sensory basis of host discrimination in parasitoid wasps revealed. *PLoS ONE* 10, e0138045. doi:10.1371/journal.pone.0138045
- Segura, D.F., Viscarret, M.M., Ovruski, S.M., Cladera, J.L., 2012. Response of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* to host and host-habitat volatile cues. *Entomol. Exp. Appl.* 143, 164–176. doi:10.1111/j.1570-7458.2012.01246.x
- Sivinski, J., 1991. The influence of host fruit morphology on parasitization rates in the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. *Entomophaga* 36, 447–454. doi:10.1007/BF02377951

- Sivinski, J., Aluja, M., 2012. The roles of parasitoid foraging for hosts, food and mates in the augmentative control of Tephritidae. *Insects* 3, 668–691. doi:10.3390/insects3030668
- Sivinski, J., Aluja, M., Lopez, M., 1997. Spatial and temporal distributions of parasitoids of mexican *Anastrepha* species (Diptera: Tephritidae) within the canopies of fruit trees. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90, 604–618. doi:10.1093/aesa/90.5.604
- Stelinski, L.L., Boina, D.R., Meyer, W.L., 2010. Oviposition marking behavior of *Diachasma alloeum*, (Hymenoptera: Braconidae), parasitizing *Rhagoletis pomonella*, (Diptera: Tephritidae). *J. Insect Behav.* 23, 419–430. doi:10.1007/s10905-010-9225-9
- Stuhl, C., Sivinski, J., Teal, P., Aluja, M., 2012. Responses of multiple species of Tephritid (Diptera) fruit fly parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae) to sympatric and exotic fruit volatiles. *Fla. Entomol.* 95, 1031–1039. doi:10.1653/024.095.0432
- Stuhl, C., Sivinski, J., Teal, P., Paranhos, B., Aluja, M., 2011. A compound produced by fruigivorous Tephritidae (Diptera) larvae promotes oviposition behavior by the biological control agent *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Environ. Entomol.* 40, 727–736. doi:10.1603/EN10198
- Vargas, R.I., Nishida, T., 1985. Survey for *Dacus latifrons* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.* 78, 1311–1314. doi:10.1093/jee/78.6.1311
- Vet, L.E.M., 1982. Host-habitat location through olfactory cues by *Leptopilina clavipes* (Hartig) (Hym.: Eucoilidae), a parasitoid of fungivorous *Drosophila*: the influence of conditioning. *Neth. J. Zool.* 33, 225–248. doi:10.1163/002829683X00101
- Wang, X.-G., Bokonon-Ganta, A.H., Messing, R.H., 2008. Intrinsic inter-specific competition in a guild of tephritid fruit fly parasitoids: effect of co-evolutionary history on competitive superiority. *Biol. Control* 44, 312–320. doi:10.1016/j.biocontrol.2007.10.012

- Wang, X., Messing, R.H., 2003a. Intra- and interspecific competition by *Fopius arisanus* and *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae), parasitoids of tephritid fruit flies. *Biol. Control* 27, 251–259. doi:10.1016/S1049-9644(03)00027-6
- Wang, X., Messing, R.H., 2003b. Foraging behavior and patch time allocation by *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae), an egg-larval parasitoid of Tephritid fruit flies. *J. Insect Behav.* 16, 593–612. doi:10.1023/B:JOIR.00000007698.01714.56
- Wong, T.T.Y., Ramadan, M.M., 1987. Parasitization of the mediterranean and oriental fruit flies (Diptera: Tephritidae) in the Kula area of Maui, Hawaii. *J. Econ. Entomol.* 80, 77–80. doi:10.1093/jee/80.1.77
- Zhang, Q.-H., Schlyter, F., 2004. Olfactory recognition and behavioural avoidance of angiosperm nonhost volatiles by conifer-inhabiting bark beetles. *Agric. For. Entomol.* 6, 1–20. doi:10.1111/j.1461-9555.2004.00202.x

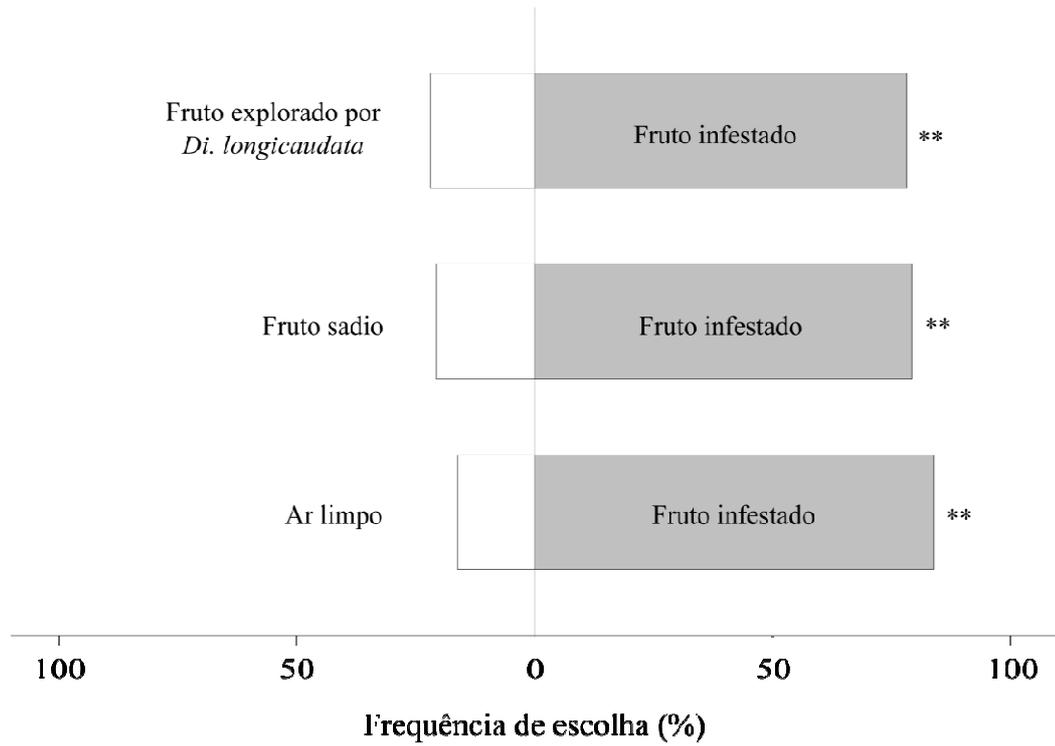


Fig. 1. Resposta olfativa de *Do. areolatus* em olfatômetro tipo "Y" a combinações de voláteis. As barras representam a resposta final dos insetos. ** representa diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado ($p \leq 0,05$).

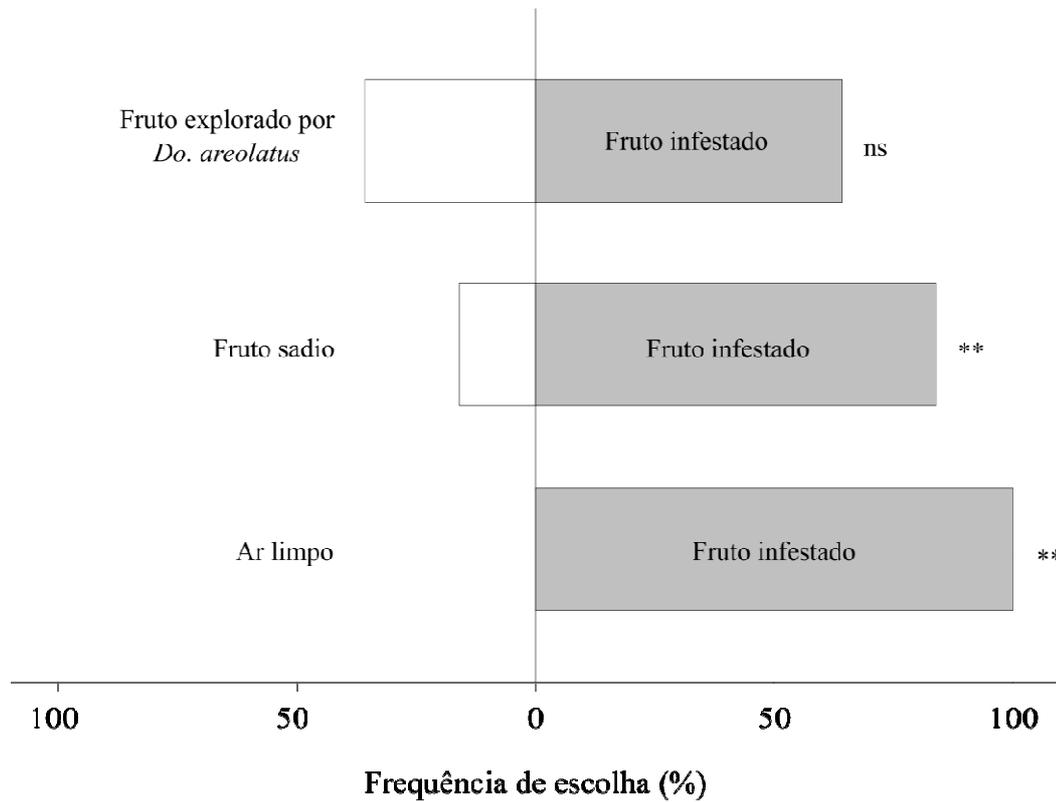


Fig. 2 Resposta olfativa de *Di. longicaudata* em olfatômetro tipo "Y" a diferentes combinações de odores. As barras representam a resposta final dos insetos. ** representa diferença significativa e ^{ns} diferença não significativa entre os tratamentos pelo teste de Qui-quadrado ($p \leq 0,05$).

Tabela 1. Tempo de latência (média \pm EP) de fêmeas de *Do. areolatus* e *Di. longicaudata* em resposta a diferentes compostos voláteis

Combinações	<i>Do. areolatus</i>	<i>Di. longicaudata</i>
	Tempo de latência (segundos)	
Fruto infestado \times Ar limpo	391 \pm 23 a	363 \pm 24 a
	255 \pm 51 b	11 \pm 7 b
Fruto infestado \times Fruto sadio	466 \pm 23 a	417 \pm 39 a
	432 \pm 57 a	230 \pm 74 b
Fruto infestado \times Fruto explorado por <i>Di. longicaudata</i>	442 \pm 30 a	-
	292 \pm 65 b	-
Fruto infestado \times Fruto explorado por <i>Do. areolatus</i>	-	452 \pm 33 a
	-	345 \pm 62 a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, para cada combinação, não diferem significativamente entre si pelo teste *t* ($p < 0.05$).

Tabela 2. Descrição dos principais eventos comportamentais envolvidos no forrageamento hospedeiro dos parasitoides *Do. areolatus* e *Di. longicaudata*

Comportamento	Descrição
<i>Busca do fruto</i>	A fêmea caminha ou voa em direção ao fruto hospedeiro.
<i>Caminhamento no fruto</i>	Ao chegar no fruto as fêmeas caminham rapidamente realizando alguns movimentos verticais das antenas sem haver o toque das mesmas no fruto. Este evento foi observado apenas para <i>Do. areolatus</i> .
<i>Caminhamento e antenação no fruto</i>	As fêmeas iniciam caminhamento mais lento e a região distal das antenas ficam dispostas paralelamente a superfície do fruto realizando movimentos alternados de baixa amplitude no sentido vertical.
<i>Parada</i>	A fêmea interrompe a caminhada e antenação e permanece imóvel com as antenas dispostas perpendicularmente ao corpo.
<i>Movimento em círculo</i>	Após ou de forma intercalada a parada, a fêmea gira o eixo do próprio corpo (90 a 360°), permanecendo no mesmo local. Este tipo de comportamento não foi observado para <i>Di. longicaudata</i> .
<i>Prova</i>	A fêmea introduz o ovipositor, parcial ou totalmente no fruto. Inicialmente ocorre um movimento característico em que a fêmea ergue seu abdome e posiciona o ovipositor de forma perpendicular ao fruto. Em seguida, movimentos rápidos de inserção e retirada do ovipositor são realizados.
<i>Parasitismo</i>	A fêmea introduz o ovipositor, com ou sem a prova, e permanece sem movimentação.
<i>Marcação</i>	Após a retirada do ovipositor do fruto, a fêmea realiza um breve arraste do mesmo sobre o fruto. Este etapa do comportamento somente foi observada para <i>Do. areolatus</i> .

