

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Tese

Bioecologia e técnicas de criação de parasitoides (Hymenoptera) nativos de três espécies de *Anastrepha* no Brasil e no México

Sônia Poncio

Pelotas, 2015

Sônia Poncio

**Bioecologia e técnicas de criação de parasitoides (Hymenoptera) nativos de
três espécies de *Anastrepha* no Brasil e no México**

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

Orientador: Dr. Dori Edson Nava

Co-Orientador: Dr. Mauro Silveira Garcia

Co-Orientador: Dr. Pablo Jesús Montoya Gerardo

Pelotas, 2015

Banca examinadora:

Dr. Dori Edson Nava (Orientador)

Dr. Adalécio Kowaleski

Dr. Aldo Malavasi Filho

Dra. Beatriz Aguiar Jordão Paranhos

Dr. Flávio Roberto Mello Garcia

Aos meus pais Maria e Luiz pelo exemplo de vida.
Aos meus irmãos Caroline e Danrlei pelo grande amor, carinho, compreensão,
paciência e incentivo constantes.

DEDICO E OFEREÇO

Agradecimentos

A Deus pela vida, proteção e graças concedidas, durante minha trajetória;

Aos meus familiares, em especial minha mãe Maria de Lourdes Poncio e meu pai Luiz Lourenço Poncio, por terem me dado a vida, por terem me ensinado a trilhar meu caminho, nunca esquecendo minha origem com muita dignidade. E meus irmãos Caroline e Danrlei, pela confiança, dedicação e amor;

Ao meu orientador Dr. Dori Edson Nava, pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Centro Nacional de Pesquisa Agropecuário de Clima Temperado (CPACT), pela oportunidade, atenção, ensinamentos, paciência e exemplo de profissionalismo;

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

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade (PPGFs), em especial ao Dr. Mauro Silveira Garcia pelos ensinamentos e atenção dispensada;

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e no Exterior (PDSE);

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

Ao Dr. Valmir Antônio Costa pela identificação dos parasitoides;

Ao Dr. Pablo Jesús Montoya Gerardo, pela confiança e disponibilidade em me orientar durante o Doutorado Sanduíche;

Ao Programa Moscafrut (SAGARPA-IICA) por proporcionar o desenvolvimento do Doutorado Sanduíche, assim como também por todo o material biológico disponibilizado para a realização dos estudos;

Ao Chefe de Departamento de Controle Biológico do Programa Moscafrut Dr. Jorge Luis Cancino Diaz, por sua amizade, dedicação e ensinamentos durante o Doutorado Sanduíche;

Aos companheiros do Departamento de Controle biológico do Programa Moscafrut: Amanda Patricia Ayala Ayala, Patricia Rosario, Florida López, Patricia López, César Galvez, Floriberto Mendez, Velisario Rivera e Alvaro Meza pelo auxílio e apoio em todos os momentos, bem como pela amizade construída;

Aos colegas e amigos do Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, em especial a Carolina Custódio Pinto e Cindy Chaves pelos momentos de discussão e distração e também conhecimentos compartilhados;

À minha grande amiga Dra. Adrise Medeiros Nunes, que esteve a meu lado em todos os momentos, dedicando-se por completo para a realização deste trabalho;

Aos amigos e colegas Rafael da Silva Gonçalves e Heitor Lisboa, por todas as dietas, esforços e noites em claro para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos amigos e colegas do laboratório de Entomologia da Embrapa Clima Temperado: Raul Borges da Cunha Filho, Felipe Andreazza, Naymã Pinto Dias,

Helter Carlos Pereira, Laísa Boechel Barcelos, Sandro Daniel Nörnberg, João Luis Osório Rosado, Anderson Bolzan, Tiago Scheunemann, Matheus de Souza Blanke, Anaise Rodales, Ricardo Braun Marangon, José Cesar Lazzari, Maicon Bisognin, Gabriela Inés Diez-Rodríguez, Franciéli Sassanovicz, Vinícius Zimmer, Francisco Cardoso Canez Neto, Eduardo Valmorbida e Jederson Luis Ferreira Borges pelos momentos de descontração e pela dedicação e apoio em todos os momentos, bem como pela amizade construída;

À Dra. Roberta Manica Berto, por toda sua atenção e disponibilidade para as análises estatísticas;

“AZAMIGAS” Graziela Szadkoski, Fabiele Possamai e Cândida Toni pelo carinho, incentivo e amizade;

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

Por fim, a todas as moscas e parasitoides!

Mais uma vez, muito obrigada!

Resumo

PONCIO, Sônia. **Bioecologia e técnicas de criação de parasitoides (Hymenoptera) nativos de três espécies de *Anastrepha* no Brasil e no México.** 2015. 133f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Dentre as principais pragas da fruticultura no Brasil, destacam-se as moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae). Dentre os inimigos naturais destas pragas, destaca-se o endoparasitoide larva-pupa *Doryctobracon brasiliensis* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) que possui ampla distribuição geográfica na América do Sul e parasita larvas de diferentes espécies de moscas-das-frutas, em diferentes hospedeiros. Estas características o fazem um potencial agente de controle biológico, especialmente de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae), principal espécie de mosca-das-frutas praga da fruticultura no sul do Brasil. Para o México, as duas principais espécies de moscas-das-frutas são *Anastrepha ludens* (Loew, 1873) (Diptera: Tephritidae) e *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) (Diptera: Tephritidae), as quais são hospedeiras de várias espécies de parasitoides nativos, com destaque para os das famílias Braconidae [*Utetes anastrephae* (Viereck 1913), *Doryctobracon crawfordi* (Viereck, 1911) e *Opius hirtus* Fischer, 1963], Eucoilidae [*Odontosema anastrephae* (Borgmeier, 1935)], Diapriidae [*Coptera haywardi* Loíacono, 1981] e Chalcididae (*Dirhinus* sp.) Assim, o objetivo deste trabalho foi conhecer a bioecologia e desenvolver técnicas de criação para parasitoides nativos de moscas-das-frutas. Para tal, foram realizados os seguintes estudos: I) desenvolvimento de uma metodologia de criação de *D. brasiliensis* em larvas de *A. fraterculus*; II) biologia de *D. brasiliensis* em diferentes temperaturas: tabela de vida de fertilidade e exigências térmicas; III) criação de parasitoides nativo das Américas para o controle biológico de *A. obliqua*; e IV) seria *A. obliqua* hospedeiro natural dos parasitoides nativos *D. crawfordi* e *O. hirtus*? No primeiro trabalho, onde se realizou experimentos visando o desenvolvimento de uma técnica de criação de *D. brasiliensis*, determinou-se que larvas de 3º instar de *A. fraterculus* são preferidas para o parasitismo em relação às do 1º e 2º instar. O tempo de 12h de exposição de larvas de *A. fraterculus* a fêmeas de *D. brasiliensis* propiciou a produção de um maior número de parasitoides, maior percentual de parasitismo e maior proporção de fêmeas na população descendente. A quantidade de 25 larvas de *A. fraterculus* oferecidas por fêmea de *D. brasiliensis*, propiciou a maior produção de parasitoides. O fornecimento de mel a 20% para os parasitoides é essencial para que se produza maior quantidade de descendentes e

sejam mais longevos. No segundo trabalho, observou-se que fêmeas mantidas nas diferentes temperaturas produziram uma maior quantidade de parasitoides na faixa térmica de 18 a 22°C, sendo que o número de descendentes gerados por fêmea variou de 99,4 a 173,8, respectivamente. A longevidade de machos e de fêmeas foi inversamente proporcional à temperatura, variando de 43,9 a 7,4 dias para fêmeas e de 24,4 a 4,6 dias para machos, nas temperaturas de 15 a 30°C, respectivamente. A duração do ciclo biológico (ovo-adulto) variou de 41,2 dias a 18°C para 20,9 dias a 25°C. Nas temperaturas de 15, 28 e 30°C não ocorreu desenvolvimento dos estágios imaturos de *D. brasiliensis*. A 20 e 22°C foram observados os maiores valores da taxa líquida de reprodução (R_0) e de razão finita de aumento (λ), de forma que na temperatura ótima estimada (21°C), a população de *D. brasiliensis* aumentou 47 vezes a cada geração. O limiar térmico inferior de desenvolvimento ou temperatura base (T_b) e a constante térmica (K) foram de 10,0°C e 303,2 graus-dia. No terceiro trabalho, determinou-se que nem todas as espécies de parasitoides estudadas, se desenvolvem com a mesma eficiência em imaturos de *A. obliqua*, onde *U. anastrephae* e *C. haywardi* apresentaram maior potencial para a criação em laboratório. *Utetes anastrephae* apresentou melhor desenvolvimento em larvas jovens (de 5 - 6 dias), das quais se obteve uma maior emergência de adultos e consequentemente, maior porcentagem de parasitismo, com maior taxa de sobrevivência. *Coptera haywardi* apresentou melhor desenvolvimento em pupas de 1 a 4 dias de idade, onde se obteve maior emergência, maior parasitismo, adultos com maior habilidade de voo e maior longevidade. No quarto trabalho, ficou evidenciado que *D. crawfordi* e *O. hirtus* preferem parasitar larvas de *A. ludens* e que não podem completar seu desenvolvimento em larvas de *A. obliqua*, apesar de ovipositarem neste hospedeiro. Ocorreu encapsulamento e melanização dos imaturos de ambas espécies de parasitoides. As informações obtidas nestes trabalhos contribuem para um maior conhecimento da bioecologia das espécies de parasitoides de moscas-das-frutas e propiciam o estabelecimento de técnicas de criação para estas espécies.

Palavras-chave: *Anastrepha fraterculus*, *Anastrepha obliqua*, *Anastrepha ludens*, Hymenoptera, Controle biológico, Moscas-das-frutas.

Abstract

PONCIO, Sônia. **Bioecology and rearing techniques of native parasitoids (Hymenoptera) of three species of *Anastrepha* spp. in Brazil and Mexico.** 2015. 133f. Thesis (Doctor degree). Post-Graduation Program in Phytosanitary. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Fruit flies (Diptera: Tephritidae) are among the main pests of the fruit crops in Brazil. Among the natural enemies, these pests are following the endoparasitoid larva-pupa *Doryctobracon brasiliensis* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) having wide geographical distribution in South America and it parasitizes larvae of different species of fruit flies, in different hosts. These characteristics confer *D. brasiliensis* potential agent for biological control, mainly of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae), the main species of fruit flies in southern Brazil. For Mexico, the two main species of fruit flies are *Anastrepha ludens* (Loew, 1873) (Diptera: Tephritidae) and *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) (Diptera: Tephritidae), which are hosts to several species of native parasitoids, especially of families Braconidae [*Utetes anastrephae* (Viereck 1913), *Doryctobracon crawfordi* (Viereck, 1911) and *Oppius hirtus* Fischer, 1963], Eucilidae [*Odontosema anastrephae* (Flashing, 1935)], Diapriidae [*Coptera haywardi* Loíacono, 1981] and Chalcididae (*Dirhinus* sp.). Thus, the objective of this study was to know the bioecology and to develop rearing techniques of native parasitoids of fruit flies. To this end, the following studies were conducted: I) development of a rearing technique of *D. brasiliensis* in larvae of *A. fraterculus*; II) biology of *D. brasiliensis* at different temperatures: fertility life table and thermal requirements; III) rearing parasitoids native to the Americas for biological control of *A. obliqua*; and IV) Is *A. obliqua* a natural host of native parasitoids *D. crawfordi* and *O. hirtus*? In the first work to develop a rearing technique of *D. brasiliensis*, it was determined that larvae of the 3rd instar of *A. fraterculus* are preferred for parasitism in relation to the 1st and 2nd instars. Exposure for 12-h of larvae of *A. fraterculus* to females of *D. brasiliensis* provided a larger numbers of parasitoids, higher parasitism rate and a higher rate of females in the offspring population. The number of 25 larvae of *A. fraterculus* offered to females of *D. brasiliensis* provided the largest production of parasitoids. The supply of honey at 20% to parasitoids is essential to generate a greater number of offspring with more longevity. In the second work, we observed that females kept at different temperatures produced more parasitoids at temperatures 18-22°C, and the number of offspring per female ranged from 99.4 to 173.8, respectively. Longevity of males and females was inversely proportional to temperature, ranging from 43.9 to 7.4 d for females and from 24.4 to 4.6 d for males, at temperatures 15-30°C, respectively. The duration of the biological cycle (egg-adult) ranged from 41.2 d at

18°C to 20.9 d at 25°C. At temperatures 15, 28 and 30° C, there was no development of immature stages of *D. brasiliensis*. At 20 and 22° C, we observed the high st values of the net reproduction rate (R_0) and finite reason of increase (λ), which means that at the estimated optimum temperature (21°C), the population of *D. brasiliensis* increased 47 times each generation. The lower temperature threshold for development or base temperature (T_b) and thermal constant (K) were 10.0°C and 303.2 degree/days. In the third work, we observed that not all parasitoid species studied develop with the same efficiency in larvae of *A. obliqua*, where *U. anastrephae* and *C. haywardi* showed the greatest potential for laboratory rearing. *Utetes anastrephae* showed better development in young larvae (5-6 d), which provided a greater emergence of adults and, consequently, higher parasitism rate, with higher survival rate. *Coptera haywardi* presented better development in pupae 1-4 d of age, where they obtained greater emergence and parasitism rates, adults with greater flying skills and greater longevity. In fourth work, we observed that *D. crawfordi* and *O. hirtus* prefer to parasitize larvae of *A. ludens* and that they cannot complete their development in larvae of *A. obliqua*, although they oviposit in this host. There is encapsulation and melanization of larvae in both parasitoid species. The information obtained in these works contribute to improve knowledge of bio-ecology of the parasitoid species of fruit flies and provide the establishment of rearing techniques for these species.

Keywords: *Anastrepha fraterculus*, *Anastrepha obliqua*, *Anastrepha ludens*, Hymenoptera, Biological Control, Fruit Flies.

Lista de Figuras

Artigo 1

- Figura 1 Número de parasitoides emergidos (A), percentual de parasitismo (B) e razão sexual (C) de *Doryctobracon brasiliensis* criados em larvas de *Anastrepha fraterculus* submetidas a oito diferentes tempos de exposição. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $70\pm 20\%$ e fotofase de 12h. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%)..... 38
- Figura 2 Número de parasitoides emergidos (A), percentual de parasitismo (B) e razão sexual (C) de *Doryctobracon brasiliensis*, quando oferecidos seis diferentes densidades de larvas de *Anastrepha fraterculus*. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $70\pm 20\%$ e fotofase de 12h. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%)..... 40
- Figura 3 Média, número máximo e porcentagem de parasitismo de *Doryctobracon brasiliensis* em seis diferentes densidades de larvas de *Anastrepha fraterculus*. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $70\pm 20\%$ e fotofase de 12h..... 41
- Figura 4 Ritmo diário de descendentes gerados por fêmeas de *Doryctobracon brasiliensis* criado em larvas de *Anastrepha fraterculus* em quatro diferentes fontes de alimento e sem alimento. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 20\%$ e fotofase de 12h..... 42
- Figura 5 Razão sexual diária de *Doryctobracon brasiliensis* criado em larvas de *Anastrepha fraterculus* em quatro diferentes fontes de alimento e sem alimento. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 20\%$ e fotofase de 12h..... 43
- Figura 6 Curvas de sobrevivência de machos (A) e fêmeas (B) de *Doryctobracon brasiliensis* criado em larvas de *Anastrepha fraterculus* mantidos com quatro diferentes fontes de alimentos e sem alimento. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de

70±20% e fotofase de 12h. Curvas identificadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si..... 44

Artigo 2

Figura 1	Número médio de descendentes por fêmea (A) e razão sexual (B) de <i>Doryctobracon brasiliensis</i> em larvas de <i>Anastrepha fraterculus</i> mantidos em seis diferentes temperaturas sob larvas de <i>Anastrepha fraterculus</i> . Umidade relativa do ar de 70±20% e fotofase de 12 horas (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).....	69
Figura 2	Número de descentes gerados diariamente (—) e acumulado (---) por fêmea de <i>Doryctobracon brasiliensis</i> em larvas de <i>Anastrepha fraterculus</i> mantidos em seis diferentes temperaturas. Umidade relativa do ar de 70±20% e fotofase de 12 horas.....	70
Figura 3	Razão sexual média (■) e diária (—) de <i>Doryctobracon brasiliensis</i> em larvas de <i>Anastrepha fraterculus</i> mantidos em seis diferentes temperaturas. Umidade relativa do ar de 70±20% e fotofase de 12 horas.....	70
Figura 4	Curvas de sobrevivência de machos (A) e fêmeas (B) de <i>Doryctobracon brasiliensis</i> em larvas de <i>Anastrepha fraterculus</i> mantidos em sete diferentes temperaturas. MS = Média de sobrevivência. Umidade relativa de 70±10% e fotofase de 12 horas. Curvas identificadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si.	71
Figura 5	Duração do desenvolvimento ovo-adulto de <i>Doryctobracon brasiliensis</i> em larvas de <i>Anastrepha fraterculus</i> mantidos em quatro diferentes temperaturas. Umidade relativa de 70±20% e fotofase de 12 horas. Colunas seguidas com letras diferentes diferem entre si pelo teste t ($p \pm 0.05$).....	72
Figura 6	Parâmetros da tabela de vida de fertilidade de <i>Doryctobracon areolatus</i> em larvas de <i>Anastrepha fraterculus</i> . A) Taxa líquida de reprodução (R_0); B) Taxa intrínseca de crescimento (R_m); C) Intervalo médio entre gerações (IMG); D) Tempo de duplicação (TD); e, E) Razão finita de crescimento (λ). As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%.....	74
Figura 7	Curva de velocidade de desenvolvimento do período ovo-adulto de <i>Doryctobracon brasiliensis</i> em larvas de <i>Anastrepha fraterculus</i> , mantidos em quatro diferentes temperaturas. Umidade relativa de 70±20% e fotofase de 12h.....	75

Artigo 3

Figura 1	Survival of <i>Utetes anastrephae</i> males (a) and females (b) emerging from <i>Anastrepha obliqua</i> that had its larva parasitized at 5, 6, 7 and 8 days.	96
Figura 2	Survival of <i>Coptera haywardi</i> males (a) and females (b) emerging from pupae of <i>Anastrepha obliqua</i> parasitized at 2, 6, 9 and 12 days.....	97

Artigo 4

Figura 1	Relationship between the number of scars and the number of immature <i>O. hirtus</i> parasitoids per pupa of (a) <i>A. ludens</i> and (b) <i>A. obliqua</i> exposed to the parasitoids as larvae in different Petri dishes within the same cage.	117
Figura 2	Relationship between the number of scars and the number of immature <i>D. crawfordi</i> parasitoids per pupa of (a) <i>A. ludens</i> and (b) <i>A. obliqua</i> exposed to the parasitoids as larvae in different Petri dishes within the same cage).	118

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Número de parasitoides, percentuais de parasitismo e razão sexual de <i>Doryctobracon brasiliensis</i> criado em larvas de <i>Anastrepha fraterculus</i> de primeiro, segundo e terceiro ínstares nos testes com e sem chance de escolha. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 20\%$ e fotofase de 12h.....	36
Tabela 2	Número médio ($\pm$ erro padrão) de descendentes por fêmea e razão sexual de <i>Doryctobracon brasiliensis</i> criado em larvas de <i>Anastrepha fraterculus</i> mantidos em quatro diferentes fontes de alimento e sem alimento. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 20\%$ e fotofase de 12h.....	42

Artigo 3

Tabela 1	Mean rates ($\pm$ SE) of mortality, emergence, parasitism, and sex ratio in larvae of <i>Utetes anastrephae</i> and <i>Odontosema anastrephae</i> at different ages.	94
Tabela 2	Mean rates ($\pm$ SE) of emergence, parasitism and sex ratio of <i>Coptera haywardi</i> and <i>Dirhinus</i> sp. in pupae of <i>Anastrepha obliqua</i> in age ranges: 1-4 days, 5-8 days, 9-11 days, and older than 12 days.	95

Artigo 4

Tabela 1	Average ($\pm$ SD) percentages of emerged parasitoids, emerged flies and dead larvae; unemerged parasitoids, unemerged flies and dried parasitoid pupae of <i>Anastrepha obliqua</i> and <i>A. ludens</i> exposed as larvae to <i>Opius hirtus</i> parasitoids.	113
Tabela 2	Average ($\pm$ SD) percentages of emerged parasitoids, emerged flies and dead larvae; unemerged parasitoids, unemerged flies and dried parasitoid pupae of <i>Anastrepha obliqua</i> and <i>A. ludens</i> exposed as larvae to <i>Doryctobracon crawfordi</i> parasitoids.	115
Tabela 3	Average ($\pm$ SD) percentage of <i>Anastrepha</i> pupae with scars, immature parasitoids and number of scars per pupa after exposure of <i>Anastrepha obliqua</i> and <i>A. ludens</i> larvae to adult parasitoids of <i>Opius hirtus</i> or <i>Doryctobracon crawfordi</i>	117

Sumário

1 Introdução Geral.....	19
Artigo 1 - Metodologia de criação de <i>Doryctobracon brasiliensis</i> (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) em larvas de <i>Anastrepha fraterculus</i> (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae)	25
Resumo	25
Abstract	26
Introdução	27
Material e métodos.....	29
Estabelecimento da criação de manutenção de <i>D. brasiliensis</i>	29
Preferência de parasitismo pelo instar larval de <i>A. fraterculus</i>	30
Tempo de exposição das larvas ao parasitismo.....	32
Definição do número de larvas de <i>A. fraterculus</i> a ser oferecido para cada fêmea.	32
Efeito de três diferentes concentrações de mel como alimento sobre adultos de <i>D. brasiliensis</i>	33
Parâmetros avaliados e análise estatística	34
Resultados	35
Preferência de instar larval de <i>A. fraterculus</i> para o parasitismo	35
Tempo de exposição de larvas ao parasitismo.	36
Definição do número de larvas de <i>A. fraterculus</i> a ser oferecido para cada fêmea	38
Efeito do alimento para adultos de <i>D. brasiliensis</i>	41
Discussão.....	44
Considerações finais	47
Agradecimentos	48
Referências	48

Artigo 2 - Efeito da temperatura na biologia de <i>Doryctobracon brasiliensis</i> (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae): Elaboração de tabela de vida e exigências térmicas.....	59
Resumo	59
Abstract	60
Introdução	61
Material e Métodos.....	63
Biologia de adultos de <i>D. brasiliensis</i>	65
Biologia de imaturos de <i>D. brasiliensis</i>	66
Elaboração da tabela de vida de fertilidade e determinação das exigências térmicas.....	66
Análise estatística	67
Resultados	67
Biologia de adultos de <i>D. brasiliensis</i>	67
Biologia de imaturos de <i>D. brasiliensis</i>	72
Tabela de vida de fertilidade e determinação das exigências térmicas.....	72
Discussão.....	75
Considerações finais	80
Referências	80
Artigo 3 - Mass rearing of native parasitoids from the Americas for biological control of <i>Anastrepha obliqua</i> (Macquart) (Diptera: Tephritidae).....	88
Abstract	88
Introduction.....	89
Material and Methods.....	91
<i>Study site</i>	91
<i>Biological material</i>	91
<i>Preference of U. anastrephae and O. anastrephae for host-larva age</i>	91
<i>Preference of C. haywardi and Dirhinus sp. for host-pupae age</i>	92
<i>Fitness tests</i>	92
<i>Statistical analysis</i>	93
Results	93
<i>Preference for age of larvae</i>	93
<i>Preference for ages of pupae</i>	94
<i>Potential analyses:</i>	96
Discussion	97
Acknowledgments	100
References	100

Artigo 4 - Is <i>Anastrepha obliqua</i> (Diptera: Tephritidae) a natural host of the Neotropical parasitoids <i>Doryctobracon crawfordi</i> and <i>Opius hirtus</i> ?	106
ABSTRACT	106
1. INTRODUCTION	107
2. MATERIALS AND METHODS.....	109
2.1 Study site.....	109
2.2 Biological material	110
2.3 Determination of host suitability.....	110
2.4 Statistical analysis	111
3. RESULTS.....	112
3.1 Host suitability	112
3.2 Oviposition scars and immature parasitoids per pupa.....	116
4. DISCUSSION	118
Acknowledgments	121
References	122
Considerações finais	129
Referências gerais	131

1 Introdução Geral

As moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) são consideradas um dos principais grupos de pragas agrícolas a nível mundial e, este *status* é devido principalmente, ao grande número de hospedeiros e alto impacto econômico causado em frutíferas tanto de regiões tropicais como de subtropicais (ALUJA; MANGAN, 2008). Este *status* de praga está relacionado com o custo e frequência em que é necessário utilizar medidas de controle nos programas fitossanitários a nível regional (ENKERLIN, 2005; GARCIA, 2009).

As moscas-das-frutas pertencem à família Tephritidae, cujas larvas alimentam-se de tecidos vegetais como a polpa e as sementes dos frutos e inflorescências, podendo ainda consumir o talo de diversas plantas (CHRISTENSON; FOOTE, 1960). Existem cerca de 4200 espécies descritas atacando frutos de importância econômica, mas apenas 1% destas possuem importância agrícola e, destas 10 espécies são consideradas pragas de maior relevância para a fruticultura mundial (HERNÁNDEZ-ORTIZ, 1992; ALUJA, 1994). As espécies que mais atenção tem recebido pelo impacto negativo que causam na produção e comercialização de frutos estão incluídas nos gêneros *Anastrepha*, *Rhagoletis*, *Bactrocera*, *Toxotrypana*, *Dacus* e *Ceratitis* (ALUJA, 1993; ZUCCHI, 2000).

Os tefritídeos estão amplamente distribuídos em todos os continentes, sendo que em algum deles, se encontram complexos de espécies (ARREDONDO; DÍAZ-FLEISCHER; PÉREZ-STAPLES, 2010). Um dos exemplos é o que ocorre com as moscas do gênero *Anastrepha*, endêmicas da América e que ocorrem desde o Texas até o norte da Argentina, incluindo a maioria das ilhas do Caribe (ALUJA, 1994). Neste gênero, destaca-se as espécies *A. fraterculus* (Wiedemann, 1830), *A. ludens* (Loew, 1873) e *A. obliqua* (Loew, 1862) (ZUCCHI, 2000).

O Brasil apresenta a maior diversidade de espécies de *Anastrepha* do continente americano, das quais, sete espécies são relatadas com importância econômica, sendo: *A. fraterculus* causando danos principalmente em frutos de plantas de Myrtaceae e Rosaceae; *A. grandis* (Macquart, 1846), praga exclusiva de plantas de Cucurbitaceae; *A. obliqua* encontrada infestando frutos de plantas de Myrtaceae e Anacardiaceae; *A. pseudoparallela* (Loew, 1873) infesta frutos de diferentes espécies de maracujá (*Passiflora* spp.); *A. sororcula* Zucchi, 1979, causa os maiores danos à produção de goiaba, e; *A. striata* e *A. zenildae* Zucchi, 1979, atacam entre outras espécies de Myrtaceae (ZUCCHI, 2000). Na América do Sul, *A. fraterculus* é uma das espécies de maior importância econômica e está distribuída entre os dois extremos latitudinais, ocupando ambientes bastante distintos. Na Argentina, Uruguai e Estados das regiões Sul e Sudeste do Brasil, é uma praga primária, havendo necessidade da adoção de medidas de controle para evitar perdas econômicas (MALAVASI; ZUCCHI; SUGAYAMA, 2000). Nos estados do Rio Grande do Sul e em Santa Catarina *A. fraterculus* é a espécie dominante, representando mais de 90% dos tefritídeos coletados (SALLES, 1995; KOVALESKI, 1997; GARCIA; LARA, 2006; NUNES et al., 2012).