Tabela 3. Tempo despendido por fêmeas de *Do. areolatus* para execução dos eventos comportamentais envolvidos no processo de forrageamento de frutos infestados com *A. fraterculus* e explorados pelo competidor *Di. longicaudata*. (Temperatura: 25 ± 2 °C, umidade relativa: 60 ± 10 % e fotofase: 12 horas)

Evento comportamental	Tratamentos		Fruto explorado por <i>Di. longicaudata</i>		p-valor
	Fruto infestado		Mediana	Média \pm EP	
<i>Busca do fruto</i>	30,83	81,63 \pm 25,84	36,98	142,05 \pm 38,79	0,393
<i>Caminhamento no fruto</i>	9,51	14,25 \pm 3,87	8,26	26,43 \pm 8,61	0,949
<i>Caminhamento e antenação</i>	66,15	64,29 \pm 13,96	70,48	81,21 \pm 13,24	0,529
<i>Parada</i>	94,57	107,46 \pm 21,01	308,82	323,80 \pm 31,38	< 0,001
<i>Movimento em círculo</i>	17,36	17,19 \pm 2,96	5,22	8,37 \pm 3,14	0,019
<i>Prova</i>	101,95	105,63 \pm 11,36	165,41	187,41 \pm 23,76	0,018

Os tratamentos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

Tabela 4. Tempo despendido por fêmeas de *Di. longicaudata* para execução dos eventos comportamentais envolvidos no processo de forrageamento de frutos infestados com *A. fraterculus* e explorados pelo competidor *Do. areolatus*. (Temperatura: 25 ± 2 °C, umidade relativa: 60 ± 10 % e fotofase: 12 horas)

Evento comportamental	Tratamentos				p-valor
	Fruto infestado		Fruto explorado por <i>Do. areolatus</i>		
	Mediana	Média \pm EP	Mediana	Média \pm EP	
<i>Busca do fruto</i>	32,64	36,25 \pm 6,90	59,64	127,75 \pm 34,76	0,055
<i>Caminhamento e antenação</i>	36,70	54,11 \pm 17,71	60,12	89,81 \pm 17,94	0,088
<i>Parada</i>	92,59	113,92 \pm 27,96	291,07	322,71 \pm 41,69	< 0,001
<i>Prova</i>	87,10	105,89 \pm 16,61	184,21	171,37 \pm 20,19	0,042

Os tratamentos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis ($p \leq 0,05$).

Artigo 5 - Revista: Environmental Entomology

6 - Artigo 5

Há possibilidades de *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae) vencer uma competição intrínseca contra *Diachasmimorpha longicaudata*?

R. S.GONÇALVES¹, R. MANICA-BERTO², R. A. VALGAS², B. A. J. PARANHOS³ E D. E.

NAVA²

¹ Departamento de Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, 96010-900, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Laboratório de Entomologia, Embrapa Clima Temperado, 96001-970, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

³ Laboratório de Entomologia, Embrapa Semiárido, 56.302-970, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

Resumo

Os endoparasitoides *Doryctobracon areolatus* e *Diachasmimorpha longicaudata* são importantes inimigos naturais de moscas-das-frutas e podem explorar as mesmas espécies hospedeiras. Liberações inundativas destas espécies proporcionam ambientes favoráveis para ocorrência de competição entre ambas. Em função disso, em muitas ocasiões as fêmeas forçam seus descendentes a competir com os imaturos de outras espécies. Em competições intrínsecas, que ocorrem no interior dos hospedeiros, *Di. longicaudata* apresenta superioridade em relação a *Do. areolatus*. No entanto, evidências recentes demonstraram que *Do. areolatus* é capaz de explorar as fases iniciais de desenvolvimento de seus hospedeiros, e portanto, haveria possibilidade de superar *Di. longicaudata*. O presente estudou investigou a possibilidade de *Do. areolatus* vencer seu uma competição intrínseca contra seu

heteroespecífico. Por meio de exposições sequenciais de larvas de *A. fraterculus*, verificamos que o percentual de parasitismo de *Di. longicaudata* foi significativamente reduzido quando as larvas foram expostas para *Do. areolatus* em 2º ínstar e oferecidas para *Di. longicaudata* em 3º ínstar. Este resultado confirma nossa hipótese de que quando *Do. areolatus* possui vantagem temporal em relação a *Di. longicaudata*, torna-se capaz de superar seu competidor. Nossos resultados são discutidos considerando os aspectos co-evolutivos entre as espécies envolvida. Além disso, abordamos os aspectos de coexistências entre estas espécies e suas implicações para os programas de controle biológico de moscas-das-frutas.

Palavras-chave: Controle biológico, interações tritróficas, Neotropical, parasitoides, moscas-das-frutas

**There possibilities of *Doryctobracon areolatus* win an intrinsic competition against
Diachasmimorpha longicaudata (Hymenoptera: Braconidae)?**

Abstract

The endoparasitoids *Doryctobracon areolatus* and *Diachasmimorpha longicaudata* are important natural enemies of fruit flies and they can explore the same host species. Inundative releases of these species provide favorable conditions for the occurrence of competition between them. As a result, on many situation the females force their offspring to compete with the immature stages of other species. In intrinsic competition, that occurring within the host, *Di. longicaudata* shows superiority to *Do. areolatus*. However, recent evidence has shown that *Do. areolatus* is able to explore the early stages of development of their hosts, and therefore would be able to overcome *Di. longicaudata*. This study investigated the possibility of *Do. areolatus* win an intrinsic competition against his heterospecific *Di. longicaudata*. Through sequential exposures of *A. fraterculus* larvae, we found that the percentage of parasitism of *Di. longicaudata* was significantly reduced when the larvae were exposed to *Do. areolatus* in 2nd instar and offered to *Di. longicaudata* in 3rd instar. This result confirms our hypothesis that when *Do. areolatus* has temporal advantage over *Di. longicaudata*, it is able to overcome its competitor. Our results are discussed considering the co-evolutionary aspects of the species involved. Besides, we discuss aspects of coexistences between these species and the implications for biological control programs of the fruit flies

Key words: biological control, tritrophic interactions, Neotropical, parasitoids, fruit-fly

Introdução

Uma determinada espécie herbívora pode ser explorada como recurso hospedeiro por múltiplas espécies de parasitoides (Hawkins 2000) possibilitando a competição entre estas espécies. A compreensão da dinâmica desta interação é fundamental na implementação de programas de controle biológico, pois permite selecionar espécies de inimigos naturais que atuem de forma sinérgica, bem como, determinar a dinâmica de liberações de espécies concorrentes, potencializando o controle biológico de pragas (Mackauer 1990, Bautista e Harris 1997, Wang et al. 2003). Além disso, os estudos de competição são fundamentais quando se pensa na introdução de espécies exóticas, haja visto a possibilidade de deslocamento e/ou extinção de espécies nativas (Wang e Messing 2004, Messing e Wang 2009).

De maneira geral, espécies de endoparasitoides que atacam as fases iniciais do hospedeiro, como por exemplo, ovos e/ou larvas de primeiro ínstar, podem ter vantagem em relação as espécies competidoras que atacam os estágios mais avançados (Wang et al. 2003). Por meio desta estratégia, as espécies superiores podem garantir maior volume de recursos nutricionais para seus descendentes (Silvers e Nappi 1986). Um exemplo desta situação foi a introdução do endoparasitoide ovo-pupa *Fopius arisanus* (Sonan, 1932) (Hymenoptera: Braconidae) no estado do Hawaii, EUA. Este inimigo natural foi uma das 32 espécies de parasitoides introduzidas naquele Estado para o controle de moscas-das-frutas, entre os anos de 1947 e 1953, porém, após seu estabelecimento as demais espécies foram deslocadas (Bess et al. 1961, Vargas et al. 2012). Além disso, *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron, 1911) (Hymenoptera: Braconidae), que foi levada para o Hawaii para o controle de *Ceratitidis capitata* (Wiedemann, 1930) (Diptera: Tephritidae), e efetivamente reduziu os níveis populacionais desta espécie, foi forçada a explorar a espécie não-alvo *Eutreta xanthocaeta* Aldrich (Diptera: Tephritidae), devido a superioridade de *F. arisanus* (Messing e Wang 2009).

Diachasmimorpha longicaudata (Ashmead, 1905) (Hymenoptera: Braconidae) é um endoparasitoide larva-pupa, frequentemente encontrado parasitando larvas de segundo e terceiro ínstar de diferentes espécies de tefritídeos (Purcell et al. 1994, Ovruski et al. 2000). Em 1995, *Di. longicaudata* foi introduzida no Brasil, por meio de liberações inoculativas, para o manejo populacional de diferentes espécies do gênero *Anastrepha* e de *C. capitata* (Carvalho 2005).

Estudos conduzidos para avaliar o impacto desta espécie sobre as populações de parasitoides nativos, demonstraram que em um primeiro momento *Di. longicaudata* foi capaz de reduzir a ocorrência de espécies nativas, especialmente de *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae), a espécie mais freqüente e dominante (Carvalho 2005). Todavia, após dez anos das primeiras liberações, estes autores verificaram que *Di. longicaudata* não conseguiu se estabelecer. Ademais, observou-se que *Do. areolatus* continuou sendo a espécie mais freqüente. No estado da Flórida - EUA, onde *Di. longicaudata* foi introduzida entre 1969 e 1972, verificou-se que após seu estabelecimento as taxas de parasitismo ocasionadas por *Do. areolatus* foram brutalmente reduzidas (Sivinski 1991). Posteriormente, foi observado que as populações de *Do. areolatus* haviam sido deslocadas (Eitam et al. 2004).

Avaliando a competição intrínseca dos endoparasitoides, *Di. longicaudata* e *Do. areolatus* em larvas de terceiro ínstar de *A. suspensa* Paranhos et al. (2013) verificaram que *Di. longicaudata* foi capaz de suprimir o desenvolvimento de *Do. areolatus*. Contudo, Matrangolo et al. (1998) observaram que em condições de campo, fêmeas de *Do. areolatus* realizam forrageamento em frutos de diferentes estágios de maturação, indicando que esta espécie pode explorar hospedeiros de diferentes idades. Além disso, ao coletar frutos verdes de pitanga (*Eugenia uniflora*, Myrtaceae), os autores constataram que 100 % dos parasitoides emergidos pertenciam a espécie Neotropical *Do. areolatus*.

A colônia de *Do. areolatus* mantida no laboratório de entomologia da EMBRAPA Clima Temperado desde 2012, utilizando como hospedeiros larvas de *A. fraterculus* criadas em dieta artificial, só foi possível após determinar que o parasitismo só era possível quando larvas de segundo ínstar foram ofertadas (Gonçalves, R. S., informação pessoal). Recentemente, Murillo et al. (2015) demonstraram que *Do. areolatus* foi capaz de ovipositar em ovos e larvas neonatas de *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) (Diptera: Tephritidae).

Diante das evidências de que *Do. areolatus* é capaz de parasitar os estágios iniciais de desenvolvimento de espécies do gênero *Anastrepha*, o presente trabalho tem por objetivo estudar o processo de competição entre esta espécie e *Di. longicaudata*. Dessa forma, estabeleceu-se a hipótese de que *Do. areolatus* ao parasitar larvas de segundo ínstar de *A. fraterculus* terá vantagem em relação ao seu heteroespecífico exótico e demonstrar-se-á superior.