As espécies de moscas-das-frutas do gênero *Anastrepha* de importância econômica no México se encontram amplamente distribuídas, incluindo as regiões Noroeste, Centro e Sul. Nestes locais, *A. ludens* infesta principalmente os citros (*Citrus* spp.) e a manga (*Mangifera indica* Linnaeus); já *A. obliqua* causa danos em ameixa mexicana ou “jobo” (*Spondias mombin* Linnaeus) e manga; enquanto *A. serpentina* (Wiedemann, 1830) infestam as sapotáceas como “mamey” (*Calocarpum mammosum* Linnaeus) e “chicozapote” (*Manilkara zapota* van Royen); e, *A. striata* Schiner, 1868 infesta frutos de goiaba (*Psidium guajava* Linnaeus) (HERNÁNDEZ-ORTIZ; ALUJA,1993).

O controle destas pragas vem sendo realizado de diferentes maneiras nestes distintos países. No Brasil, o controle populacional destas pragas é realizado com o uso de inseticidas organofosforados e piretroides em área total, seguindo um calendário predefinido para cada cultura (ARIOLI et al., 2004). As aplicações são realizadas por cobertura (área total) e/ou com uso de iscas-tóxicas (NAVA; BOTTON, 2010). Entretanto, com a retirada dos inseticidas organofosforados da grade de agrotóxicos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o controle de moscas-das-frutas fica restrito ao uso de inseticidas químicos. Assim, há necessidade de buscar novas alternativas de manejo de moscas-das-frutas para a fruticultura nacional. No México, o controle de moscas-das-frutas vem obtendo êxito desde 1992 com o estabelecimento da “Campanha Nacional contra Moscas das Frutas”, que possui o objetivo de controlar, suprimir e erradicar quatro espécies de importância econômica e quarentenária (*A. ludens*, *A. obliqua*, *A. striata* e *A. serpentina*). Este programa está baseado em quatro etapas: sendo a) monitoramento de populações com armadilhas e amostragem de frutos para determinar a presença, distribuição e densidade; b) práticas culturais e

aplicação de iscas-tóxicas seletivas a insetos benéficos; c) liberação massal de moscas-das-frutas estéreis e liberação inundativa de parasitoides; e d) aplicação de medidas quarentenárias para proteger as áreas de baixa prevalência e áreas livres de moscas-das-frutas (REYES et al., 2000). Para cumprir com o objetivo do programa, o Governo Federal mexicano estabeleceu em Metapa de Dominguez, Chiapas, uma biofábrica de produção de moscas estéreis e parasitoides, a fim de aplicar métodos altamente seletivos e ecológicos para a erradicação destas pragas.

Com o sucesso conquistado através da Técnica do Inseto Estéril para *A. ludens* e *A. obliqua* e do controle biológico inundativo por meio da liberação de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead, 1905) (Hymenoptera: Braconidae), o México vem sendo referência para outros países como Costa Rica, Guatemala, El Salvador, e EUA (Flórida e Havaí) com grandes programas de liberação de himenópteros parasitoides na busca pelo controle destas pragas.

Da mesma forma, no Brasil o controle biológico esta sendo incorporado como uma alternativa válida para os programas de controle de moscas-das-frutas (MATRANGOLO et al.,1998). Em 2004, foi introduzido o parasitoide *D. longicaudata* e liberado em diferentes regiões, porém a eficácia do parasitoide (índice de parasitismo) no controle de moscas-das-frutas ficou próxima de 12% e pode variar em função da região e das espécies de frutíferas e de mosca-das-frutas (CARVALHO; NASCIMENTO; MATRANGOLO, 2000). Por outro lado, o controle biológico natural de moscas-das-frutas no Brasil, sempre foi muito expressivo e estudos tem demonstrado o parasitismo natural de *A. fraterculus* por espécies nativas de braconídeos [*Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911), *Doryctobracon brasiliensis* (Szépligeti, 1911), *Doryctobracon crawfordi* (Viereck, 1911), *Utetes anastrephae* (Viereck, 1913), *Opius bellus* (Gahan, 1930)], figitídeos [*Aganaspis*

pelleranoi (Brèthes, 1924), *Odontosema anastrephae* (Borgmeier, 1935)], diaprídeos [*Coptera haywardi* Loíacono, 1981] e peteromalídeos [*Pachycrepoideus vindemmiae* (Rondani, 1875)] nas diferentes regiões produtoras, havendo casos com até 30% de controle (SALLES, 1996; UCHÔA-FERNANDES et al., 2003; AGUIAR-MENEZES; MENEZES; LOIÁCONO, 2003; GARCIA; CORSEUIL, 2004; ZUCCHI; MARINHO; SILVA, 2011). Assim, torna-se necessário o conhecimento do potencial de controle dos parasitoides nativos, visando sua produção em laboratório para programas de controle biológico aplicado.

Este trabalho teve como objetivo definir a bioecologia e desenvolver uma técnica de criação do parasitoide *D. brasiliensis*, para criação massal, com vistas de ser utilizado em programas de controle biológico aplicado de *A. fraterculus* no Brasil e avaliar o desenvolvimento dos parasitoides nativos *U. anastrephae*, *Opius hirtus* Fischer, 1963 (Hymenoptera: Braconidae), *D. crawfordi*, *O. anastrephae*, *C. haywardi* e *Dirhinus* sp. (Hymenoptera: Chalcididae) utilizando como hospedeiro *A. obliqua* no México.

Artigo 1 – Revista: Pesquisa Agropecuária Brasileira

Metodologia de criação de *Doryctobracon brasiliensis* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) em larvas de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae)

Sônia Poncio⁽¹⁾, Adrise Medeiros Nunes⁽²⁾, Rafael da Silva Gonçalves⁽¹⁾, Heitor Lisboa⁽¹⁾,
Mauro Silveira Garcia⁽¹⁾, Dori Edson Nava⁽³⁾

⁽¹⁾ Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Caixa Postal 354, CEP 96010-900 Pelotas, RS, Brasil. E-mail: soniaponcio@yahoo.com.br, rafaeldasilvagoncalves@gmail.com, heitorlisboa@hotmail.com, garciasmauro@yahoo.com.br

⁽²⁾ Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Universidade Federal de Pelotas, Caixa Postal 354, CEP 96010-970 Pelotas, RS, Brasil. E-mail: adrisenunes@gmail.com

⁽³⁾ Laboratório de Entomologia, Embrapa Clima Temperado Caixa Postal 403, CEP 96010-970, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: dori.edson-nava@embrapa.br

Resumo – O parasitoide *Doryctobracon brasiliensis* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) é um endoparasitoide larva-pupa de moscas-das-frutas nativo da região Neotropical e frequentemente associado a *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae). O objetivo do presente estudo foi obter informações para subsidiar o estabelecimento de uma técnica de criação de *D. brasiliensis* em larvas de *A. fraterculus*. Para tal foram realizados os seguintes experimentos: a) determinação do instar larval preferencial

para o parasitismo, b) definição do tempo de exposição das larvas ao parasitoide, c) definição da densidade de larvas de *A. fraterculus* a ser oferecido para cada parasitoide, e d) efeito do alimento para adultos de *D. brasiliensis*. Em todos os experimentos foram avaliados o número de descendentes, percentual de parasitismo e razão sexual e no experimento do efeito do alimento também foi determinada a longevidade de machos e fêmeas. Constatou-se que larvas de 3º instar de *A. fraterculus* são preferidas para o parasitismo em relação às do 2º e 1º instar, tanto no teste de livre escolha como no de confinamento. O tempo de 12h de exposição de larvas de *A. fraterculus* propiciou a produção de um maior número de parasitoides e maior percentual de parasitismo. A oferta de 15 larvas de *A. fraterculus* para cada fêmea de *D. brasiliensis* propiciou a maior produção de descendentes. O fornecimento de mel a 20 e 50% para os parasitoides é essencial para que produzam uma maior quantidade de descendentes e sejam mais longevos. Essas informações possibilitam a manutenção da criação durante todo o ano em laboratório.

Termos para indexação: Controle biológico, parasitoides, mosca-das-frutas sul-americana, fruticultura.

Rearing technique of *Doryctobracon brasiliensis* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) in larvae of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae)

Abstract – The parasitoid *Doryctobracon brasiliensis* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) is an endoparasitoid of larva-pupa of fruit flies native to the Neotropics and often associated with *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae). The aim of this study was to obtain information to support the development of a rearing technique of

D. brasiliensis in larvae of *A. fraterculus*. To this end, the following trials were carried out: a) determination the larval instar preference for parasitism, b) definition of exposure time of larvae to parasitoids; c) definition the density setting of larvae of *A. fraterculus* offered to each parasitoid, and d) effect of diet on adults of *D. brasiliensis*. In all trials, we evaluated the number of offspring, parasitism rate and sex ratio and in the experiment to investigate the effect of diet, we also determined the longevity of males and females. It was found that larvae of *A. fraterculus* in the 3rd instar are preferred for parasitism in relation to the 2nd and 1st instars, in the free-choice test and in confinement. The exposure time of 12 h of larvae of *A. fraterculus* produced larger numbers of parasitoids and higher parasitism rates. The offer of 15 larvae of *A. fraterculus* to each female of *D. brasiliensis* provides greater production of offspring. The supply of honey at 20 and 50% to parasitoids is essential to produce a larger number of offspring with greater longevity. This information allows to keep the rearing in the laboratory throughout the year.

Index terms: Biological control, parasitoids, fruit flies south american, fruit production.

Introdução

A criação e liberação de parasitoides exóticos para o controle de diversas espécies de moscas-das-frutas tem sido realizada com êxito em diversos países (Wong et al., 1991; Duan & Messing, 1997; Montoya et al., 2000a, 2005, 2013; Sivinski et al., 2000; Carvalho, 2005; Mohamed et al., 2008; Harris et al., 2010). No Brasil, o foco do controle biológico de moscas-das-frutas também foi a introdução dos parasitoides *Tetrastichus giffardianus* Silvestri, 1915 (Hymenoptera: Eulophidae) (Autuori, 1938), *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead, 1905) (Hymenoptera: Braconidae) (Carvalho et al., 2000; Walder et al., 1995) e recentemente, *Fopius arisanus* (Sonan, 1932) (Hymenoptera: Braconidae) (Paranhos et al., 2013), visando o estabelecimento de programas de controle biológico clássico. Além disto, estudos têm sido

realizados visando o conhecimento dos parasitoides nativos, que são encontrados com frequência associados a diferentes espécies de moscas-das-frutas. Os estudos com parasitoides nativos estão relacionados com ocorrência, distribuição e análise faunística (Canal et al., 1994, 1995; Leonel et al., 1995; Salles, 1996; Guimarães et al., 1999; Garcia & Corseuil, 2004; Nunes et al., 2013), comportamento (Guimarães & Zucchi, 2004) e taxonomia (Canal & Zucchi, 2000; Guimarães et al., 2000).

Dentre os principais parasitoides nativos de moscas-das-frutas destacam-se os braconídeos, sendo registrados no Brasil 13 espécies e dentre esses merece destaque *Doryctobracon brasiliensis* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) com distribuição geográfica no Brasil e na Argentina, parasitando larvas de moscas-das-frutas em diferentes hospedeiros (Leonel et al., 1995; Aguiar-Menezes & Menezes, 1997; Raga et al., 2004; Salles, 1996; Marinho et al., 2009; Machado et al., 2012). Toda esta diversidade sugere que as espécies nativas, possuem potencial para os programas de controle biológico, devido principalmente ao fato de que poucas espécies de parasitoides introduzidos tem se estabelecido com sucesso em alguns países, como no caso de *D. longicaudata*, que é facilmente multiplicado em laboratório, mas pode apresentar alguns problemas de adaptação em diferentes ambientes, especialmente nas regiões mais frias do Sul do Brasil (Sugayama, 2000). A sua introdução nos estados do Sul do Brasil teve como objetivo auxiliar no manejo da mosca-das-frutas sul-americana *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae), considerada a principal praga da fruticultura de clima temperado e que exige a adoção de medidas de controle para evitar perdas econômicas (Salles & Kovaleski, 1990; Harter et al., 2010; Nava & Botton, 2010).

As moscas-das-frutas são consideradas as pragas agrícolas mais severas a nível mundial, devido ao grande número de hospedeiros atacados e alto impacto econômico causado em cultivos de regiões tropicais e subtropicais (Aluja & Mangan, 2008). Porém, a

possibilidade de realizar liberações aumentativas de parasitoides nativos, tem impulsionado os estudos de colonização e criação massal em condições de laboratório (Cancino et al., 2009; Aluja et al., 2009; Garcia & Ricalde, 2013).

Neste contexto, estudos de biologia, fisiologia e comportamento, tanto dos estágios imaturos como dos adultos de parasitoides tem sido investigados para otimizar programas de controle biológico no exterior (Lee & Heimpel, 2003; Lundgren, 2009) e recentemente, no Brasil (Gonçalves et al., 2013; Gonçalves et al., 2014). Segundo Ovruski et al. (2000) o desenvolvimento de técnicas de criação de parasitoides é um dos fatores que tem impulsionado o controle biológico de moscas-das-frutas nos últimos anos. A criação massal de insetos em condições de laboratório é um fator chave para sucesso dos programas de controle biológico, já que os parasitoides devem apresentar as mesmas qualidades dos selvagens, e assim, desempenhar de igual forma as suas funções em nível de campo. Assim, objetivou-se com este trabalho desenvolver uma metodologia de criação do parasitoide *D. brasiliensis*, com vista a criação massal, para ser utilizado em programas de controle biológico aplicado de *A. fraterculus*.