Material e Métodos

Material biológico. Os insetos utilizados neste estudo foram obtidos das colônias de criação do Laboratório de Entomologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (Embrapa-CPACT), em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Para a criação de *A. fraterculus* foi utilizada a metodologia descrita por Gonçalves et al. (2013) e Nunes et al. (2013). A multiplicação de *Di. longicaudata* foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Carvalho e Nascimento (2002), porém utilizando como hospedeiro larvas de *A. fraterculus*, multiplicadas em dieta artificial.

Para criação de *Do. areolatus*, os adultos foram mantidos em gaiolas plásticas (40 cm × 27 cm × 23 cm - l × w × h) teladas, alimentados com solução aquosa de mel na concentração de 30 % e água. A multiplicação dos insetos foi realizada ofertando-se larvas de segundo ínstar de *A. fraterculus* (6 dias de idade). As larvas foram dispostas em unidades de parasitismo (UP), constituídas por uma placa de acrílico (4 cm de diâmetro × 0,2 cm de altura) envolta em

tecido *voile*, e expostas às fêmeas por 24 horas. Ao final do período de exposição as larvas foram transferidas para frascos contendo dieta artificial conforme descrito por Nunes et al. (2013). Com a verificação da formação dos primeiros pupários, cerca de 12 dias de vida das larvas, os mesmos juntamente com as demais larvas que ainda se encontravam no terceiro ínstar, foram transferidos para caixas de acrílico contendo vermiculita. Todas as criações de manutenção, bem como, os bioensaios foram mantidos em salas climatizadas com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de 60 ± 10 % e fotofase de 12 horas.

Experimento 1. Nesta etapa do estudo o objetivo foi avaliar a competição entre *Do. areolatus* (*Da*) e *Di. longicaudata* (*Dl*) quando ambas espécies exploraram larvas de *A. fraterculus* em segundo ínstar, portanto, nesta condição não foi possibilitada vantagem temporal para nenhuma das espécies. Para aferir os efeitos da competição entre as espécies, foram estabelecidos diferentes regimes de exposição das larvas de *A. fraterculus*, os quais foram: A (*Da*): hospedeiro exposto para *Da* por 24 horas; B (*Dl*): hospedeiro exposto para *Dl* por 1 hora; C (*Da - Da*): hospedeiro exposto para *Da* por 24 horas e em seguida para um co-específico por 24 horas; D (*Dl - Dl*): hospedeiro exposto para *Dl* por 1 hora e em seguida para um co-específico por 24 horas; E (*Da - Dl*): hospedeiro exposto para *Da* por 24 horas e em seguida para *Dl* por 1 hora; F (*Dl - Da*): hospedeiro exposto para *Dl* por 1 hora e em seguida para *Da* por 24 horas. O tempo de exposição das larvas para *Dl* foi menor devido a maior agressividade desta espécie, especialmente em condições de laboratório.

Para obtenção de hospedeiros parasitados do regime A e B, e aqueles da primeira exposição dos regimes C, D, E e F, larvas de segundo ínstar de *A. fraterculus* foram expostas aos respectivos parasitoides. Foram utilizadas fêmeas dos parasitoides com sete dias de idade, supostamente acasaladas e com experiência prévia de parasitismo. Após o período de exposição (24 horas para *Do. areolatus* e 1 hora para *Di. longicaudata*) as larvas foram individualmente checadas quanto a presença de cicatrizes de parasitismo e aquelas que

apresentaram apenas uma cicatriz foram selecionadas para dar seguimento ao experimento. Logo após a verificação, as larvas foram separadas em grupos de 10 e aquelas designadas aos regimes A e B foram diretamente transferidas para frascos de acrílico contendo dieta artificial para completar o desenvolvimento larval.

As larvas destinadas aos regimes C, D, E e F foram transferidas para unidades de parasitismo [placas de acrílico (1,7 cm de diâmetro × 0,1 cm de altura) contendo substrato constituído por polpa de goiaba e ágar] e submetidas a segunda etapa de parasitismo, as fêmeas com sete dias de idade, supostamente acasaladas e com experiência prévia de parasitismo. Ao final da segunda etapa, as larvas foram transferidas para dieta artificial para completar o desenvolvimento larval. Um grupo controle, constituído por 10 larvas não parasitadas, foi formado e submetido as mesmas condições experimentais que as larvas expostas aos parasitoides. A partir da formação dos primeiros pupários, os mesmos, bem como as larvas foram transferidos para frascos (2,5 cm de diâmetro × 4,5 cm de altura) contendo vermiculita extra fina, onde permaneceram até a emergência de parasitoides e/ou moscas.

Após 25 dias, os parasitoides emergidos foram identificados e contabilizados juntamente com as moscas emergidas e os pupários intactos. Com base no número de insetos emergidos calculou-se o percentual de parasitismo (P %), por meio da seguinte equação: $P = \{[\text{número de parasitoides } (Da \text{ ou } Dl) / \sum \text{ parasitoides } (Da + Dl) \text{ e moscas emergidas}] \times 100\}$. Para os regimes de exposição em que as larvas foram expostas para as duas espécies de parasitoides, o percentual de parasitismo foi calculado para ambas e a comparação entre regimes foi realizada para cada espécie. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com seis tratamentos (regimes de exposição) e 10 repetições, sendo cada unidade experimental constituída por um grupo de 10 larvas.

Experimento 2. Nesta fase do estudo submetemos ambas espécies de parasitoides a uma condição de vantagem temporal em relação ao seu heteroespecífico. Dessa forma, as larvas de *A. fraterculus* foram submetidas aos seguintes regimes de exposição: A (*Da* 2°): hospedeiro em 2° ínstar exposto à *Da* por 24 horas; B (*Dl* 2°): hospedeiro em 2° ínstar exposto à *Dl* por 1 hora; C (*Da* 3°): hospedeiro em 3° ínstar exposto à *Da* por 24 horas; D (*Dl* 3°): hospedeiro em 3° ínstar exposto à *Dl* por 1 hora; E (*Da* 2° - *Da* 3°): hospedeiro em 2° ínstar exposto à *Da* por 24 horas e quando em 3° ínstar exposto à um co-específico por 24 horas; F (*Dl* 2° - *Dl* 3°): hospedeiro em 2° ínstar exposto à *Dl* por 1 hora e quando em 3° ínstar à um co-específico por 1 hora; G (*Da* 2° - *Dl* 3°): hospedeiro em 2° ínstar exposto à *Da* por 24 horas e quando em 3° ínstar exposto à *Dl* por 1 hora; H (*Dl* 2° - *Da* 3°): hospedeiro em 2° ínstar exposto à *Dl* por 1 hora e quando em 3° ínstar exposto à *Da* por 24 horas. Um grupo controle foi submetido as mesmas condições experimentais, porém não foram expostos ao parasitismo.

Todos os procedimentos de verificação da presença de cicatriz de parasitismo, exposição das larvas durante a segunda etapa do regime de exposição, manutenção das larvas entre o 2° e 3° ínstar e dos pupários, foram os mesmos descritos no experimento 1. Após a emergência de parasitoides e/ou moscas os mesmos foram identificados e contabilizados, e o percentual de parasitismo foi determinado conforme descrito no experimento 1. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com oito tratamentos (regimes de exposição) e 10 repetições, sendo cada unidade experimental constituída por um grupo de 10 larvas de *A. fraterculus*.

Análise estatística. Os dados referentes ao percentual de parasitismo dos dois experimentos foram analisados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro Wilk, à homocedasticidade pelo teste de Hartley e a independência dos resíduos por análise gráfica. Para o experimento 1 verificou-se que os pressupostos para a homocedasticidade não foram atendidos, dessa forma, optou-se por utilizar o teste não paramétrico de Kruskal Wallis ($\alpha =$

0,05) para comparar o percentual de parasitismo de cada espécie entre os tratamentos. Para o experimento 2, os dados de percentual de parasitismo de *Do. areolatus* atenderam aos pressupostos e foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Os dados referentes a *Di. longicaudata* não atenderam aos pressupostos, e, portanto, os tratamentos foram comparados pelo teste de Kruskal Wallis ($\alpha = 0,05$).

Resultados

Experimento 1. As taxas de parasitismo de *Di. longicaudata* não foram significativamente afetadas quando as larvas de *A. fraterculus* também foram expostas para *Do. areolatus* ($\chi^2 = 5,13$; $df = 3$; $p = 0,16$) (Fig. 1). Entretanto, cabe ressaltar que no regime de exposição onde as larvas foram expostas primeiro para *Do. areolatus* e depois para *Di. longicaudata*, foi verificada redução no percentual de parasitismo de *Di. longicaudata*.

No que diz respeito a *Do. areolatus*, não foi possível incluir na análise os dados referentes ao regime de exposição (*Dl - Da*), pois apenas um espécime de *Do. areolatus* emergiu. Este resultado demonstra a capacidade de supressão de *Di. longicaudata* sobre *Do. areolatus*, especialmente quando *Di. longicaudata* é capaz de explorar primeiro os hospedeiros. No entanto, a comparação entre os demais regimes de exposição demonstrou não haver diferença significativa entre as taxas de parasitismo de *Do. areolatus* ($\chi^2 = 0,51$; $df = 2$; $p = 0,77$) (Fig. 1).

Experimento 2. O percentual de parasitismo de *Di. longicaudata* foi significativamente reduzido quando as larvas foram expostas para *Do. areolatus* em 2º instar e oferecidas para *Di. longicaudata* em 3º instar. Por outro lado no regime de exposição oposto (*Dl 2º - Da 3º*) a taxa de parasitismo de *Di. longicaudata* foi significativamente superior ($\chi^2 = 17,91$; $df = 4$; $p = 0$).

Não foi observado desenvolvimento de *Do. areolatus* quando larvas de 3º ínstar foram oferecidas (Fig. 2). Além disso, para o regime *DI 2º - Da 3º* também não obtivemos nenhum espécime de *Do. areolatus*. Por este motivo os dados destes dois regimes de exposição não foram incluídos nas análises.

Contudo, ao analisarmos os demais dados de *Do. areolatus* podemos verificar que quando esta espécie esteve em vantagem temporal em relação a *Di. longicaudata* (*Da 2º - DI 3º*), suas taxas de parasitismo foram significativamente superiores ($F = 8,02$; $df = 2$; $p = 0,001$). Além disso, verificou-se que larvas de 2º ínstar de *A. fraterculus* apresentaram melhores condições para o desenvolvimento de *Do. areolatus*, pois não observamos emergência de parasitoides, apenas de moscas (dados não apresentados), quando larvas de 3º ínstar foram oferecidas a este parasitoide.

Discussão

Os resultados apresentados aqui demonstram que a espécie Neotropical, *Do. areolatus*, teve seu desempenho significativamente reduzido por *Di. longicaudata*, quando ambas espécies foram permitidas a parasitar larvas de segundo ínstar de *A. fraterculus* (Fig. 1). Entretanto, quando há vantagem temporal para *Do. areolatus*, esta espécie demonstrou superioridade em relação a *Di. longicaudata* (Fig. 2). Estes resultados confirmam nossa hipótese de que *Do. areolatus* ao explorar os estádios iniciais do desenvolvimento larval de *A. fraterculus* torna-se capaz de superar seu heteroespecífico *Di. longicaudata*.

Esse resultado vai de encontro ao reportado por Paranhos et al. (2013) que determinaram que *Do. areolatus* não é capaz de superar *Di. longicaudata* em competições intrínsecas. Contudo, cabe ressaltar que Paranhos et al. (2013) utilizaram larvas de terceiro ínstar de *A. suspensa*, favorecendo assim a superioridade de *Di. longicaudata*. Esta constatação pode ser confirmada com nossos resultados, pois não observamos emergência de *Do. areolatus*, apenas de moscas (dados não apresentados), quando larvas de terceiro ínstar foram oferecidas à

espécie. Em contrapartida, quando larvas de terceiro ínstar foram oferecidas à *Di. longicaudata*, o percentual de parasitismo foi de 50 % (Fig. 2).