Material e métodos

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia da Embrapa Clima Temperado, em condições controladas de temperatura ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($70\pm 20\%$) e fotofase (12h).

Estabelecimento da criação de manutenção de *D. brasiliensis*. Foram realizadas coletas de frutos de cerejeira-do-mato (*Eugenia involucrata* D.C. - Myrtaceae), no município de Chiapeta, Rio Grande do Sul (RS) ($27^{\circ}55'22''$ S, $53^{\circ}56'27''$ O) e de pessegueiro (*Prunus persica* L. - Rosaceae), nos municípios de Rodeio Bonito, RS ($27^{\circ}28'9''$ S, $53^{\circ}10'8''$ O) e Pelotas, RS ($31^{\circ}37'16''$ S, $53^{\circ}31'40''$ O). Frutos maduros foram coletados da planta e do solo

e levados ao laboratório, onde foram acondicionados em bandejas plásticas (11 x 12 x 19 cm) contendo vermiculita fina para absorver os exudatos das frutas e propiciar ambiente para pupação. Semanalmente, a vermiculita foi peneirada e os pupários obtidos foram separados do substrato e acondicionados em recipiente Gerbox[®] (11 x 11 x 3,5 cm) com vermiculita umedecida. Os recipientes foram observados diariamente até a emergência dos dípteros e/ou de seus parasitoides. Os parasitoides obtidos foram utilizados para o estabelecimento da criação de *D. brasiliensis* em laboratório e alguns espécimes foram armazenados em recipientes plásticos (5 mL) contendo álcool 70% para confirmação da espécie, realizada pelo Dr. Valmir Antônio Costa, do Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, em Campinas, São Paulo.

Os parasitoides foram mantidos em gaiolas plásticas (30 x 50 x 30 cm), revestidas com tecido *nylon* (0,5 x 0,5 mm). Os adultos foram alimentados com uma solução de mel a 30% (p/p), mantida em recipientes de vidro (5 mL), sendo oferecida aos parasitoides por meio de rolete dental, cuja solução foi disponibilizada por capilaridade. Três frutos de goiabeira (*Psidium guajava* L. - Myrtaceae) foram cortados na parte superior para a retirada de parte da polpa e colocação em seu interior de cerca de 200 larvas de *A. fraterculus* de 3º instar criadas em dieta artificial de acordo com Nunes et al. (2013). As goiabas infestadas foram dispostas na base das gaiolas de criação dos adultos de *D. brasiliensis* para que as fêmeas pudessem parasitar as larvas no interior do fruto. Os frutos permaneceram por 24h no interior da gaiola e após, as larvas foram retiradas do fruto e colocadas em recipiente Gerbox[®] (11 x 11 x 3,5 cm) sobre uma camada de vermiculita umedecida, onde permaneceram até a emergência dos parasitoides que constituíram as gerações seguintes.

Preferência de parasitismo pelo instar larval de *A. fraterculus*. Foram realizados dois experimentos, um com chance de escolha e outro, sem chance de escolha. Larvas de 1º, 2º e 3º instares, oriundas da criação em dieta artificial foram oferecidas às fêmeas do

parasitoide a partir do 5º dia de idade. O instar foi determinado a partir do tempo de desenvolvimento larval, conforme determinado por Salles (2000) e por meio da medição do comprimento médio das larvas, adotando-se para o 1, 2 e 3º instar os valores de $1,49 \pm 0,028$, $3,98 \pm 0,061$ e $8,11 \pm 0,098$ mm, respectivamente. Após a coleta, as larvas foram transferidas para unidades de parasitismo, constituídas de placas de acrílico (1,7 cm de diâmetro x 0,5 cm de altura), com 20 larvas de cada um dos três instares de *A. fraterculus*, contendo polpa de goiaba envolta com tecido tipo *voile*, onde permaneceram por 24 horas expostas ao parasitismo.

No teste com chance de escolha, casais de parasitoides foram individualizados em gaiolas plásticas de 1000 mL com a parte superior contendo tecido *naylon* (0,5 x 0,5 mm), para permitir a aeração e possibilitar a inserção do ovipositor a fim de parasitar as larvas encontradas no interior da unidade de parasitismo, colocadas sobre a gaiola. Acima da malha fina, de forma equidistante, foram distribuídas as três unidades de parasitismo. No caso do teste sem chance de escolha, os casais foram individualizados em gaiolas plásticas de 500 mL e em cada gaiola foi oferecido apenas uma unidade de parasitismo.

Após o período de exposição, as larvas de 1º e 2º instar foram transferidas para frascos contendo dieta artificial (100 mL) (Nunes et al., 2013), onde permaneceram até a pupação. Em seguida, as pupas foram transferidas para frascos de acrílico (5 cm de diâmetro x 6 cm de altura) contendo uma camada de aproximadamente 5 cm de vermiculita fina umedecida, onde permaneceram até a emergência de moscas ou parasitoides. Já as larvas de 3º instar foram transferidas diretamente para os tubos de acrílico (5 cm de diâmetro x 6 cm de altura) contendo vermiculita fina umedecida, uma vez que não se alimentavam mais, permanecendo até a emergência de moscas ou parasitoides.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e esquema unifatorial utilizando-se 30 repetições, sendo cada repetição constituída por um

casal de *D. brasiliensis*. O fator de tratamento testado foi o efeito dos instares no parasitismo (1º, 2º e 3º instar).

Tempo de exposição das larvas ao parasitismo. Casais de *D. brasiliensis* com cinco dias após a emergência foram individualizados em gaiolas constituídas de copos plásticos (500 mL) com a parte superior contendo tecido de *nylon* (0,5 x 0,5 mm), para permitir a aeração e também para permitir que as fêmeas pudessem parasitar as larvas no interior das unidades de parasitismo, colocadas sobre a gaiola. Foram ofertadas 30 larvas de *A. fraterculus* de 3º instar, em uma placa de acrílico (1,7 cm de diâmetro x 0,5 cm de altura), contendo polpa de goiaba envolta com tecido tipo *voile*. As larvas foram expostas ao parasitismo por períodos de 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24 horas e após, as larvas foram transferidas para frascos de acrílico (5 cm de diâmetro x 6 cm de altura), contendo vermiculita fina umedecida, para pupação.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema unifatorial utilizando-se 50 repetições, sendo cada repetição constituída por um casal de *D. brasiliensis*. O fator de tratamento testado foi diferentes tempos de exposição de larvas ao parasitismo.

Definição do número de larvas de *A. fraterculus* a ser oferecido para cada fêmea.

Casais de *D. brasiliensis* de cinco dias de idade foram individualizados em gaiolas formadas por copos plásticos (500 mL), com a parte superior contendo tecido *nylon* (0,5 x 0,5 mm), para permitir a aeração e também para permitir que as fêmeas pudessem parasitar as larvas no interior das unidades de parasitismo, colocadas sobre a gaiola. Cinco, 10, 15, 20, 25 e 30 larvas de 3º instar foram expostas às fêmeas de *D. brasiliensis* por 24 horas em placas de acrílico (1,7 cm de diâmetro x 0,5 cm de altura), contendo polpa de goiaba envolta com tecido tipo *voile*. Após o período de parasitismo as larvas foram transferidas para frascos de acrílico

(5 cm de diâmetro x 6 cm de altura), onde ocorreu a pupação e a emergência de moscas ou parasitoides.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema unifatorial utilizando-se 100 repetições, sendo cada repetição constituída por um casal de *D. brasiliensis*. O fator de tratamento testado foi diferentes números de larvas de *A. fraterculus* (5, 10, 15, 20, 25 e 30 larvas de 3º instar).

Efeito de três diferentes concentrações de mel como alimento sobre adultos de *D. brasiliensis*. Casais de *D. brasiliensis* recém emergidos foram individualizados em gaiolas constituídas de copos plásticos (500 mL) com a parte superior contendo tecido de *nylon* (0,5 x 0,5 mm), para permitir a aeração e também para permitir que as fêmeas pudessem parasitar as larvas no interior das unidades de parasitismo, colocadas sobre a gaiola. No interior das gaiolas foram colocados os tratamentos para testar o efeito do alimento. Diariamente, até a morte das fêmeas, foram ofertadas 30 larvas de *A. fraterculus* de 3º instar, em placa contendo polpa de goiaba e envolta por tecido *voile*. As larvas foram expostas ao parasitismo por um período de 24 horas, sendo, posteriormente, transferidas para frascos de acrílico (5 cm de diâmetro x 6 cm de altura), contendo vermiculita fina umedecida, para pupação.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema unifatorial, com 20 repetições constituídas por casais de *D. brasiliensis*. O fator de tratamento testado foi o efeito de diferentes concentrações de mel como alimento para adultos de *D. brasiliensis*, a constar: Dieta A) sem alimento; Dieta B) água destilada; Dieta C) solução de mel a 20% (p/p); Dieta D) solução de mel a 50% (p/p) e, Dieta E) mel puro. As dietas B, C, e D foram dispostas em recipientes de vidro (5 mL), sendo oferecidas aos parasitoides por meio de rolete dental, cuja solução foi disponibilizada por capilaridade, enquanto na dieta E, o mel foi absorvido em papel higiênico amassado e fornecido em placas de acrílico (2,2 cm de diâmetro x 0,7 cm de altura).

Parâmetros avaliados e análise estatística. Em todos os experimentos foi determinado o número de descendentes (ND), o percentual de parasitismo (P), e a razão sexual (rs). Além destes parâmetros biológicos, para avaliar o efeito de diferentes concentrações de mel, também foi determinada a longevidade de machos e fêmeas.

O número de descendentes foi obtido pela equação:

$$ND = \text{número de parasitoides emergidos} + \text{número de parasitoides não emergidos}$$

O percentual de parasitismo foi determinado pela seguinte equação:

$$P = \frac{\text{número de parasitoides (emergidos e não emergidos)}}{\text{número total de pupas obtidas}} \times 100$$

A razão sexual (rs) foi determinada utilizando a equação:

$$rs = \frac{\text{número de fêmeas}}{\text{número de fêmeas} + \text{número de machos}}$$

Os valores atípicos (*outliers*) foram identificados com a plotagem dos resíduos estudantizados externamente (*RStudent*) versus valores preditos (variável Y) e também, pelo gráfico da Distância de Cook. A partir do *RStudent*, valores que se encontravam fora do intervalo -2 a 2 foram considerados *outliers* e suas observações correspondentes foram removidas do banco de dados (Rousseeuw & Leroy, 1987; Barnett & Lewis, 1994). 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. Posteriormente, foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, os efeitos dos ínstaes foram avaliados pelo teste t ($p \leq 0,05$); de tempo de exposição e número de larvas por modelos de regressão polinomiais ($p \leq 0,05$) representados pelas equações: $y = y_o + ax$ ou $y = y_o + ax + bx^2$, onde: y = variável resposta; y_o = variável resposta correspondente ao ponto mínimo da curva; a = valor máximo estimado para a variável resposta; b = declividade da curva; x = tempo de exposição (horas)

ou número de larvas. Os efeitos dos alimentos, em relação às testemunhas foram avaliados pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) e, entre os alimentos pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$) (SAS Institute, 2002). Para avaliar a variável longevidade foram construídas curvas de sobrevivência, as quais foram comparadas utilizando provas de log-rank (Francis et al., 1993), com o auxílio do Programa JMP (versão 5.0.1.).

Resultados

Preferência de instar larval de *A. fraterculus* para o parasitismo. Fêmeas de *D. brasiliensis* preferem parasitar larvas de *A. fraterculus* de 3º instar em relação aos demais, embora no teste sem chance de escolha, não foi possível observar esta preferência entre larvas de 2º e 3º instar (Tabela 1). Para o experimento sem chance de escolha, as variáveis número de parasitoides ($F = 1,04$; $GL = 1$; $P = 0,315$), parasitismo ($F = 2,51$; $GL = 1$; $P = 0,122$) e razão sexual ($F = 0,130$; $GL = 1$; $P = 0,724$) não apresentaram significância estatística para o fator de tratamento testado. Porém quando se avaliou a preferência do instar para o parasitismo em testes com chance de escolha ficou evidente que larvas de 3º instar são preferidas para o parasitismo, ou seja, das 30 fêmeas avaliadas em cada tratamento, todas parasitaram larvas de 3º instar, seis parasitaram larvas de 2º instar e apenas duas parasitaram larvas de 1º instar. Assim, foi verificado significância estatística do fator tratamento para as variáveis número de parasitoides emergidos ($F = 7,26$; $GL = 1$; $P = 0,0109$) e razão sexual ($F = 8,35$; $GL = 1$; $P = 0,0067$). Para a porcentagem de parasitismo, não foi observada significância estatística para o fator de tratamento ($F = 0,99$; $GL = 1$; $P = 0,329$).

Tabela 1. Número de parasitoides, percentuais de parasitismo e razão sexual de *Doryctobracon brasiliensis* criado em larvas de *Anastrepha fraterculus* de primeiro, segundo e terceiro ínstar nos testes com e sem chance de escolha. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 20\%$ e fotofase de 12h.

Teste	Parâmetros biológicos	Tratamento		
		1° instar	2° instar	3° instar
Sem chance de escolha	Fêmeas que reproduziram	1	30	30
	Número de parasitoides ^{NS}	1	$7,44 \pm 0,46$	$6,77 \pm 0,44$
	Parasitismo (%) ^{NS}	25,00	$57,98 \pm 3,73$	$50,03 \pm 3,36$
	Razão sexual ^{NS}	0	$0,26 \pm 0,05$	$0,23 \pm 0,06$
Com chance de escolha	Fêmeas que reproduziram	2	6	30
	Número de parasitoides	3	$2,17 \pm 0,31$ b	$5,10 \pm 0,48$ a
	Parasitismo (%) ^{NS}	18,75	$31,63 \pm 3,88$	$38,80 \pm 3,32$
	Razão sexual	0,25	$0,05 \pm 0,05$ b	$0,54 \pm 0,07$ a

^{NS}: não significativo pelo teste F ($p \leq 0,05$). Médias seguidas por mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$).

Tempo de exposição de larvas ao parasitismo. Para o número de parasitoides emergidos, ocorreu ajuste adequado dos dados à equação de regressão polinomial quadrática ($F = 23,9101$; $GL = 7$; $P = 0,0028$), com um coeficiente de determinação (R^2) de 0,90. Observou-se que o número de parasitoides emergidos foi ascendendo com o aumento do tempo de exposição das larvas ao parasitoide, sendo maior quando se ofertou larvas por 12 a 18 horas (Figura 1A). Ao realizar a comparação entre os tempos observou-se que larvas expostas a 12, 15 e 18 horas obtiveram acréscimos no número de parasitoides, respectivamente de 39,4; 42,7 e 41%, quando comparados ao tempo de três horas. Derivando a equação obtida para essa variável (Figura 1A) pode-se estimar que quando se oferece 30 larvas por 15,5 horas é gerado o maior número de descendentes (10,4). Para a porcentagem de parasitismo também se observou ajuste adequado dos dados à equação de regressão polinomial quadrática ($F = 10,0160$; $GL = 7$; $P = 0,0178$) com R^2 de 0,80. Foram registrados os maiores percentuais de parasitismo quando as larvas ficaram expostas de seis a 15 horas

(Figura 1B). Ao realizar a comparação entre os tempos observou-se que larvas expostas a 12, 15 e 18 horas obtiveram acréscimos no percentual de parasitismo, respectivamente de 34,5, 35 e 30%, quando comparados ao tempo de três horas. Derivando a equação obtida para essa variável (Figura 1B) pode-se estimar que quando se ofereceu as larvas por 13,75 horas foi obtido o maior percentual de parasitismo (44,16%). Para a razão sexual não foi possível ajustar um modelo matemático, porém os maiores valores de razão sexual foram observados quando as larvas ficaram expostas ao parasitismo por três e 12 horas, os quais diferiram dos tempos 6, 9, 18 e 21 horas (Figura 1C).

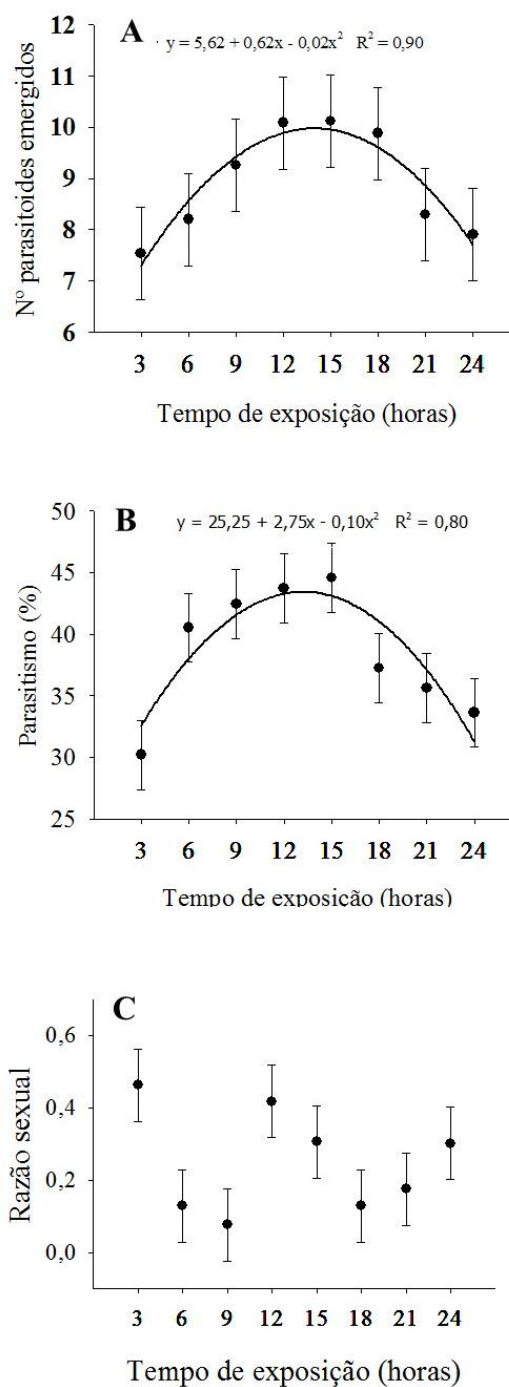


Figura 1. Número de parasitoides emergidos (A), percentual de parasitismo (B) e razão sexual (C) de *Doryctobracon brasiliensis* criados em larvas de *Anastrepha fraterculus* submetidas a oito diferentes tempos de exposição. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $70 \pm 20\%$ e fotofase de 12h. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

Definição do número de larvas de *A. fraterculus* a ser oferecido para cada fêmea. A quantidade de larvas de *A. fraterculus* oferecidas para o parasitoide apresentou comportamento linear, com adequado ajuste dos dados ao modelo estabelecido para a variável número de

descendentes gerados ($F = 31,6806$; $GL = 5$; $P = 0,0049$; $R^2 = 0,89$), para a porcentagem de parasitismo ($F = 100,3583$; $GL = 5$; $P = 0,0006$; $R^2 = 0,96$) e para a razão sexual ($F = 27,4285$; $GL = 5$; $P = 0,0064$; $R^2 = 0,87$) (Figura 2). O número de descendentes gerados foi aumentando à medida que o número de larvas oferecidas foi adicionado (Figura 2A), porém, a quantidade máxima de larvas parasitadas, só foi alcançada quando se ofereceu até 15 larvas por fêmea (Figura 3), valor esse, próximo ao ponto máximo de parasitoides emergidos estabelecido a partir da derivação da equação que foi de 16,7 larvas (Figura 2A). Ao realizar a comparação entre os números de larvas ofertadas observou-se que quando se ofertou 15 e 20 larvas, houve acréscimo no número de parasitoides emergidos de 46,1 e 69,2% respectivamente, quando comparadas a oferta de cinco larvas (Figura 2A). O percentual de parasitismo foi reduzido com o incremento no número de larvas oferecidas, sendo os percentuais mais elevados quando se ofereceu cinco e 10 larvas por fêmea (Figura 2B). Ao realizar a comparação entre os números de larvas ofertadas observou-se que 15 e 20 larvas obtiveram decréscimos no parasitismo, respectivamente de 22,2 e 33,3%, quando comparadas a cinco larvas (Figura 2B). A maior razão sexual foi observada quando se ofereceu 10 larvas por fêmea e da mesma forma, ao realizar a comparação entre os números de larvas ofertadas observou-se 15 e 20 larvas obtiveram decréscimos na razão sexual, respectivamente de 16,2 e 24,3%, quando comparadas a cinco larvas (Figura 2C).

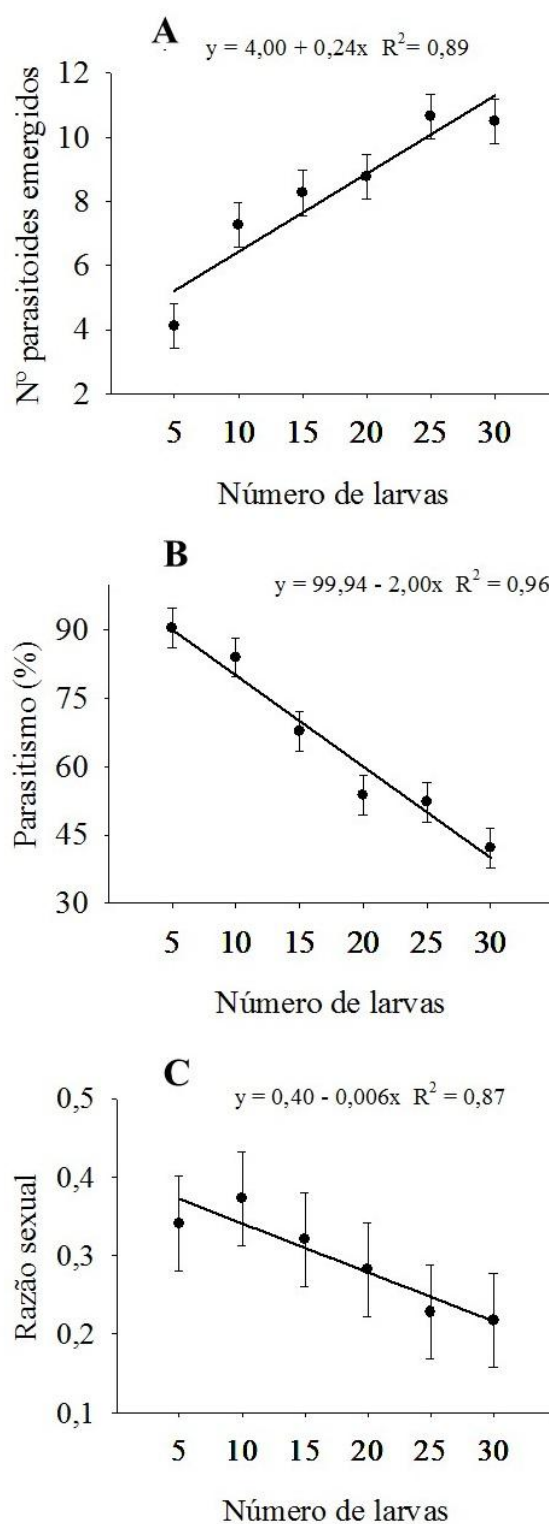


Figura 2. Número de parasitoides emergidos (A), percentual de parasitismo (B) e razão sexual (C) de *Doryctobracon brasiliensis*, quando oferecidos seis diferentes densidades de larvas de *Anastrepha fraterculus*. Temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa $70 \pm 20\%$ e fotofase de 12h. (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

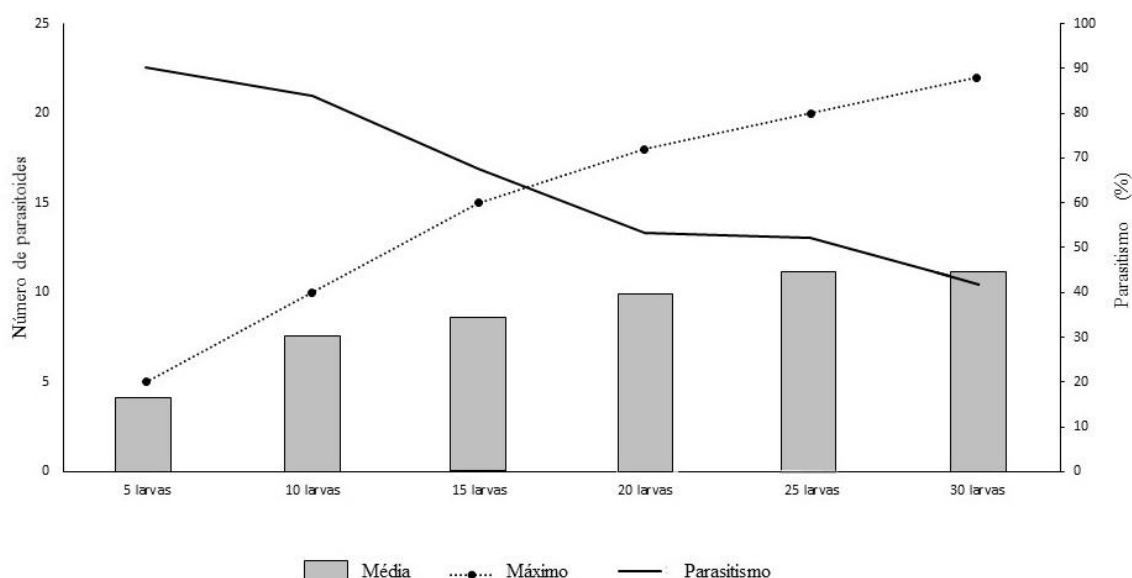


Figura 3. Média, número máximo e porcentagem de parasitismo de *Doryctobracon brasiliensis* em seis diferentes densidades de larvas de *Anastrepha fraterculus*. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa $70\pm 20\%$ e fotofase de 12h.

Efeito do alimento para adultos de *D. brasiliensis*. Para número de descendentes ($F = 7,74$; $GL = 4$; $P < 0,0001$) e razão sexual ($F = 2,46$; $GL = 4$; $P = 0,05$) foi observada significância estatística para o fator de tratamento testado (alimento). Fêmeas do parasitoide que foram alimentadas com solução de mel a 20% foram as que apresentaram maiores resultados considerando as três variáveis analisadas (número de descendentes, razão sexual e longevidade) (Tabela 2; Figura 6). Quando a comparação foi realizada com os tratamentos contendo mel, observou-se que as concentrações de 20 e 50% propiciaram um maior número de descendentes do que o mel puro, embora o mel a 20% não tenha diferido significativamente do mel puro (Tabela 2). Quando a comparação das duas concentrações de mel e mel puro foi realizada com a testemunha 1 (sem alimento) e com a testemunha 2 (com água), observou-se que o número de descendentes foi significativamente maior para os insetos alimentados com mel a 20 e 50%. Para a razão sexual, apesar de serem registradas maiores quantidade de machos, observa-se que foram detectadas diferenças significativas, quando

foram comparados os dois tratamentos referentes às concentrações de mel e o mel puro (Tabela 2).