Doryctobracon areolatus foi capaz de gerar descendentes apenas explorando larvas de segundo ínstar, ao passo que *Di. longicaudata* apresentou bom desempenho também em larvas de *A. fraterculus* de terceiro ínstar. O fato de *Di. longicaudata* ter apresentado bons resultados utilizando a mesma espécie hospedeira em diferentes idades, faz com que tenha vantagem em relação a *Do. areolatus*.

O fraco desempenho de *Do. areolatus* em larvas de terceiro ínstar de *A. fraterculus*, pode ser interpretado como uma resposta da estratégia adotada por este parasitoide ao longo do processo de co-evolução com seus hospedeiros e, principalmente com seus competidores. Possivelmente, *Do. areolatus* adaptou-se para explorar larvas menores, que normalmente se localizam próximo a epiderme dos frutos, para assim evitar competir com heteroespecíficos nativos, como por exemplo seu congênere *Doryctobracon brasiliensis* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) que possui ovipositor longo tanto quanto *Di. longicaudata* e parasita larvas de *A. fraterculus* de 3º instar (Poncio 2015).

Nossos resultados, corroboram as observações realizadas por Matrangolo et al. (1998) em condições de campo. Estes autores verificaram fêmeas de *Do. areolatus* introduzindo o ovipositor em frutos verdes de pitanga, onde as larvas ainda encontram-se em estágio inicial de desenvolvimento. Posteriormente, os autores confirmaram que nestes frutos, o parasitismo foi realizado apenas por *Do. areolatus*.

As prospecções realizadas por Carvalho (2005) na região do Recôncavo Baiano, demonstraram que a espécie não foi capaz de se estabelecer. Além disso, o autor demonstrou que as populações naturais de *Do. areolatus* foram sempre frequentes, mesmo após a liberação da espécie competidora. Uma possibilidade para explicar as observações feitas por

Carvalho (2005) é justamente o fato de *Do. areolatus* apresentar melhor performance quando ataca larvas em estádios iniciais de desenvolvimento de seus hospedeiros.

Assim como para outras espécies de endoparasitoides que atacam os estádios iniciais de desenvolvimento de seus hospedeiros, o exato mecanismo de supressão utilizado por *Do. areolatus* para eliminar os imaturos de *Di. longicaudata*, permanece sem elucidação. De acordo com Wang et al. (2003) em competições intrínsecas entre parasitoides de larva, o ataque físico entre imaturos é o mecanismo de supressão comumente utilizado. Entretanto, esta possibilidade parece não ser aplicável para *Do. areolatus*, pois as fases imaturas desta espécie não apresentam aparelho bucal robusto, a exemplo das larvas de *Utetes anastrephae* (Viereck, 1913) (Hymenoptera: Braconidae) (Aluja et al. 2013, Murillo et al. 2015).

Estudos já demonstraram que imaturos de endoparasitoides em avançado estado de desenvolvimento podem suprimir seus competidores por meio da secreção de toxinas, anoxia ou privando nutricionalmente os mesmos (Salt 1963, Silvers e Nappi 1986, Wang et al. 2003). O uso de um ou mais destes mecanismos, parece ser uma opção para *Do. areolatus*, pois a única situação em que a espécie superou *Di. longicaudata* foi quando teve a vantagem de explorar o recurso hospedeiro antes de seu competidor (Fig. 2).

De acordo com modelo desenvolvido por Briggs (1993), em uma guilda em que duas espécies de parasitoides exploram diferentes estádios de desenvolvimento da mesma espécie hospedeira, a coexistência somente é possível se os imaturos da espécie tardia são capazes de se desenvolver na presença de heteroespecíficos. Todavia, o modelo parte do princípio de que ambas espécies exploram exatamente os mesmos nichos hospedeiros. Contudo, López et al. (1999) observaram que *Di. longicaudata* explora especialmente frutos exóticos de maior tamanho e em pomares comerciais, enquanto, *Do. areolatus* tende a explorar frutos menores de espécies nativas.

A coexistência entre *Di. longicaudata* e *Do. areolatus* em diferentes países demonstra o quão complexa é a interação entre estas espécies. Na Flórida, USA, a introdução de *Di. longicaudata* fez com que as populações de *Do. areolatus* se deslocassem para outras regiões (Eitam et al. 2004) ao passo que na região nordeste do Brasil, *Di. longicaudata* não conseguiu se estabelecer (Carvalho 2005). O fato desta espécie não ter se estabelecido no Brasil pode ser um indicativo de que a mesma pode ser utilizada em conjunto com *Do. areolatus* em programas de supressão populacional de moscas-das-frutas, sem que problemas de extinção da espécie nativa venham a ocorrer. No caso de programas de controle biológico aplicado, onde as duas espécies poderiam ser produzidas em biofábricas e liberadas de forma inundativa é possível sugerir que *Do. areolatus* deveria ser a primeira espécie a ser liberada, embora saiba-se que em condições de campo larvas de segundo e terceiro ínstar coexistem.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo financiamento deste estudo.

Referências

- Aluja, M., S. M. Ovruski, J. Sivinski, G. Córdova-García, P. Schliserman, S. R. Nuñez-Campero, e M. Ordano. 2013.** Inter-specific competition and competition-free space in the tephritid parasitoids *Utetes anastrephae* and *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae). *Ecol. Entomol.* 38: 485–496.
- Bautista, R. C., e E. J. Harris. 1997.** Effects of multiparasitism on the parasitization behavior and progeny development of oriental fruit fly parasitoids (Hymenoptera: Braconidae). *J. Econ. Entomol.* 90: 757–764.

- Bess, H. A., R. Van Den Bosch, e F. H. Haramoto. 1961.** Fruit fly parasites and their activities in Hawaii. *Proc. Hawaii. Entomol. Soc.* 17: 367–378.
- Briggs, C. J. 1993.** Competition among parasitoid species on a stage-structured host and its effect on host suppression. *Am. Nat.* 141: 372–397.
- Carvalho, R. da S. 2005.** Avaliação das liberações inoculativas do parasitóide exótico *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) em pomar diversificado em Conceição do Almeida, BA. *Neotrop. Entomol.* 34: 799–805.
- Carvalho, R. S., e Nascimento, S. S. 2002.** Criação e utilização de *Diachasmimorpha longicaudata* para o controle biológico de moscas-das-frutas (Tephritidae), pp. 165–177. *In* J.R.P. Parra; B.S. Corrêa-Ferreira e J.M.S. Bento (eds.). *Controle Biológico No Bras. Parasitoides e Predadores*. Editora Manole, BR.
- Eitam, A., J. Sivinski, T. Holler, e M. Aluja. 2004.** Biogeography of braconid parasitoids of the caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Florida. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97: 928–939.
- Gonçalves, R. S., D. E. Nava, H. C. Pereira, H. Lisbôa, A. D. Grützmacher e R. A. Valgas. 2013.** Biology and fertility life table of *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae) in larvae of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 106: 791–798.
- Hawkins, B. A. 2000.** Species coexistences in parasitoid communities: does competition matter?, pp. 198–204. *In* M. E. Hochberg and A. R. Ives (eds.), *Parasitoid Population Biology*. Princeton University Press, Princeton, US.
- López, M., M. Aluja, e J. Sivinski. 1999.** Hymenopterous larval–pupal and pupal parasitoids of *Anastrepha* flies (Diptera: Tephritidae) in Mexico. *Biol. Control.* 15: 119–129.

- Mackauer, M. 1990.** Host discrimination and larval competition in solitary endoparasitoids, pp. 14–62. *In* Proceedings, XVIII International Congress of Entomology, 3-9 July 1990, Vancouver, CA. Intercept Limited, Hampshire.
- Matrangolo, W. J. R., A. S. Nascimento, R. S. Carvalho, E. D. Melo, e M. D. Jesus. 1998.** Fruit fly parasitoids associated with tropical fruits. *An. Soc. Entomológica Bras.* 27: 593–603.
- Messing, R. H., e X.-G. Wang. 2009.** Competitor-free space mediates non-target impact of an introduced biological control agent. *Ecol. Entomol.* 34: 107–113.
- Murillo, F. D., H. Cabrera-Mireles, J. F. Barrera, P. Liedo, e P. Montoya. 2015.** *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera, Braconidae) a parasitoid of early developmental stages of *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae). *J. Hymenopt. Res.* 46: 91–105.
- Nunes, A. M., K. Z. Costa, K. M. Faggioni, M. de L. Z. Costa, R. da S. Gonçalves, J. M. M. Walder, M. S. Garcia, e D. E. Nava. 2013.** Artificial diets for the rearing of adult and larvae of South-American fruit fly. *Pesqui. Agropecuária Bras.* 48: 1309–1314.
- Ovruski, S., M. Aluja, J. Sivinski e R. Wharton. 2000.** Hymenopteran parasitoids on fruit-infesting tephritidae (Diptera) in Latin America and the Southern United States: Diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. *Integr. Pest Manag. Rev.* 5: 81–107.
- Paranhos, B. J., J. Sivinski, C. Stuhl, T. Holler, e M. Aluja. 2013.** Intrinsic competition and competitor-free-space influence the coexistence of parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae) of Neotropical Tephritidae (Diptera). *Environ. Entomol.* 42: 717–723.
- Poncio, S. 2015.** Bioecologia e técnicas de criação de parasitoides (Hymenoptera) nativos de três espécies de *Anastrepha* no Brasil e no México (Tese).

- Purcell, M. F., C. G. Jackson, J. P. Long, e M. A. Batchelor. 1994.** Influence of guava ripening on parasitism of the oriental fruit-fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae), by *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) and other parasitoids. *Biol. Control.* 4: 396–403.
- Salt, G.1963.** The defence reactions of insects to metazoan parasites. *Parasitology.* 53: 527–642.
- Silvers, M. J., e A. J. Nappi. 1986.** In vitro study of physiological suppression of supernumerary parasites by the endoparasitic wasp *Leptopilina heterotoma*. *J. Parasitol.* 72: 405–409.
- Sivinski, J.1991.** The influence of host fruit morphology on parasitization rates in the caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. *Entomophaga.* 36: 447–454.
- Vargas, R. I., L. Leblanc, E. J. Harris, e N. C. Manoukis. 2012.** Regional suppression of *Bactrocera* fruit flies (Diptera: Tephritidae) in the Pacific through biological control and prospects for future introductions into other areas of the world. *Insects.* 3: 727–742.
- Wang, X.-G., e R. H. Messing. 2004.** Potential interactions between pupal and egg- or larval-pupal parasitoids of tephritid fruit flies. *Environ. Entomol.* 33: 1313–1320.
- Wang, X., R. H. Messing, e R. C. Bautista. 2003.** Competitive superiority of early acting species: a case study of opiine fruit fly parasitoids. *Biocontrol Sci. Technol.* 13: 391–402.