Tabela 2. Número médio ($\pm$ erro padrão) de descendentes por fêmea e razão sexual de *Doryctobracon brasiliensis* criado em larvas de *Anastrepha fraterculus* e mantidos em quatro diferentes fontes de alimento e sem alimento. Temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 20\%$ e fotofase de 12h.

Tratamento	Número de descendentes/♀	Razão sexual
Testemunha 1 (sem alimento)	$6,09\pm 1,31$	$0,04\pm 0,04$ ^{2/}
Testemunha 2 (água destilada)	$7,93\pm 1,53$	$0,09\pm 0,05$
Mel 20%	$48,50\pm 7,56$ ab ^{1/} * β	$0,21\pm 0,07$ a ^{ns} α
Mel 50%	$59,47\pm 11,94$ a *	$0,05\pm 0,03$ b ^{ns} α
Mel puro	$26,12\pm 9,78$ b ^{ns} α	$0,04\pm 0,03$ b ^{ns} α

* ^{ns} Significativo e não significativo, respectivamente, em relação à testemunha 1 (sem alimento) pelo teste de Dunnett ($p\leq 0,05$). β , α Significativo e não significativo, respectivamente, em relação à testemunha 2 (água destilada) pelo teste de Dunnett ($p\leq 0,05$). ^{1/} Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p\leq 0,05$) comparando os alimentos. ^{2/} Média de 20 determinações $\pm$ erro padrão. N= (Testemunha 1 = 11; Testemunha 2 = 15; Mel 20% = 18; Mel 50% = 17; Mel puro = 16).

Analisando o número de parasitoides gerados por dia observa-se que quando foi oferecido mel puro e mel a 20 e 50%, foi produzido um número de descendentes por maior tempo, em relação às testemunhas (Figura 4).

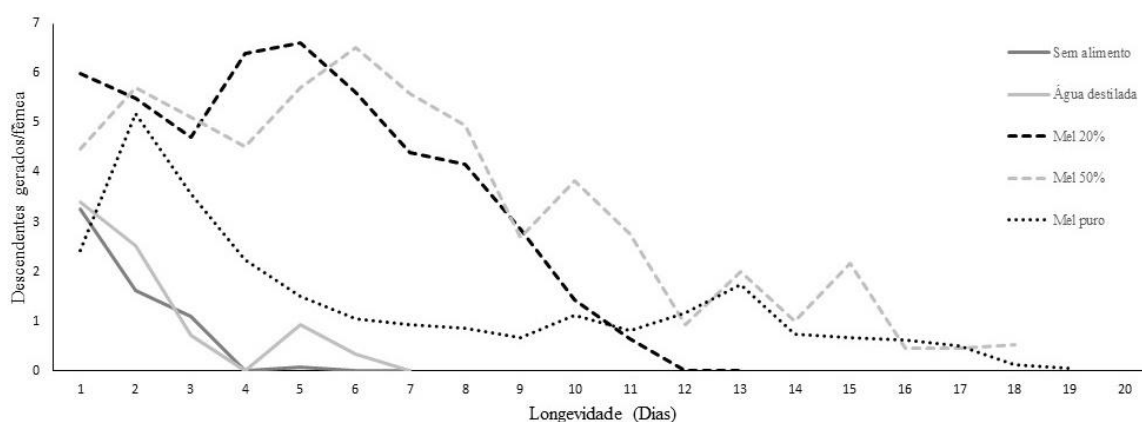


Figura 4. Ritmo diário de descendentes gerados por fêmeas de *Doryctobracon brasiliensis* criado em larvas de *Anastrepha fraterculus* em quatro diferentes fontes de alimento e sem alimento. Temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 20\%$ e fotofase de 12h.

Além disto, observa-se que fêmeas alimentadas com mel a 20% produziram maior quantidade de fêmeas nos 10 primeiros dias, enquanto as alimentadas com mel puro produziram maior quantidade de fêmeas nos últimos 10 dias (Figura 5).

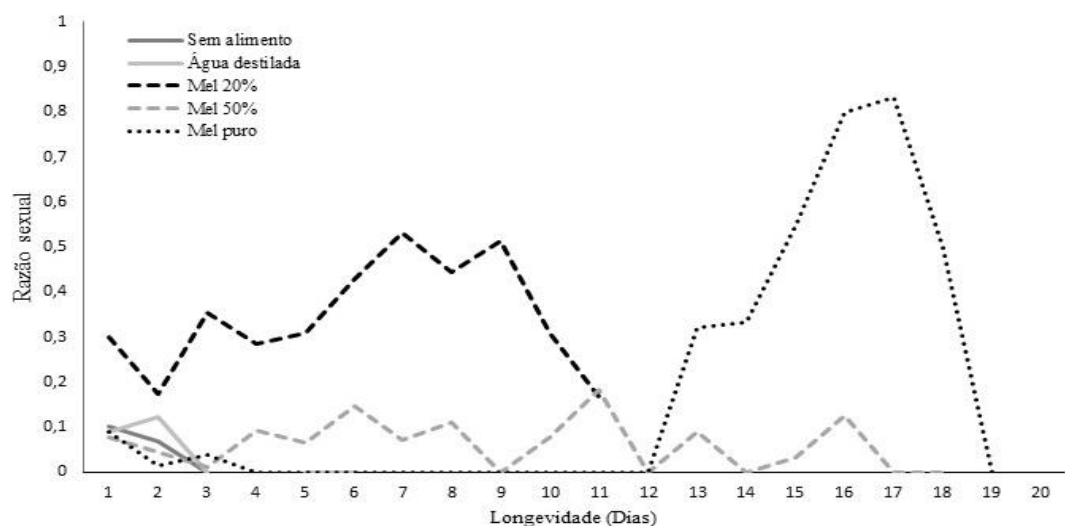


Figura 5. Razão sexual diária de *Doryctobracon brasiliensis* criado em larvas de *Anastrepha fraterculus* em quatro diferentes fontes de alimento e sem alimento. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 20\%$ e fotofase de 12h.

A utilização de mel a 20 e 50% e mel puro, propiciou tanto para os machos ($\chi^2 = 66,14$; GL = 4; $P < 0,0001$) quanto para as fêmeas ($\chi^2 = 79,23$; GL = 4; $P < 0,0001$) uma maior longevidade em relação aos insetos que não receberam alimento (Figura 6).

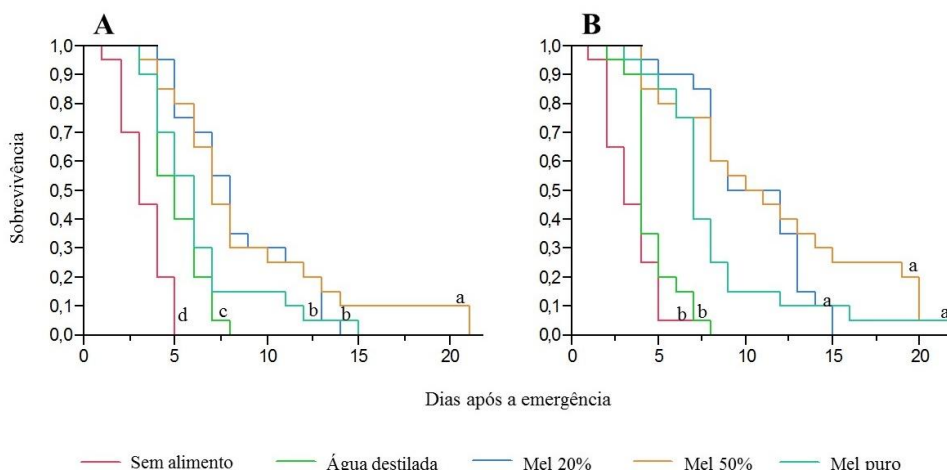


Figura 6. Curvas de sobrevivência de machos (A) e fêmeas (B) de *Doryctobracon brasiliensis* criado em larvas de *Anastrepha fraterculus* mantidos com quatro diferentes fontes de alimentos e sem alimento. Temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 20\%$ e fotofase de 12h. Curvas identificadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si.

Discussão

Os experimentos realizados neste trabalho demonstram que a criação de *D. brasiliensis* em laboratório deve ser realizada com larvas de *A. fraterculus* de 3º instar, expostas ao parasitismo por 12 horas, numa proporção de 15 larvas por fêmea e para a alimentação deve-se utilizar mel a 20%.

Fêmeas de *D. brasiliensis* apresentaram preferência em parasitar larvas de 3º instar de *A. fraterculus*, corroborando com Salles (1994), ao relatar que normalmente, os braconídeos parasitam larvas de tefritídeos de 3º instar. Entretanto, o parasitismo pode ocorrer em larvas de 1º e 2º instares, mas em menor intensidade, como se observou no experimento com chance de escolha, onde seis fêmeas realizaram postura em larvas de 2º instar, e apenas duas fêmeas colocaram ovos em larvas de 1º instar. Esta preferência pode estar relacionada com a capacidade de busca que as fêmeas apresentam, pois larvas de maior tamanho são mais fáceis de serem encontradas pelo parasitoide no interior de frutos (Ovruski, 1994). Outros braconídeos parasitoides de larvas de mosca-das-frutas também apresentam preferência em ovipositar em larvas de 3º instar, como ocorre com *D. longicaudata*, que parasita larvas com

11 a 12 dias de idade (Van Nieuwenhove & Ovruski, 2011). Esses autores também observaram que em larvas de 3º instar ocorre um maior número de descendentes de *D. longicaudata*. Possivelmente, estas larvas propiciam melhores condições nutricionais para o desenvolvimento dos parasitoides (López et al., 2009). O tamanho das larvas também pode estar relacionado com a razão sexual, já que este parâmetro pode ser modificado pela interação de fatores, como por exemplo, a idade adequada do hospedeiro aliada à qualidade das larvas (Godfray, 1995; Sagarra et al., 2001; Van Nieuwenhove & Ovruski, 2011). O conhecimento de que *D. brasiliensis* prefere parasitar larvas de *A. fraterculus* de 3º instar tendo em vista que o objetivo final de todos os sistemas de criação de inimigos naturais é produzir maior quantidade de organismos com um nível ótimo de qualidade, menor utilização de mão de obra e consequentemente menor custo de produção (Ravensberg, 1992). Neste sentido, larvas de 3º instar, são mais fáceis de manipular, pois após a oferta ao parasitismo irão para o substrato de pupação (vermiculita), sem necessidade de regressar a dieta artificial, o que diminuiria o custo de produção e a mortalidade pela redução de manipulação. Larvas menores (1 e 2º instar) são mais frágeis, pois os mecanismos de defesa não estão totalmente desenvolvidos (Godfray, 1995; Gerlin & Rejouan, 2004).

O tempo de exposição das larvas também é um fator decisivo para aperfeiçoar uma criação massal de parasitoides, tendo em vista que as fêmeas demandam tempos específicos para localizar, aceitar e ovipositar seu hospedeiro (Wong & Ramadan, 1992). No caso de *D. brasiliensis* o tempo de 12 horas é o ideal para que ocorra maior número de descendentes e com razão sexual acima de 0,5. Pequenos períodos de exposição do hospedeiro ao parasitoide pode ser negativo para o controle biológico tanto quanto longos períodos, pois neste último caso pode ocorrer superparasitismo (Montoya et al., 2000b; Cancino et al., 2010). Possivelmente, no caso de *D. brasiliensis* larvas que ficaram expostas por mais de 18 horas foram superparasitadas, acarretando em mortalidade dos imaturos e, reduzindo assim, o

número de parasitoides emergidos e a porcentagem de parasitismo. Esta redução, também pode estar relacionada com alta mortalidade de larvas que permaneceram por mais de 12 horas expostas ao parasitoide, possivelmente por sofrerem desidratação e não conseguirem pupar de forma adequada, já que o espaço e o alimento são reduzidos. Este resultado também é importante quando se visa uma criação massal, tendo em vista, que neste sistema, as larvas devem ser expostas “nuas” (sem alimento) aos parasitoides e por um período que seja compatível com o horário de funcionamento do local (biofábricas).

O número de larvas oferecidas para cada fêmea deve ser coeso com o número máximo de larvas parasitadas, para que não haja desperdício de material e de mão de obra. Assim, neste trabalho, ficou evidenciado que o oferecimento diário de 15 larvas para cada fêmea ocorre a maior taxa de parasitismo (67,7%). Este resultado é superior ao descrito por García-Mendel et al. (2007) para o parasitoide exótico *D. longicaudata*, que por ocasião do oferecimento de 15 larvas de *Anastrepha ludens* (Loew, 1873) (Diptera: Tephritidae) foi registrado parasitismo de 40%.

Das diferentes fontes de energia testadas como alimento para *D. brasiliensis*, as soluções de mel, tanto a 20 quanto 50% foram as que propiciaram os melhores resultados. Provavelmente, isto esteja relacionado com as necessidades nutricionais, sendo indispensável o incremento de água ao mel para que este seja melhor aproveitado e ingerido. De modo geral, qualquer alimento que não seja o natural, utilizado para a criação de insetos em laboratório, deve apresentar características similares aos naturais para que estes insetos possam desempenhar suas funções o mais próximo possível com os da natureza. Assim, alguns parâmetros como fecundidade, longevidade e razão sexual são características importantes a serem considerados para o controle de qualidade. Estes parâmetros são ainda utilizados como indicadores de deficiência ou excesso de componentes nutricionais específicos (Grenier & De Clercq, 2003). Sabe-se que carboidratos e outros nutrientes são

essenciais para a sobrevivência, produção e maturação dos ovos, bem como para a manutenção das funções vitais de parasitoides sinovigenicos (Flanders, 1950; Vattala et al., 2005; Jervis et al., 2008; Vásquez, 2011). Assim, muitos autores vêm utilizando mel ou soluções a base de mel na multiplicação e criação massal de várias espécies de braconídeos parasitoides de tefritídeos (Wong & Ramadan, 1992; Sivinski et al., 1996; Cancino et al., 2006; Gonçalves, 2012). Em estudos com fêmeas de *D. longicaudata* mantidas com diferentes fontes de alimento, como por exemplo, suco de diferentes frutíferas, néctar de diversas espécies de flores e mel, observou-se melhor desempenho e maior número de ovos quando estas foram alimentadas com mel (Sivinski et al., 2006). Em relação à longevidade, pesquisas desenvolvidas com os braconídeos *D. longicaudata*, *Opius hirtus* Fischer, 1963, *Doryctobracon crawfordi* (Viereck, 1911) e *Utetes anastrephae* (Viereck, 1913) demonstraram que os adultos destas espécies sobreviveram por um período maior quando foram alimentados com mel, comparados com suco orgânico de goiaba. Também os autores, observaram que *D. longicaudata* e *U. anastrephae* quando alimentados com mel todos os dias, sobreviveram por mais tempo do que aqueles alimentados com mel a cada dois dias (Stuhl et al., 2011). Assim, para *D. brasiliensis*, o oferecimento de mel a 20 e 50% propicia a produção de um maior número de parasitoide com uma maior longevidade, sendo, portanto, indicado como alimento em condições de laboratório, embora na solução de mel a 50% a razão sexual tenha sido menor.

Considerações finais

Dos resultados obtidos com este trabalho, pode-se concluir que a técnica de criação artificial de *D. brasiliensis* foi alcançada com sucesso, quando são oferecidas larvas de *A. fraterculus* de 3º instar, por um período de 12 horas, em uma proporção de 15 larvas por fêmea, e que, os adultos devem ser alimentados com solução de mel a 20%. Estas

informações serão úteis para a criação massal em biofabricas, embora devam ocorrer ajustes na técnica de criação.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), por concessão de bolsa a primeira autora, à Universidade Federal de Pelotas (UFPel), pelo auxílio financeiro; e Embrapa Clima Temperado (CPACT), pelo auxílio com infraestrutura e ao CNPq e Capes pelos recursos disponibilizados na forma de bolsa e projetos de auxílio de pesquisa.

Referências

- AGUIAR-MENEZES, E.L.; MENEZES, E.B. Natural occurrence of parasitoids of *Anastrepha* spp. Schiner, 1868 (Diptera: Tephritidae) in different host plants, in Itaguaí (RJ), Brazil. **Biological Control**, v.8, p.1-6, 1997.
- ALUJA, M.; MANGAN, R.L. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) host status determination: critical conceptual, methodological, and regulatory considerations. **Annual Review of Entomology**, v.53, p.473-502, 2008.
- ALUJA, M.; LÓPEZ, M.; SIVINSKI, J. Ecological evidence for diapause in four native and one exotic species of larval-pupal fruit fly (Diptera: Tephritidae) parasitoids in tropical environments. **Annals of the Entomological Society of America**, v.91, p.821-833, 1998.
- ALUJA, M.; SIVINSKI, J.; OVRUSKI, S.; GUILLÉN, L.; LÓPEZ, M.; CANCINO, J.; TORRES-ANAYA, A.; GALLEGOS-CHAN, G.; RUÍZ, L. Colonization and domestication of seven species of native new world hymenopterous larval-prepupal and pupal fruit fly (Diptera: Tephritidae) parasitoids. **Biological Control**, v.19, p.49-29, 2009.

- AUTUORI, M. Notas sobre a introdução e multiplicação do parasita *Tetrastichus giffardianus* Silv. no Brasil. **O Biológico**, v.4, p.128-129, 1938.
- BARNETT, V.; LEWIS, T. **Outliers in Statistical Data**, 3rd Edition, John Wiley & Sons, New York, 1994. 584p.
- CANAL, D.N.A.; ZUCCHI, R.A.; SILVA, N.M.; LEONEL JR, F.L. Reconocimiento de las especies de parasitoides (Hym., Braconidae) de moscas de las frutas (Dip., Tephritidae) em dos municipios de Estado de Amazonas, Brasil. **Boletín del Museo de Entomología de la Universidad del Valle**, v.1 e 2, p.1-17, 1994.
- CANAL, D.N.A.; ZUCCHI, R.A.; SILVA, N.M.; SILVEIRA NETO, S. Análise faunística dos parasitoides (Hym., Braconidae) de *Anastrepha* spp. (Dip., Tephritidae) em Manaus e Iranduba, Estado do Amazonas. **Acta Amazonica**, v.25, p.235-246, 1995.
- CANAL, D.N.A.; ZUCCHI, R.A. Parasitoides - Braconidae. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto, Holos Editora, 2000. p.119-126.
- CANCINO, J.; LÓPEZ, P.; VILLALOBOS, P.L.; HIPÓLITO, P.; QUINTERO, J.L.; MATTIACCI, L. **Control de calidad em la cría masiva de *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae): fundamentos y procedimientos**. Metapa de Dominguéz: Sagarpa Senasica, 2006. 54p.
- CANCINO J.; RUIZ, L.; HENDRICH, J.; BLOEM, K. Evaluation of sequential exposure of irradiated hosts to maximize the mass rearing of fruit fly parasitoids. **Biocontrol Science and Technology**, v.19, p. 95-109, 2009.
- CANCINO, J.; RUIZ, L.; LÓPEZ, P.; MORENO, F.M. Cría masiva de parasitoides. In: MONTROYA, P.; TOLEDO, J.; HERNÁNDEZ, E. (Ed.). **Moscas de la fruta: fundamentos y procedimientos para su manejo**. Coyoacán, México, 2010. p.291-306.

CARVALHO, R.S. **Metodologia para monitoramento populacional de moscas-das-frutas em pomares comerciais**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2005. 17p. (Circular Técnica 75).

CARVALHO, R. da S.; NASCIMENTO, A.S.; MATRANGOLO, W.J.R. Controle biológico. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto, 2000. p.113-117.

DUAN, J.J.; MESSING, R.H. Effect of two Opiine parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) introduced for fruit fly control on a native hawaiian Tephritid, *Trupanea dubautiae* (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**, v.8, p.177-184, 1997.

FLANDERS, S.E. Regulation of ovulation and egg disposal in the Parasitic Hymenoptera. **The Canadian Entomologist**, v.82, p.134-140, 1950.

FRANCIS, B.; GREEN, M.; PAYNE, C. **Statistical system for generalized linear interactive modelling**. Clarendon Press, Oxford, UK, 1993, 82p.

GARCIA, F.R.M.; CORSEUIL, E. Native hymenopteran parasitoids associated with fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Santa Catarina state, Brazil. **Florida Entomologist**, v.87, p.517-521, 2004.

GARCIA, F.R.M.; RICALDE, M. Augmentative biological control using parasitoids for fruit fly management in Brazil. **Insects**, v.4, p.55-70, 2013.

GARCÍA-MEDEL, D.; SIVINSKI, J.; DÍAZ-FLEISCHER, F.; RAMIREZ-ROMERO, R.; ALUJA, M. Foraging behavior by six fruit fly parasitoids (Hymenoptera: Braconidae) released as single or multiple species cohorts in field cages: influence of fruit location and host density. **Biological Control**, v.43, p.12-22, 2007.

GERLING, D.; REJOUAN, N. Age-related pupal defenses against congeneric internequine activity in *Encarsia* species. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.110, p.87-93, 2004.

GODFRAY, H.C.J. Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology. **Environmental Entomology**, v.24, p.483-484, 1995.

GONÇALVES, R.S. Técnica de criação e bioecologia do parasitoide larval *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes, 1924) (Hymenoptera: Figitidae) em duas espécies de moscas-das-frutas. 2012. 117p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GONÇALVES, R.S.; NAVA, D.E.; PEREIRA, H.C.; LISBOA, H.; GRUTZMACHER, A.D.; VALGAS, R.A. Biology and fertility life table of *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae) in tarvae of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v.106, p.791-798, 2013.

GONÇALVES, R.S.; NAVA, D.E.; ANDREAZZA, F.; LISBÔA, H.; NUNES, A.M.; GRUTZMACHER, A.D.; VALGAS, R.A.; MAIA, A.H.N.; PAZIANOTTO, R.A.A. Effect of constant temperatures on the biology, life table, and thermal requirements of *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae), a parasitoid of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Environmental Entomology**, v.43, p.491-500, 2014.

GRENIER, S.; DE CLERCQ, P. Comparison of artificially vs. naturally reared natural enemies and their potential for use in biological control. In: van LENTEREN, J.C. (Ed). **Quality control and production of biological control agents – theory and testing procedures**. Cambridge: CABI Publishing, 2003. p.115-131.

GUIMARÃES, J.A.; ZUCCHI, R.A.; DIAZ, N.B.; SOUZA FILHO, M.F.; UCHÔA, F. Espécies de Eucoilinae (Hymenoptera: Cynipoidea: Figitidae) parasitoides de larvas frugívoras (Diptera: Tephritidae e Lonchaeidae) no Brasil. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.28, p.263-273, 1999.

GUIMARÃES, J.A.; DIAS, N.B.; ZUCCHI, R.A. Parasitoides – Figitidae (Eucoilinae). In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto, Holos Editora, 2000. p.127-134.

GUIMARÃES, J.A.; ZUCCHI, R.A. Parasitism behavior of three species of Eucoilinae (Hymenoptera: Cynipoidea: Figitidae) fruit fly parasitoids (Diptera) in Brazil. **Neotropical Entomology**, v.33, p.217-224, 2004.

HARRIS, E.J.; BAUTISTA, R.C.; VARGAS, R.I.; JANG, E.B.; EITAM, A.; LEBLANC, L. Suppression of melon fly (Diptera: Tephritidae) populations with releases of *Fopius arisanus* and *Psytalia fletcheri* (Hymenoptera: Braconidae) in North Shore Oahu, HI, USA. **BioControl**, v.55, p.593-599, 2010.

HARTER, W.R.; GRUTZMACHER, A.D.; NAVA, D.E.; GONÇALVES, R.S.; BOTTON, M. Isca tóxica e interrupção sexual no controle da mosca-da-fruta sul-americana e da mariposa-oriental em pessegueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p.229-235, 2010.

JERVIS, M.A.; ELLERS, J.; HARVEY, J.A. Resource acquisition, allocation, and utilization in parasitoid reproductive strategies. **Annual Review of Entomology**, v.53, p.361-385, 2008.

LEE, J.C.; HEIMPEL, G.E. Sugar feeding by parasitoids in cabbage fields and the consequences for pest control. In: PROCEEDINGS OF THE 1ST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON BIOLOGICAL CONTROL OF ARTHROPODS, 2003., Honolulu. **Anais**. 2003. p.220-225.

LEONEL JR, F.L.; ZUCCHI, R.A.; WHARTON, F.L. Distribution and tephriti hosts (Diptera) of braconid parasitoids (Hymenoptera) in Brazil. **International Journal of Pest Management**, v.41, p.208-213, 1995.

LÓPEZ, O.P.; HÉNAUT, Y.; CANCINO, J.; LAMBIN, M.; CRUZ-LÓPEZ, L.; ROJAS, J.C. Is host size an indicator of quality in the mass-reared parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae)? **Florida Entomologist**, v.92, p.441-449, 2009.

- LUNDGREN, J.G. Nutritional aspects of non-prey foods in the life histories of predaceous Coccinellidae. **Biological Control**, v.51, p.294-305, 2009.
- MACHADO, D.L.M.; STRUIVING, T.B.; SANTOS, D.; SOUZA, S.A.S.; SIQUEIRA, D.L. Levantamento de moscas-das-frutas e seus parasitoides em citros, no município de Viçosa. **Revista Ceres**, v.59, p.877-880, 2012.
- MARINHO, C.F.; SOUZA-FILHO, M.F. de; RAGA, A.; ZUCCHI, R.A. Parasitoides (Hymenoptera: Braconidae) de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no estado de São Paulo: plantas associadas e parasitismo. **Neotropical Entomology**, v.38, p.321-326, 2009.
- MOHAMED, S.A.; EKESI, S.; HANNA, R. Evaluation of the impact of *Diachasmimorpha longicaudata* on *Bactrocera invadens* and five African fruit fly species. **Journal of Applied Entomology**, v.132, p.789-797, 2008.
- MONTOYA, P.; LIEDO, P.; BENREY, B.; BARRERA, J.F.; CANCINO, J.; ALUJA, M. Functional response and superparasitism by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Annals of Entomological Society of America**, v.93, p.47-54, 2000a.
- MONTOYA, P.; LIEDO, P.; BENREY, B.; BARRERA, J.F.; CANCINO, J.; 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, p.216-224, 2000b.
- MONTOYA, P.; CANCINO, J.; ZENIL, M.; GÓMEZ, E.; VILLASENOR, A. Parasitoid releases in the control of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) outbreaks, in coffee growing zones of Chiapas, Mexico. **Vedalia**, v.12, p.85-89, 2005.
- MONTOYA, P.; RUIZ, L.; PÉREZ-LACHAUD, G.; CANCINO, J.; LIEDO, P. Field superparasitism by *Diachasmimorpha longicaudata* attacking *Anastrepha* spp. larvae on mango fruits. **Biological Control**, v.64, p.160-165, 2013.

NAVA, D.E.; BOTTON, M. **Bioecologia e controle de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* em pessegueiro**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 29p. (Embrapa Clima Temperado, Documentos, 315).

NUNES, A.M.; COSTA, K.Z.; FAGGIONI, K.M.; COSTA, M.L.Z.; GONÇALVES, R.S.; WALDER, J.M.M.; GARCIA, M.S.; NAVA, D.E. Dietas artificiais para a criação de larvas e adultos da mosca-das-frutas sul-americana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.1309-1314, 2013.