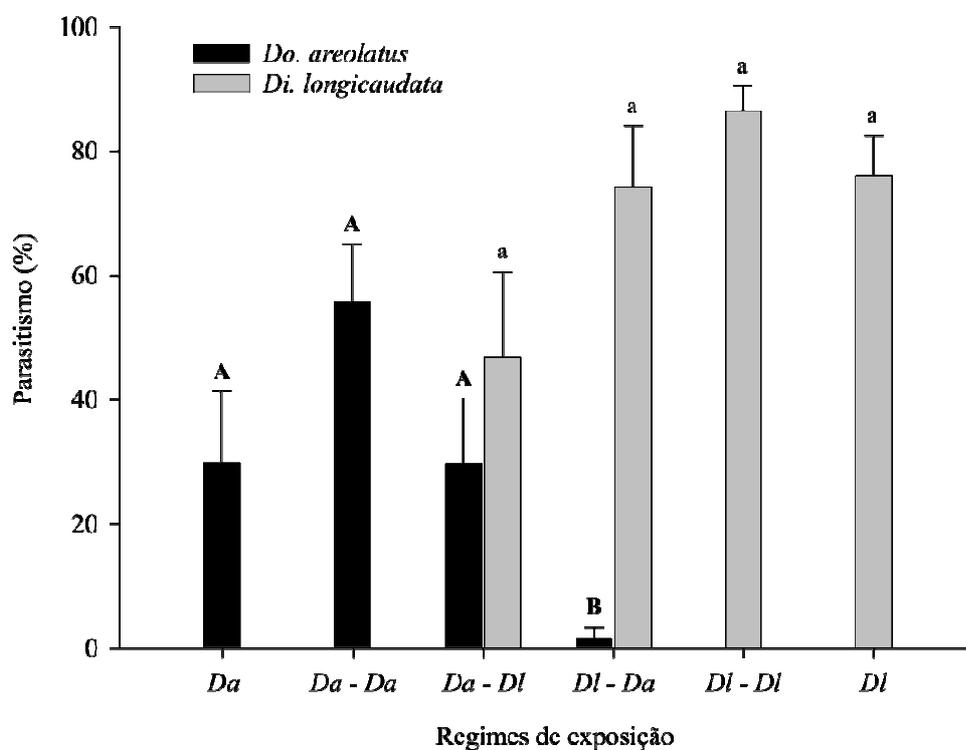


Fig. 1. Parasitismo (EP) de larvas de *A. fraterculus* submetidas a diferentes regimes de exposição. Barras com a mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal Wallis ($\alpha \leq 0,05$) (Letras maiúsculas se referem a comparação das médias de *Do. areolatus* e letras minúsculas se referem a comparação das médias de *D. longicaudata*).

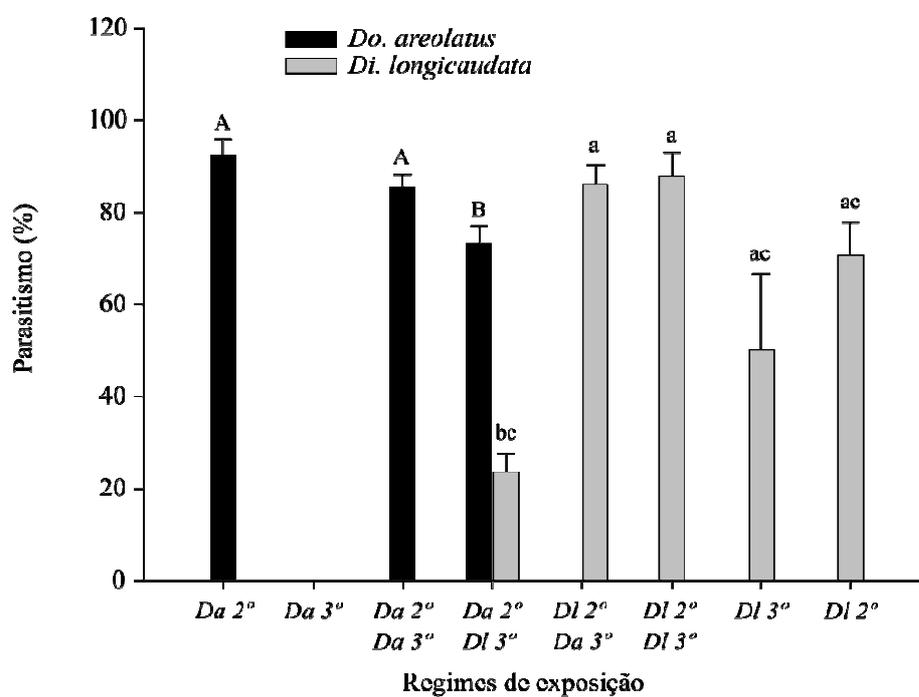


Fig. 2. Parasitismo (EP) de larvas de *A. fraterculus* de diferentes ínstares submetidas a diferentes regimes de exposição. Barras pretas com a mesma letra maiúscula não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha \leq 0,05$). Barras cinzas com a mesma letra minúscula não diferem significativamente entre si pelo teste de Kruskal Wallis ($\alpha \leq 0,05$).

Artigo 6 - Revista: BioControl

7 - Artigo 6

O efeito da experiência de *Fopius arisanus* no parasitismo de *Bactrocera dorsalis*

Rafael da Silva Gonçalves¹, Nicholas Chirivas Manoukis², Dori Edson Nava³

¹ Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Fitossanidade, Programa de Pós-graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Capão do Leão, RS 96010-900, Brasil. Email: rafaeldasilvagoncalves@gmail.com

² United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service, US Pacific Basin Agricultural Research Center, 64 Nowelo St., Hilo, HI 96720, USA. Email: nicholas.manoukis@ars.usda.gov

³ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Clima Temperado, Rodovia BR 392 Km 78, Pelotas, RS 96010-971, Caixa Postal 403, Brasil. Email: dori.edson-nava@embrapa.br

Resumo

Fopius arisanus (Sonan) (Hymenoptera: Braconidae) é uma importante espécie de parasitoide de ovos e eventualmente de larvas de primeiro instar de moscas-das-frutas. Esta espécie tem sido utilizada em diversos países para o manejo de diversas espécies de tefritídeos. Um aspecto da biologia reprodutiva de parasitoides himenópteros que recentemente recebeu maior atenção é o papel da apreensão. Neste estudo, nós examinamos o efeito de experiências prévias de parasitismo sobre as taxas de parasitismo de *F. arisanus*, utilizando como hospedeiro, ovos de *Bactrocera dorsalis* Hendel (Diptera: Tephritidae). Os resultados indicam que a eficiência de parasitismo de *F. arisanus* é incrementada por experiências prévias de parasitismo e que este efeito independe da idade dos parasitoides. Os resultados são discutidos considerando as implicações sobre criações massais, bem como, a respeito da eficiência deste parasitoide em campo.

Palavras-chave: Braconidae, Tephritidae, controle biológico, criação massal

The effect of *Fopius arisanus* experience on parasitization of *Bactrocera dorsalis*

Abstract

Fopius arisanus (Sonan) (Hymenoptera: Braconidae) is an important species of parasitoid of eggs and eventually larvae of first instar of fruit flies. This species has been used in many countries for the management of several species of tephritids. An aspect of the reproductive biology of hymenopterous parasitoids that has recently received increased attention is the role of learning. In this study, we examined the effect of previous experiences of parasitism on parasitization rates of *F. arisanus* parasitization rates, using as host, eggs of *Bactrocera dorsalis* Hendel (Diptera: Tephritidae). Our results indicate that the parasitism efficiency of this parasitoid, is increased by previous experience of parasitism and that this effect is independent of the age of the parasitoids. Our findings are discussed considering the implications for mass rearing, as well as on the efficiency of this parasitoid in the field.

Key words: Braconidae, Tephritidae, biological control, mass rearing

Introdução

O parasitoide coinobionte ovo-larval *Fopius arisanus* (Sonan) é um importante agente de controle de tefritídeos praga, particularmente *Bactrocera dorsalis* (Hendel) e *Ceratitis capitata* (Wiedemann), embora também seja conhecido por atacar *Bactrocera latifrons* e *Bactrocera cucurbitae* (Bokonon-Ganta et al. 2007; Harris et al. 2010). *F. arisanus* é conhecido como uma espécie altamente eficiente (Clausen et al. 1965; Rouse et al. 2005; Vargas et al. 2012b), com taxas de parasitismo superiores a 50 % em condições de campo em alguns casos (Vargas et al. 1993; Purcell 1998; Vargas et al. 2012a).

Devido as introduções e estabelecimentos bem sucedidos, inicialmente no Havaí e recentemente na Polinésia Francesa, este braconídeo foi introduzido em dez países do Pacífico, Ilhas Reunião, Austrália, Israel, México e Costa Rica (Vargas et al. 2007; Vargas et al. 2012a). Entretanto, *F. arisanus* foi responsável por deslocar outras espécies de parasitoides no Havaí, onde foi um dos 32 inimigos naturais introduzidos entre 1947 e 1953 (Bess et al. 1961; Vargas et al. 2012a).

O aumento na utilização de *F. arisanus* como agente de controle biológico foi possível devido ao desenvolvimento de técnicas de criação em dieta artificial para esta espécie (Bautista et al. 1999; Manoukis et al. 2011), que foi historicamente considerada de difícil multiplicação (Haramoto 1953; Chong 1962; Snowball e Wilson 1962; Ramadan et al. 1992a; Ramadan et al. 1994a). Criações massais permitem o desenvolvimento de programas de liberação aumentativa, bem como, o aumento da probabilidade de estabelecimento da espécie. Parâmetros reprodutivos e comportamentais críticos, tiveram que ser mensurados para a manutenção de colônias e viabilização da criação massal, incluindo a idade em que ocorre o pico de oviposição (Ramadan et al. 1994a; Wang e Messing 2003), o efeito da idade das fêmeas sobre a razão sexual da população descendente (Bautista et al. 1998), e a adaptabilidade de diferentes linhagens as condições de laboratório (Harris e Okamoto 1991).

Além destes estudos fundamentais, destinados a possibilitar a criação massal, um aspecto reprodutivo de parasitoides himenópteros que recebeu recentemente maior atenção é o papel do aprendizado (Giunti et al. 2015). Para *F. arisanus*, existem algumas pesquisas sobre aprendizagem via associação de pistas olfativas e visuais indicando que estas podem ter alguma função para detecção de hospedeiros (Dukas e Duan 2000; Rousse et al. 2007). Além de estar envolvido na detecção de ovos ou larvas adequados, o aprendizado tem sido considerado um fator adaptativo que auxilia fêmeas a evitar o superparasitismo (Wang e Messing 2008).

Neste estudo nós examinamos o papel da experiência de oviposição sobre as taxas de parasitismo de *F. arisanus*. Nós hipotetizamos que fêmeas com experiências prévias de oviposição serão mais eficazes no parasitismo de ovos de tefritídeos, provavelmente por meio da aprendizagem de estratégias para localizar e parasitar os ovos.

Material e Métodos

Material biológico

Os insetos utilizados nos estudos foram obtidos das colônias de manutenção do USDA-ARS US Pacific Basin Agricultural Research Center (PBARC) em Hilo, Hawaii, USA. A colônia de manutenção de *B. dorsalis* teve início com coletas em Puna, Ilha do Havaí em 1984 e foi mantida de acordo com a metodologia proposta por Vargas (1989) e Spencer e Fujita (1997). Desde aquele tempo, estes insetos foram mantidos com dieta artificial (Tanaka 1969) em gaiolas $0,6 \times 1,18 \times 1,32$ m a densidades de aproximadamente 50 mil por jaula com introdução periódica de material selvagem para manter diversidade genética. Para a criação de *F. arisanus* foi utilizado como protocolo padrão os trabalhos de Bautista et al. (1999) e Manoukis et al. (2011). A colônia no USDA-ARS teve seu início aproximadamente

em 1995, e tem sido mantida em gaiolas de $0,25 \times 0,25 \times 0,25$ m com aproximadamente 600 adultos. As criações de manutenção e os experimentos foram realizados sob condições padrões do laboratório do USDA-ARS (Temperatura: 27 ± 1 °C, Umidade relativa: 80 ± 10 % UR e Fotofase de 12 horas).

Experimento 1 - Efeito da experiência de oviposição das fêmeas de *F. arisanus*

Este bioensaio foi dividido em duas etapas, uma de preparação dos insetos e a seguinte de execução do teste propriamente dito. Durante a fase de preparação fêmeas de *F. arisanus*, com três dias de idade, foram mantidas em grupos de 100 em gaiolas teladas de $0,25 \times 0,25 \times 0,25$ m conforme descrito por Manoukis et al. (2011). Cada grupo foi submetido a um regime de experiência (tratamentos), os quais foram: T1 - uma experiência de oviposição no terceiro dia de vida, T2 - três experiências de oviposição, terceiro, quinto e sétimo dia de vida, T3 - cinco experiências de oviposição (do terceiro ao sétimo dia de vida e T4 - sem experiência de oviposição.

Após a etapa de preparação, que ocorreu durante a primeira semana de vida das fêmeas, o experimento foi executado. Para tal, 50 fêmeas de cada tratamento foram aleatoriamente selecionadas e mantidas em grupos de 10 em gaiolas plásticas (400 mL). Foram ofertados 20 ovos de *B. dorsalis*, com 2 horas de idade, para cada fêmea por um período de 22 horas (total por gaiola plástica com 10 fêmeas = 200 ovos). Os ovos foram depositados sobre um pedaço de papel (4 cm de diâmetro), o qual foi colocado sobre uma placa de ágar, e ofertados às fêmeas. Como controle, dois grupos com 100 ovos não foram expostos à *F. arisanus*, mas foram mantidos sob as mesmas condições experimentais.

Após o término do período de exposição, 50 ovos foram dissecados para determinação dos percentuais de parasitismo e superparasitismo. Os demais 150 ovos foram transferidos para dieta de desenvolvimento larval (Manoukis et al. 2011) e utilizados 24 horas após, para

determinação da taxa de eclosão. Após a formação dos pupários, todas as pupas recuperadas de cada repetição de todos tratamentos e do grupo controle, foram mantidas em frascos plásticos (250 mL), e checadas por quatro semanas, a fim de determinar o número de machos e fêmeas de *F. arisanus* emergidos e não emergidos (parasitoide formados, mas que não emergiram). Este experimento foi repetido quatro vezes entre os meses de Abril e Maio de 2015.

Experimento 2 - Efeito da idade das fêmeas de *F. arisanus*

Para este bioensaio foram utilizadas fêmeas de *F. arisanus*, presumidamente acasaladas, de três idades diferentes (uma, duas e três semanas de vida) e sem experiência de parasitismo, as quais foram mantidas em gaiolas plásticas (400 mL) em grupos de 10. A quantidade de ovos ofertada por fêmea e como controle, bem como, a forma de manuseio dos mesmos, as condições experimentais utilizadas e os parâmetros biológicos avaliados foram os mesmos descritos no experimento 1. Este experimento foi repetido quatro vezes durante o mês de junho de 2015.

Análise estatística

Para o experimento 1 os dados das variáveis, percentual de parasitismo, superparasitismo, eclosão, bem como, de parasitoides emergidos e não emergidos, e o número de pupas foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk, à homocedasticidade pelo teste de Hartley e a independência dos resíduos por análise gráfica. Não foi necessário realizar a transformação dos dados, assim, os mesmos foram submetidos à análise de variância por meio do teste F ($\alpha \leq 0.05$). Quando constatada significância estatística, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Para a variável razão

sexual os pressupostos da ANOVA não foram atendidos, e os tratamentos foram comparados com a aplicação do teste de Friedman ($\alpha \leq 0.05$).

No experimento 2, os dados de todas as variáveis foram checados quanto a normalidade, homocedasticidade e independência dos resíduos, e submetidos a análise de variância conforme descrito para o experimento 1. Os dados da variável superparasitismo foram transformados em $\sqrt{x} + 1$ e os referentes a razão sexual foram transformados utilizando-se o método da potência ótima de Box-Cox. Para a comparação das médias aplicou-se o teste de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa R (R Development Core Team 2015).

Resultados

Experimento 1 - Efeito da experiência de oviposição das fêmeas de *F. arisanus*

Verificou-se diferença significativa no percentual de ovos de *B. dorsalis* parasitados ($F = 8,10$; $df = 3$; $p = 0,006$) e superparasitados ($F = 8,92$; $df = 3$; $p = 0,004$) por fêmeas de *F. arisanus* com diferentes níveis de experiência de oviposição. Fêmeas com três e cinco experiências de oviposição apresentaram as maiores taxas de parasitismo e superparasitismo (Fig. 1). Entretanto, não foi observada diferença significativa ($F = 0,905$; $df = 4$; $p = 0,492$) entre os diferentes regimes de oviposição e o controle, em relação a taxa de eclosão dos ovos (Fig. 1).

O nível de experiência de parasitismo das fêmeas de *F. arisanus* também afetou significativamente a proporção de parasitoides emergidos ($F = 7,66$; $df = 3$; $p = 0,007$). Fêmeas com três experiências de oviposição geraram a maior proporção de parasitoides emergidos, aproximadamente 80%, diferindo significativamente das fêmeas sem experiência de oviposição (Fig. 2). Entretanto, não verificou-se diferença significativa para o percentual de parasitoides não emergidos ($F = 2,63$; $df = 3$; $p = 0,114$). Além disso, não foi observada

diferença significativa na razão sexual das populações descendentes ($\chi^2 = 0$; $df = 3$; $p = 1$) (Fig. 2).

Experimento 2 - Efeito da idade das fêmeas de *F. arisanus*

Os resultados apresentados na tabela 1, demonstram que a eficiência de parasitismo de fêmeas de *F. arisanus* variou de 22.20 a 36 %, porém não foi influenciada pela idade dos insetos. Além disso, as taxas de superparasitismo também não foram significativamente afetadas pela idade das fêmeas ($F = 4,49$; $df = 2$; $p = 0,06$). Foi observado efeito do parasitismo sobre a eclosão dos ovos, pois todos os tratamentos em que os ovos foram expostos aos parasitoides, o percentual de eclosão foi significativamente inferior ao do grupo controle ($F = 0,52$; $df = 3$; $p = 0,68$) (Tabela 1).

Em relação a proporção de parasitoides emergidos, não foi constatada diferença significativa entre os tratamentos ($F = 2,71$; $df = 2$; $p = 0,145$) entre os tratamentos (Tabela 2). A idade das fêmeas também não teve impacto significativo sobre o percentual de parasitoides não emergidos ($F = 2,45$; $df = 2$; $p = 0,17$) e a razão sexual da população descendente ($\chi^2 = 0,5$; $df = 2$; $p = 0,78$).

Discussão

O estudo dos aspectos reprodutivos de *F. arisanus* foi um dos principais passos para o avanço no desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de criação deste parasitoide (Ramadan et al. 1994b; Bautista et al. 1998; Bautista et al. 1999; Wang e Messing 2003; Manoukis et al. 2011). Neste contexto, o impacto da idade das fêmeas sobre a razão sexual da população descendente (Bautista et al. 1998) e a caracterização do período reprodutivo (Wang e Messing 2003) foram cruciais para a construção de protocolos de criação. Entretanto,

estudos recentes demonstram que o processo de aprendizado pode ter papel fundamental sobre a capacidade reprodutiva de parasitoides (Giunti et al. 2015).

Os resultados apresentados aqui, demonstram que as taxas de parasitismo e superparasitismo de *F. arisanus* não foram influenciadas pela idade das fêmeas (Tabela 1). Além disso, o número de parasitoides emergidos e não emergidos produzidos por fêmeas de diferentes idades também foi similar (Tabela 2). Estes resultados podem ser explicados pela análise conjunta de dois fatores. O primeiro se refere a biologia reprodutiva deste parasitoide. De acordo com Ramadan et al. (1992b) fêmeas de *F. arisanus* emergem com uma pequena reserva de ovos e atingem o pico de produção entre o quarto e o sexto dia de vida após a emergência, quando então a produção declina com o envelhecimento das fêmeas. O segundo fator a ser considerado nesta explicação foi objeto dos estudos desenvolvidos por Wang e Messing (2003). Estes autores demonstraram que a disponibilidade de hospedeiros (que aqui é traduzida como experiência de oviposição) é fundamental para estimular o processo de maturação de novos ovos e retardar o processo de reabsorção daqueles já produzidos.

A taxa de eclosão dos ovos não foi afetada pela idade das fêmeas, no entanto, verificou-se que a exposição dos ovos de *B. dorsalis* ao parasitismo reduziu a eclosão dos mesmos (Tabela 1). No que diz respeito a razão sexual da população descendente verificou-se que a mesma não foi influenciada pela idade das fêmeas (Tabela 2). Este resultado vai de encontro ao de Bautista et al. (1998) que observaram redução na proporção de fêmeas geradas com o aumento na idade das fêmeas de *F. arisanus*.

A eficiência de parasitismo de *F. arisanus* foi afetada pelo nível de experiência das fêmeas. Insetos com 3 e 5 experiências de parasitismo durante a primeira semana de vida apresentaram taxas de parasitismo duas vezes superior ao de insetos sem experiência (Fig. 1). Como consequência o número de parasitoides emergidos produzidos por fêmeas com experiência também foi superior (Fig. 2). Estes resultados podem ser explicados pelos efeitos

fisiológicos oriundos da experiência de oviposição. Segundo Wang e Messing (2003) o processo de oviposição em *F. arisanus* é responsável por estimular a maturação de ovos, dessa forma, quanto maior o número de ovos depositados maior será o número de ovos maduros produzidos.

De acordo com Manoukis et al. (2011) fêmeas de *F. arisanus* estão aptas ao parasitismo após uma semana da emergência e se mantêm produtivas por duas semanas. Nossos resultados, sugerem que a experiência de oviposição durante a primeira semana de vida das fêmeas pode colaborar para elevar a eficiência de produção dos sistemas de criação. Tal incremento de eficiência se dá pelo fato de que o tempo de vida útil das fêmeas é ampliado em uma semana e o potencial de parasitismo das mesmas é aumentado.

Diferentemente do reportado por Wang e Messing (2008), observamos que as taxas de superparasitismo foram significativamente maiores quanto maior a experiência das fêmeas. Embora diferentes estudos demonstrem a ocorrência de superparasitismo em condições de criação, teoricamente, este comportamento é uma estratégia a ser evitada em espécies solitárias, pois reduz o desempenho das mesmas (van Alphen e Visser 1990; González et al. 2007; Montoya et al. 2012). Uma possível razão para os nossos resultados é a associação entre a elevada carga de ovos maduros, devido ao estímulo das experiências de oviposição, e a competição intra-específica por hospedeiros (Fletcher et al. 1994; Yamada e Miyamoto 1998).

Montoya et al. (2000) ao estudar os efeitos do superparasitismo em criações massais de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) verificaram a existência de uma relação positiva inversa entre superparasitismo e a emergência de parasitoides. Nós não detectamos diferença significativa, para *F. arisanus*, entre os tratamentos para o parâmetro percentual de parasitoides não emergidos, contudo, ao analisar a figura 1 é possível verificar que os tratamentos onde as taxas de superparasitismo foram

maiores (três e cinco experiências de oviposição) a quantidade de parasitoides não emergidos também foi maior.

De acordo com Bautista et al. (1998) a proporção ideal de ovos/fêmea para *F. arisanus* é de 20:1, conforme utilizado neste estudo. Entretanto, com base em nossos resultados, é possível sugerir que a proporção ideal pode variar de acordo com o nível de experiência das fêmeas, e deve ser levada em consideração para evitar a ocorrência de superparasitismo, bem como, aumentar a eficiência dos sistemas de criação de *F. arisanus*.

Insetos são capazes de ajustar seu comportamento de forrageamento e oviposição em resposta a carga de ovos (Minkenberg et al. 1992). De acordo com a análise dos autores, fêmeas que possuem elevada carga de ovos procuram por hospedeiros de forma mais intensa e despendem menor tempo durante o processo de parasitismo. Se estas considerações também forem verdadeiras para *F. arisanus*, e considerando o fato de que para *F. arisanus* o estímulo de oviposição é responsável por provocar o aumento da carga de ovos, é possível sugerir que fêmeas com maior experiência de oviposição serão mais eficientes em condições de campo. Neste sentido, poderíamos sugerir que o número de insetos utilizados em liberações massais poderia ser reduzido.

Outra implicação dos resultados obtidos, se refere a eficiência de *F. arisanus* em função da flutuação populacional hospedeira. Populações de moscas-das-frutas contraem e expandem ao longo do ano e seus inimigos naturais tendem a acompanhar tais flutuações. Assim, é possível presumir que durante os períodos de crescimento da população hospedeira a eficiência de *F. arisanus* seja maior do que nos períodos de decréscimo. Se esta hipótese é verdadeira, seria recomendável realizar liberações complementares durante os períodos de limitação da oferta hospedeira, como forma de compensar a redução da eficiência dos parasitoides.

Nossos resultados demonstram que proporcionar experiências de oviposição para fêmeas de *F. arisanus* potencializa a eficiência de parasitismo. Além disso, maior número de descendentes são gerados. No entanto, a aplicação deste tipo de procedimento em condições de criação massal deve ser observada com cuidado, pois as taxas de superparasitismo aumentam com o nível de experiência das fêmeas, possivelmente devido a limitação de hospedeiros.

Agradecimentos

Nós agradecemos a experiência e dedicação do Sr. Thomas Mangine e a colaboração de Caley Saragosa. O autor Rafael da Silva Gonçalves agradece ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado no Brasil e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche no Hawaii, EUA (Processo número: 0122/14-9). Este trabalho foi financiado por United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service (USDA-ARS). Opiniões, descobertas, conclusões ou recomendações expressas nesta publicação são de responsabilidade dos autores e não refletem necessariamente as opiniões do USDA.

Referências

- Bautista RC, Harris EJ, Lawrence PO (1998) Biology and rearing of the fruit fly parasitoid *Biosteres arisanus*: Clues to insectary propagation. Entomol Exp Appl 89:79–85.
- Bautista RC, Mochizuki N, Spencer JP, et al (1999) Mass-rearing of the tephritid fruit fly parasitoid *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae). Biol Control 15:137–144.
- Bess HA, Van Den Bosch R, Haramoto FH (1961) Fruit fly parasites and their activities in Hawaii. Proc Hawaii Entomol Soc 17:367–378.

- Bokonon-Ganta AH, Ramadan MM, Messing RH (2007) Reproductive biology of *Fopius ceratitivorus* (Hymenoptera: Braconidae), an egg-larval parasitoid of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Biol Control* 41:361–367. doi: 10.1016/j.biocontrol.2007.02.011
- Chong M (1962) Production methods for fruit fly parasites. *Proc Hawaii Entomol Soc* 18:61–63.
- Clausen CP, Clancy DW, Chock QC (1965) Biological control of the oriental fruit fly (*Dacus dorsalis* Hendel) and other fruit flies in Hawaii. Agricultural Research Service. US Dept. of Agriculture
- Dukas R, Duan JJ (2000) Potential fitness consequences of associative learning in a parasitoid wasp. *Behav Ecol* 11:536–543. doi: 10.1093/beheco/11.5.536
- Fletcher JP, Hughes JP, Harvey IF (1994) Life expectancy and egg load affect oviposition decisions of a solitary parasitoid. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 258:163–167. doi: 10.1098/rspb.1994.0157
- Giunti G, Canale A, Messing RH, Donati E, Stefanini C, Michaud JP, Benelli G (2015) Parasitoid learning: Current knowledge and implications for biological control. *Biol Control*. doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.06.007
- González PI, Montoya P, Perez-Lachaud G, Cancino J, Liedo P (2007) Superparasitism in mass reared *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Biol Control* 40:320–326. doi: 10.1016/j.biocontrol.2006.11.009
- Haramoto FH (1953) The Biology of *Opius oophilus* Fullaway (Hymenoptera: Braconidae). MS thesis, University of Hawaii, Honolulu, HI.
- Harris EJ, Bautista RC, Vargas RI, et al (2010) Suppression of melon fly (Diptera: Tephritidae) populations with releases of *Fopius arisanus* and *Psytalia fletcheri*

- (Hymenoptera: Braconidae) in North Shore Oahu, HI, USA. *Biocontrol* 55:593–599. doi: 10.1007/s10526-010-9282-1
- Harris EJ, Okamoto RY (1991) A method for rearing *Biosteres arisanus* (Hymenoptera: Braconidae) in the laboratory. *J Econ Entomol* 84:417–422. doi: 10.1093/jee/84.2.417
- Manoukis N, Geib S, Seo D, et al (2011) An optimized protocol for rearing *Fopius arisanus*, a parasitoid of Tephritid fruit flies. *J Vis Exp JoVE* 53:e2901.
- Minkenbergh OPJM, Tatar M, Rosenheim JA (1992) Egg load as a major source of variability in insect foraging and oviposition behavior. *Oikos* 65:134–142. doi: 10.2307/3544896
- Montoya P, Liedo P, Benrey B, et al (2000) Functional response and superparasitism by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Ann Entomol Soc Am* 93:47–54. doi: 10.1603/0013-8746(2000)093[0047:FRASBD]2.0.CO;2
- Montoya P, Pérez-Lachaud G, Liedo P (2012) Superparasitism in the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) and the implications for mass rearing and augmentative release. *Insects* 3:900–911. doi: 10.3390/insects3040900
- R Development Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Ramadan MM, Wong TTY, Beardsley JW (1992a) Reproductive behavior of *Biosteres arisanus* (Sonan) (Hymenoptera: Braconidae), an egg-larval parasitoid of the Oriental fruit fly. *Biol Control* 2:28–34.
- Ramadan MM, Wong TTY, Beardsley JW (1992b) Reproductive behavior of *Biosteres arisanus* (Sonan) (Hymenoptera: Braconidae), an egg-larval parasitoid of the oriental fruit fly. *Biol Control* 2:28–34. doi: 10.1016/1049-9644(92)90072-L

- Ramadan MM, Wong TTY, McInnis D (1994a) Reproductive biology of *Biosteres arisanus* (Sonan), an egg-larval parasitoid of the oriental fruit fly. *Biol Control* 4:93–100.
- Ramadan MM, Wong TTY, Mcinnis DO (1994b) Reproductive biology of *Biosteres arisanus* (Sonan), an egg larval parasitoid of the oriental fruit fly. *Biol Control* 4:93–100. doi: 10.1006/bcon.1994.1016
- Rousse P, Chiroleu F, Domerg C, Quilici S (2007) Naive *Fopius arisanus* females respond mainly to achromatic cues. *Biol Control* 43:41–48. doi: 10.1016/j.biocontrol.2007.06.009
- Rousse P, Harris EJ, Quilici S (2005) *Fopius arisanus*, an egg-pupal parasitoid of Tephritidae. Overview. *Biocontrol News Inf* 26:59N–69N.
- Snowball GV, Wilson F (1962) Culture and consignment techniques used for parasites introduced against Queensland fruit fly (*Strumeta tryoni* Frogg.). *Aust J Agric Res* 13:233–248.
- Spencer JP, Fujita BH (1997) A procedural manual for mass rearing four species of tephritid fruit flies. USDA - ARS, Honolulu, USA
- Tanaka N, Steiner LF, Ohinata K, Okamoto R (1969) Low-Cost Larval Rearing Medium for Mass Production of Oriental and Mediterranean Fruit Flies. *J Econ Entomol* 62:967–968. doi: 10.1093/jee/62.4.967
- van Alphen JJM, Visser ME (1990) Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. *Annu Rev Entomol* 35:59–79. doi: 10.1146/annurev.en.35.010190.000423
- Vargas RI (1989) Mass production of tephritid fruit flies. In: Robinson AS, Hooper G (ed) *World crop pests fruit flies: their biology, natural enemies and control*, Elsevier, New York.
- Vargas RI, Stark JD, Uchida GK, Purcell M (1993) Opiine Parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) of Oriental Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) on Kauai Island, Hawaii:

- Islandwide Relative Abundance and Parasitism Rates in Wild and Orchard Guava Habitats. *Environ Entomol* 22:246–253. doi: 10.1093/ee/22.1.246
- Vargas RI, Leblanc L, Harris EJ, Manoukis NC (2012a) Regional suppression of *Bactrocera* fruit flies (Diptera: Tephritidae) in the Pacific through biological control and prospects for future introductions into other areas of the world. *Insects* 3:727–742.
- Vargas RI, Leblanc L, Putoa R, Eitam A (2007) Impact of introduction of *Bactrocera dorsalis* (Diptera:Tephritidae) and classical biological control releases of *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae) on economically important fruit flies in French Polynesia. *J Econ Entomol* 100:670–679.
- Vargas RI, Leblanc L, Putoa R, Piñero JC (2012b) Population dynamics of three *Bactrocera* spp. fruit flies (Diptera: Tephritidae) and two introduced natural enemies, *Fopius arisanus* (Sonan) and *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), after an invasion by *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in Tahiti. *Biol Control* 60:199–206. doi: 10.1016/j.biocontrol.2011.10.012
- Wang X-G, Messing RH (2003) Egg Maturation in the parasitoid *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae): do host-associated stimuli promote ovarian development? *Ann Entomol Soc Am* 96:571–578. doi: 10.1603/0013-8746(2003)096[0571:EMITPF]2.0.CO;2
- Wang X-G, Messing RH (2008) Role of egg-laying experience in avoidance of superparasitism by fruit fly parasitoid *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae). *Ann Entomol Soc Am* 101:656–663. doi: 10.1603/0013-8746(2008)101[656:ROEEIA]2.0.CO;2
- Yamada YY, Miyamoto K (1998) Payoff from self and conspecific superparasitism in a dryinid parasitoid, *Haplogonatopus atratus*. *Oikos* 81:209–216. doi: 10.2307/3547042

Tabela 1 Percentual de parasitismo, superparasitismo e eclosão (média \pm erro padrão) de ovos de *B. dorsalis* expostos para fêmeas de *F. arisanus* com diferentes idades.

Idade (semanas)	Parasitismo (%)	Superparasitismo (%)	Eclosão (%)
3	32,70 \pm 7,48 a	2,30 \pm 0,68 a	90.07 \pm 1.27 a
2	36,00 \pm 4,31 a	4,70 \pm 1,54 a	91.23 \pm 1.35 a
1	22,20 \pm 8,68 a	0,90 \pm 0,34 a	91.97 \pm 0.36 a
Control	NA	NA	91.25 \pm 1.24 a

Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si. Anova e Teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

NA - Não aplicável.

Tabela 2 Percentual de parasitoides emergidos e não emergidos, e razão sexual dos descendentes produzidos por fêmeas de *F. arisanus* com diferentes idades.

Idade (semanas)	Parasitoides		Razão sexual ²
	Emergidos (%) ¹ ± EP	Não emergidos (%) ¹ ± EP	
3	46,36 ± 10,30 a	2,57 ± 1,36 a	0,69 ± 0,01 a
2	44,63 ± 8,62 a	3,67 ± 1,94 a	0,68 ± 0,03 a
1	22,30 ± 7,81 a	0,70 ± 1,64 a	0,70 ± 0,01 a

¹ Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si. ANOVA e teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

² Valores seguidos pelas mesmas letras na coluna não diferem significativamente entre si. Qui-quadrado e teste de Friedman ($\alpha = 0,05$).

EP - erro padrão

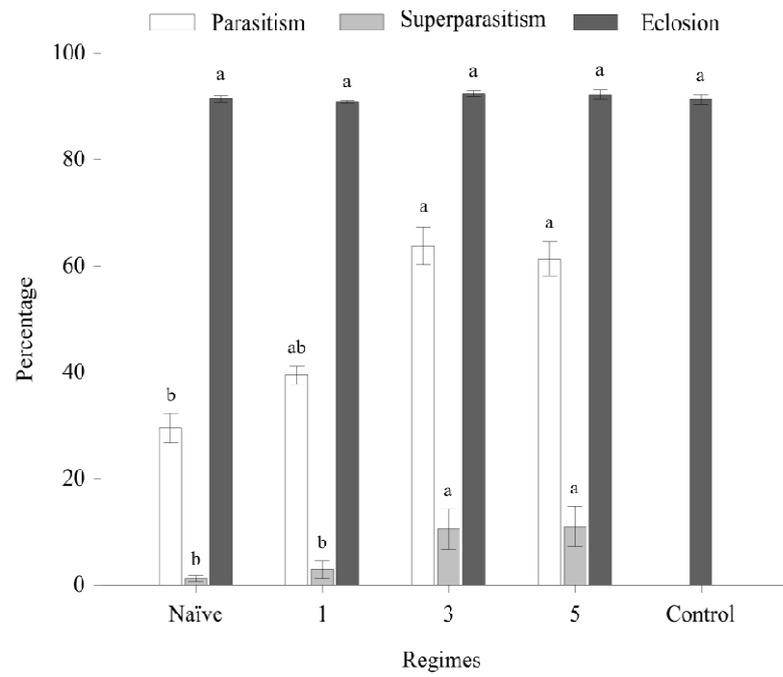


Fig. 1. Parasitismo, superparasitismo e eclosão de ovos de *B. dorsalis* expostos para fêmeas de *F. arisanus* com diferentes experiências de oviposição. As barras de erro representam o erro padrão.

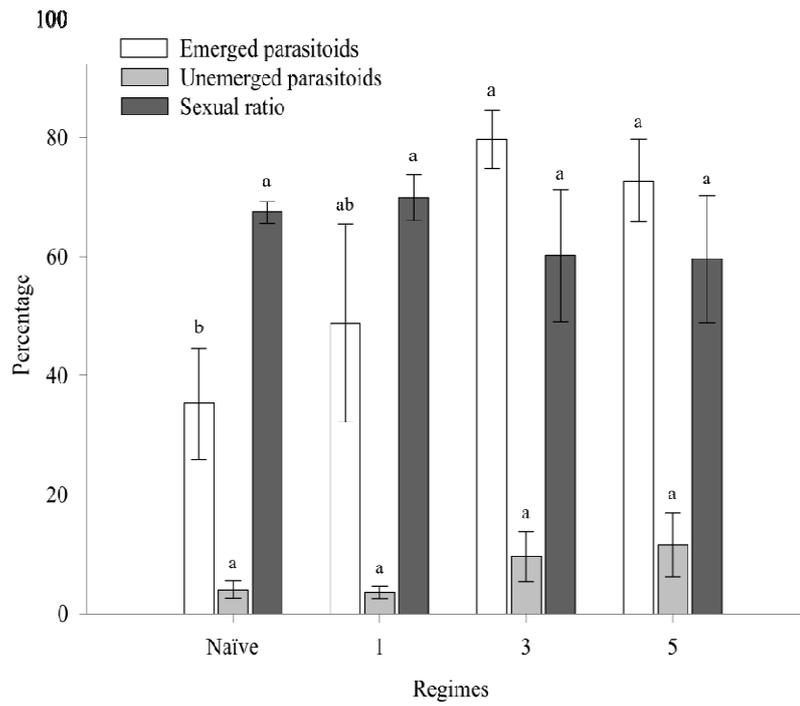


Figure 2. Percentual de parasitoides emergidos, não emergidos e razão sexual da população descendente produzida por fêmeas de *F. arisanus* com diferentes experiências de oviposição.

As barras de erro representam o erro padrão.

8 – Conclusões

- Larvas de segundo ínstar de *A. fraterculus* propiciam melhores condições para o desenvolvimento de *Do. areolatus*;
- A relação de 10 larvas de *A. fraterculus* por fêmea de *Do. areolatus* expostas por 12 pelo período de 12 horas permite maximizar a produção deste parasitoide;
- O desempenho de *Do. areolatus* é incrementado com o fornecimento de dieta com concentração de mel 60 %;
- Larvas de *A. fraterculus* possibilitam o melhor desenvolvimento das fases imaturas e adulta *Do. areolatus* em relação a *C. capitata*;
- O limiar térmico inferior de desenvolvimento (Tb) de machos e fêmeas de *Do. areolatus* são 8,04 e 8,15, respectivamente;
- A constante térmica de machos e fêmeas de *Do. areolatus* são 358,05 e 399,97 graus dias, respectivamente;
- O intervalo térmico de 22 a 25 °C é o ideal para a manutenção dos adultos de *Do. areolatus*;
- Fêmeas de *Do. areolatus* se utilizam de sinais químicos para discriminar frutos previamente explorados pelo heteroespecífico *Di. longicaudata*;
- O comportamento de busca hospedeira tanto de *Do. areolatus* quanto de *Di. longicaudata* é alterado quando as fêmeas destas espécies exploram frutos previamente explorados pela espécie competidora;
- Quando em vantagem temporal, *Do. areolatus* é capaz de superar seu competidor *Di. longicaudata*.
- A eficiência de parasitismo de *F. arisanus* é incrementada por experiências prévias de parasitismo e independente da idade das fêmeas.

9 - Referências

AGRIANUAL, Anuário da agricultura brasileira: Disponível em: <www.freshwap.net/681/dl/Agrianual+2010+Brasil> Acesso em: 20 out. 2010.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA 2015. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2015. 104p.

ARIOLI, C. J.; BOTTON, M.; CARVALHO, G. A. Controle químico da *Grapholita molesta* (Busck) (Lepidoptera: Tortricidae) na cultura do pessegueiro. **Ciência Rural**, v.34, p.1695-1700, 2004.

CANAL, N. A.; ZUCCHI, R. A. Parasitóides - Braconidae. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p.119-126.

CARVALHO, R. D. S.; NASCIMENTO, A. S. D. Criação e utilização de *Diachasmimorpha longicaudata* para controle biológico de moscas-das-frutas (Tephritidae). In: PARRA, J. R. P., et al. (Ed.). **Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores**. Barueri: Editora Manole, 2002. p.165-179.

DUARTE, A. L.; MALAVASI, A. Tratamentos quarentenários. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p.187-192.

EITAM, A.; SIVINSKI, J.; HOLLER, T.; ALUJA, M. Biogeography of braconid parasitoids of the Caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Florida. **Annals of the Entomological Society of America**, v.97, n.5, p.928-939, 2004.

FACHOLI, M.; UCHÔA, M. Comportamento sexual de *Anastrepha sororcula* Zucchi (Diptera, Tephritidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.50, p.406-412, 2006.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BAPTISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002.

GARCIA, F. R. M.; CAMPOS, J. V.; CORSEUIL, E. Análise faunística de espécies de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) na região Oeste de Santa Catarina. **Neotropical Entomology**, v.32, n.3, p.421-426, 2003.

IBRAF. **Estrutura da produção Brasileira**: IBRAF, 2010.

KNIPLING, E. F. **Principles of insect parasitism analyzed from new perspectives—practical implications for regulating insect populations by biological means**. Washington, DC: US Department of Agriculture - Agricultural Research Service, 1992. 348p.

MALAVASI, A.; NASCIMENTO, A. S. **Programa Biofábrica Moscamed Brasil: 8º Simpósio de Controle Biológico**. Águas de São Pedro: Sociedade Entomológica do Brasil, 2003. 52pp.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. 327p.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A.; SUGAYAMA, R. L. Biogeografia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p.93-98.

MESSING, R. H.; WANG, X.-G. Competitor-free space mediates non-target impact on an introduced biological control agent. **Ecological Entomology**, v.34, n.1, p.107-113, 2009.

MONTOYA, P.; LIEDO, P.; BENREY, B.; CANCINO, J.; BARRERA, J. F.; SIVINSKI, J.; ALUJA, M. Biological Control of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in mango orchards through augmentative releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, v.18, n.3, p.216-224, 2000.

MURDOCH, W. W.; BRIGGS, C. J. Theory for biological control: recent developments. **Ecology**, v.77, n. 7, p.344–366, 1996.

NAVA, D. E. Controle biológico de insetos-praga em frutíferas de clima temperado: uma opção viável, mais desafiadora. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007. 20 p. (Embrapa. Documentos 208).

NAVA, D. E.; BOTTON, M. **Bioecologia e controle de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* em pessegueiro**. Pelotas, RS: Embrapa Clima Temperado, 2010. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 315).

NAVA, D. E.; SILVA, E. S.; GUIMARÃES, J. A.; DIEZ-RODRIGUEZ, G. I.; GARCIA, M. S.; BATISTA FILHO, A.; LEITE, L. G.; RAGA, A.; SATO, M. E. Controle biológico de pragas das frutíferas. In: PINTO, A. S., et al. (Ed.). **Controle biológico de pragas na prática**. Barueri: Prol Editora, 2006. p.113-129.

NAVA, D.; MELO, M.; NUNES, A. M.; GARCIA, M. S.; BOTTON, M. **Mosca em surto**: Cultivar - Hortaliças e Frutas. Pelotas: Cultivar, 2008. 26-29p.

NORRIS, R. F.; CASWELL-CHEN, E. P.; KOGAN, M. Pesticides. In: NORRIS, R. F.; CASWELL-CHEN, E. P.; KOGAN, M. (Ed.). **Concepts in Integrated Pest Management**. New Jersey: Prentice Hall, 2002. p.242-313.

NUNES, A.; MÜLLER, F.; GONÇALVES, R.; GARCIA, M.; COSTA, V.; NAVA, D. Moscas frugívoras e seus parasitoides nos municípios de Pelotas e Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.42, n.1, p.6-12, 2012.

OVRUSKI, S. M.; COLIN, C.; SORIA, A.; OROÑO, L. E.; SCHLISERMAN, P. Introducción y producción en laboratorio de *Diachasmimorpha tryoni* y *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) para el control biológico de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) en la Argentina. **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, v.62, p.49-59, 2003.

OVRUSKI, S.; ALUJA, M.; SIVINSKI, J.; WHARTON, R. Hymenopteran parasitoids on fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the southern United States: diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. **Integrated Pest Management Reviews**, v.5, n.2, p.81-107, 2000.

PARANHOS, B. A. J.; WALDER, J. M.; ALVARENGA, C. D. Parasitismo de larvas da mosca-do-mediterrâneo por *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) em diferentes cultivares de goiaba. **Neotropical Entomology**, v.36, p.243-246, 2007.

PEDERSEN, B. S.; MILLS, N. J. Single vs. multiple introduction in biological control: the roles of parasitoid efficiency, antagonism and niche overlap. **Journal of Applied Ecology**, v.41, n.5 p.973–984, 2004.

REYES, J.; SANTIAGO, G.; HERNANDEZ, P. The Mexican fruit fly eradication programme. In: TAN, K. H. (Ed.). **Area-Wide Control of Fruit Flies and Others Pests**. Penang: Penerbit Universiti Sains Malaysia, 2000. p.377-380.

RICALDE, M. P. **Monitoramento e caracterização bioecológica e molecular de populações de *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae)**. 2010. 90f. (Mestrado em Fitossanidade) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

RUIZ, L.; FLORES, S.; CANCINO, J.; ARREDONDO, J.; VALLE, J.; DÍAZ-FLEISCHER, F.; WILLIAMS, T. Lethal and sublethal effects of spinosad-based GF-120 bait on the tephritid parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, v.44, n.3, p.296-304, 2008.

SALLES, L. A. B.; KOVALESKI, A. Moscas-das-frutas em macieira e pessegueiro no Rio Grande do Sul. **Hortisul**, v.1, p.5-9, 1990.

SIVINSKI, J. M.; CALKINS, C. O.; BARANOWSKI, R.; HARRIS, D.; BRAMBILA, J.; DIAZ, J.; BURNS, R. E.; HOLLER, T.; DODSON, G. Suppression of a Caribbean Fruit Fly (*Anastrepha suspensa* (Loew) Diptera: Tephritidae) population through augmented releases of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, v.6, n.2, p.177-185, 1996.

STARK, J. D.; VARGAS, R.; MILLER, N. Toxicity of spinosad in protein bait to three economically important tephritid fruit fly species (Diptera: Tephritidae) and their parasitoids (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Economic Entomology**, v.97, n.3, p.911-915, 2004.

ZART, M.; BOTTON, M.; FERNANDES, O. A. Injúrias causadas por mosca-das-frutas sul-americana em cultivares de videira. **Bragantia**, v.70, n.1, p.64-71, 2011.

ZUCCHI, R. A. Diversidad, distribución y hospederos del género *Anastrepha* en Brasil. In: HERNÁNDEZ-ORTIZ, V. (Ed.). **Moscas de la fruta en Latinoamérica (Diptera: Tephritidae): Diversidad, biología y manejo**. Distrito Federal, México: S y G, 2007. p.77-100.

ZUCCHI, R. A. Taxonomia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p.13-24