OVRUSKI, S. Comportamiento en la detección del huésped en *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes) (Hymenoptera: Cynipoidea, Eucoilidae) parasitoide de larvas de *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). **Revista Sociedad Entomologica Argentina**, v.53, p.121-127, 1994.

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, p.81-107, 2000.

PARANHOS, B.A.J.; SÁ, L.A.N.de.; MANOUKIS, N.C.; PRADO, S.S; MORELLI, R.; NAVA, D.E.; LIMA, A.L.; JANG, E. Competição interespecífica entre o parasitoide exótico *Fopius arisanus* e o nativo *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera Braconidae) em *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 13., 2013, Bonito. **Anais**, 2013.

RAGA, A.; PRESTES, D.A.O.; SOUZA FILHO, M.F. de; SATO, M.E.; SILOTO, R.C.; GUIMARÃES, J.A.; ZUCCHI, R.A. Fruit fly (Diptera: Tephritoidea) infestation in citrus in the State of São Paulo, Brazil. **Neotropical Entomology**, v.33, p.85-89, 2004.

- RAVENSBERG, W.J. Production and utilization of natural enemies in western european glasshouse crops. In: ANDERSON, T.E.; LEPPLA, N.C. (Ed.). **Advances in insect rearing for research and pest management**. Boulder, Westview Press, 1992. p. 465-487.
- ROUSSEUW, P.J.; LEROY, A.M. **Robust Regression and Outlier Detection**. New York, 1987.
- SAGARRA, L.A.; VINCENT, C.; STEWART, R.K. Body size as an indicator of parasitoid quality in male and female *Anagyrus kamali* (Hymenoptera: Encyrtidae). **Bulletin of Entomological Research**, v.91, p.363-367, 2001.
- SALLES, L.A.B. Algunas bases para el control biológico de la mosca de los frutos *Anastrepha fraterculus*. **Apostila**, 17p. 1994.
- SALLES, L.A.B. Parasitismo de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) por Hymenoptera, na região de Pelotas, RS. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, p.769-774, 1996.
- SALLES, L.A.B. Bioecologia e ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus*. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p.81-86.
- SALLES, L.A.B.; KOVALESKI, A. Mosca-das-frutas em macieira e pessegueiro no Rio Grande do Sul. **Hortisul**, v.1, p.5-9, 1990.
- SAS INSTITUTE. **SAS system for Windows, version 9.1**. Cary: SAS Institute, 2002.
- SIVINSKI, J.; ALUJA, M. The evolution of ovipositor length in the parasitic hymenoptera and the search for predictability in biological control. **Florida Entomologist**, v.86, p.143-150, 2003.
- SIVINSKI, J.; CALKINS, C.; BARANOWSKI, R.; HARRIS, D.; BRAMBILA, J. 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, p.177-185, 1996.

SIVINSKI, J.; ALUJA, M.; LÓPEZ, M. Spatial and temporal distributions of parasitoids of Mexican *Anastrepha* species (Diptera: Tephritidae) within the canopies of fruit trees. **Annals of the Entomological Society of America**, v.90, p.604-618, 1997.

SIVINSKI, J.; PINERO, J.; ALUJA, M. The distributions of parasitoids (Hymenoptera) of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) along an altitudinal gradient in Veracruz, Mexico. **Biological Control**, v.18, p.258-269, 2000.

SIVINSKI, J.; ALUJA, M.; HOLLER, T. Food sources for adult *Diachasmimorpha longicaudata*, a parasitoid of tephritid fruit flies: effects on longevity and fecundity. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.118, p.193-202, 2006.

STUHL, C.; CICERO, L.; SIVINSKI, J.; TEAL, P.; LAPOINTE, S.; PARANHOS, B.J.; ALUJA, M. Longevity of multiple species of tephritid (Diptera) fruit fly parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae) provided exotic and sympatric-fruit based diets. **Journal of Insect Physiology**, v.57, p.1463-1470, 2011.

SUGAYAMA, R.L. *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. 2000. 117f. Tese (Doutorado) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

VAN NIEUWENHOVE, G.A.; OVRUSKI, S.M. Influence of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) larval instars on the production of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) progeny and their sex ratio. **Florida Entomologist**, v.94, p.863-868, 2011.

VÁSQUEZ, C. Efecto de diferentes recursos alimenticios sobre longevidad, metabolismo de carbohidratos y dinámica ovárica en dos parasitoides de moscas de la fruta (Diptera:

Tephritidae). 2011. 53p. Dissertação (Mestrado) - Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

VATTALA, H.; WRATTEN, S.; PHILLIPS, C.; WÄCKERS, F.; WORNER, S. Measuring parasitoid carbohydrate levels to improve biological control. **New Zealand Plant Protection**, v.58, p.135-139, 2005.

WALDER, J.M.M.; LOPES, L.A.; COSTA, M.L.Z.; SESSO, J.N.; TONIN, G.; CARVALHO, M.L.; LARA, P.P. Criação e liberação do parasitóide *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) para controle de moscas-das-frutas no estado de São Paulo. **Laranja**, v.16, p.149-153, 1995.

WONG, T.; RAMADAN, M.; MCINNIS, D.; MOCHIZUKI, N.; NISHIMOTO, J.; HERR, J. Augmentative releases of *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae) to suppress a Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) population in Kula, Maui, Hawaii. **Biological Control**, v.1, p.2-7, 1991.

WONG, T.T.Y.; RAMADAN, M. Mass rearing biology of larval parasitoids (Hymenoptera: Braconidae, Opiinae) of tephritid flies (Diptera: Tephritidae). In: ANDERSON, T.E.; LEPPLA, N.C. (Ed). **Advances in insect rearing for research and pest management**. Boulder, Westview Press, 1992. P.405-426.

Artigo 2 – Revista: Pesquisa Agropecuária Brasileira

Efeito da temperatura na biologia de *Doryctobracon brasiliensis* (Szépligeti, 1911)
(Hymenoptera: Braconidae): Elaboração de tabela de vida e exigências térmicas

Sônia Poncio⁽¹⁾, Adrise Medeiros Nunes⁽²⁾, Rafael da Silva Gonçalves⁽¹⁾, Heitor Lisboa⁽¹⁾,
Roberta Manica-Berto⁽³⁾, Mauro Silveira Garcia⁽¹⁾, Dori Edson Nava⁽³⁾

⁽¹⁾ Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Caixa Postal 354, CEP 96010-970 Pelotas, RS, Brasil. E-mail: soniaponcio@yahoo.com.br, rafaeldasilvagoncalves@gmail.com, heitorlisboa@hotmail.com, garciasmauro@yahoo.com.br

⁽²⁾ Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Universidade Federal de Pelotas, Caixa Postal 354, CEP 96010-970 Pelotas, RS, Brasil. E-mail: adrisenunes@gmail.com

⁽³⁾ Laboratório de Entomologia, Embrapa Clima Temperado Caixa Postal 403, CEP 96010-970, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: dori.edson-nava@embrapa.br

Resumo – O parasitoide larva-pupa de moscas-das-frutas *Doryctobracon brasiliensis* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) possui grande potencial para ser utilizado em programas de controle biológico, pois além de ser encontrado associado a *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) também parasita outras espécies de *Anastrepha*. O objetivo do trabalho foi estudar a biologia de *D. brasiliensis* em diferentes temperaturas visando elaborar a tabela de vida de fertilidade e determinar as exigências

térmicas. Os parasitoides foram multiplicados em larvas de *A. fraterculus*, em câmaras climatizadas mantidas nas temperaturas de 15, 18, 20, 22, 25, 28 e 30°C, umidade relativa do ar de 70±20% e fotofase de 12 horas. Foram determinados o número de descendentes, a razão sexual, a longevidade de machos e fêmeas e a duração do período ovo-adulto. A faixa térmica de 18 a 22°C propicia uma maior fecundidade, sendo que a 20°C o número médio de descendentes por fêmea foi de 152,77 parasitoides. A razão sexual dos descendentes gerados foi reduzida com o aumento da temperatura. A longevidade de machos e fêmeas de *D. brasiliensis* foi reduzindo com o aumento da temperatura. Nas temperaturas de 15, 28 e 30°C não ocorreu desenvolvimento dos estágios imaturos. Para a faixa térmica de 18 a 25°C a duração do período ovo-adulto de *D. brasiliensis* foi inversamente proporcional a temperatura. A 20 e 22°C foram observados os maiores valores da taxa líquida de reprodução (R_o) e de razão finita de aumento (λ), de forma que a cada geração a população de *D. brasiliensis* aumentou 47 vezes na temperatura ótima (21°C). O limiar térmico inferior de desenvolvimento foi de 10,01°C e a constante térmica 303,21 graus-dias. Estas informações confirmam que *D. brasiliensis* está mais adaptado a ambientes de clima temperado, o que implica em potencial significativo para a utilização de *D. brasiliensis* para controlar *A. fraterculus*, já que a maioria das áreas ocupadas por esta praga pertence a regiões temperadas e são úteis para auxiliar em sistema de criação massal em laboratório.

Termos para indexação: Controle biológico, parasitoides nativos, *Anastrepha fraterculus*, fruticultura.

Abstract – The larval-pupal parasitoid fruit flies *Doryctobracon brasiliensis* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) has great potential to be used in biological control programs, because, besides *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera:

Tephritidae), it parasites other *Anastrepha* species. The objective of this work was to study the biology of *D. brasiliensis* at different temperatures to design a life fertility table and determine thermal requirements. The parasitoids were multiplied in larvae of *A. fraterculus*, in air-conditioned chambers at temperatures 15, 18, 20, 22, 25, 28 and 30°C, RH 70±20% and photophase of 12 h. We determined the number of offspring, sex ratio, longevity of males and females and the duration of the egg-adult period. The temperature range of 18-22°C provides higher fecundity, and at 20°C, the average number of offspring per female was 152.77 parasitoids. The sex ratio of offspring produced was reduced with increasing temperatures. Longevity of males and females of *D. brasiliensis* was reduced by increasing temperatures. At temperatures 15, 28 and 30°C, there was no development of immature stages. For the temperature range of 18-25°C, the duration of egg-adult period of *D. brasiliensis* was inversely proportional to temperature. At 20 and 22°C, we observed the highest values of the net reproduction rate (R_o) and finite reason of increase (λ), meaning that at the estimated optimum temperature (21°C), the population of *D. brasiliensis* increased 47 times each generation. The lower temperature threshold for development was 10.01°C and the thermal constant (K) 303.21 degree/days. This information confirms that *D. brasiliensis* is better suited to temperate environments, which implies significant potential for the use of *D. brasiliensis* to control *A. fraterculus*, since most areas occupied by this pest are in temperate regions and *D. brasiliensis* is useful in mass rearing systems in laboratory.

Index terms: Biological control, native parasitoids, *Anastrepha fraterculus*, fruit production.

Introdução

Anastrepha fraterculus (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae) é a espécie de moscas-das-frutas de maior importância econômica na América do Sul, distribuída entre os

dois extremos latitudinais e ocupando ambientes bastante distintos (Malavasi et al., 2000). No Brasil é considerada a principal praga das frutíferas de clima temperado e representa quase a totalidade das espécies do gênero capturadas nos pomares na região Sul do Brasil (Salles, 1995; Kovaleski, 1997; Garcia & Lara, 2006; Nunes et al., 2011).

Atualmente, as medidas de controle vêm sendo tomadas através do uso de inseticidas organofosforados e piretroides, aplicados em cobertura (área total) ou na forma de iscas tóxicas (Harter et al., 2010; Nava & Botton, 2010). Porém, o uso destes inseticidas em cobertura total afeta os insetos benéficos (predadores, parasitoides e polinizadores), contamina o solo, águas subterrâneas, trabalhadores agrícolas e os alimentos, permitindo ainda, que pragas secundárias ressurgam (Norris et al., 2002). No entanto, devido aos diferentes problemas causados pelo uso de pesticidas, os consumidores em todo o mundo estão buscando alimentos saudáveis e com produção ambientalmente segura (Carvalho et al., 2000).

Neste sentido, o controle biológico de moscas-das-frutas é uma alternativa de manejo viável e promissor, especialmente com parasitoides nativos das famílias Braconidae e Figitidae. Dentre estes parasitoides, *Doryctobracon brasiliensis* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) é relatado no Brasil nas regiões Sudeste (Leonel et al., 1995; Aguiar-Menezes & Menezes, 1997; Raga et al., 2004) e Sul (Leonel et al., 1995; Salles, 1996; Garcia & Corseuil, 2004). Também ocorre no norte da Argentina (Ovruski et al., 2000; Ovruski & Schliserman, 2003) parasitando larvas de diferentes espécies de moscas-das-frutas, sendo na maioria das vezes, associado a *A. fraterculus*, em diferentes frutíferas (Salles, 1996; Marinho et al., 2009; Machado et al., 2012).

Como a temperatura é um dos principais fatores relacionados a sobrevivência e reprodução de insetos (Hallman & Denlinger, 1998), conhecer o efeito deste fator sobre a taxa de desenvolvimento dos insetos, é uma importante ferramenta ecológica para conhecer a

dinâmica populacional dos insetos (Parra, 1997). O conhecimento de tais relações é importante para determinar o período de ocorrência de insetos na natureza, e assim servir de estratégia para o manejo integrado de pragas, e ainda, possibilita conhecer o limiar térmico inferior de desenvolvimento e a constante térmica, podendo ser útil no estabelecimento de modelos para previsão de ocorrência de insetos-praga e na produção de parasitoides e predadores em biofabrica (Haddad et al., 1999; Cividanes, 2000). Neste sentido, estudar os limites térmicos de desenvolvimento dos insetos é uma das maneiras de entender como condições climáticas extremas podem afetar a aptidão dos organismos e sua dinâmica populacional (Terblanche et al., 2007).

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a biologia de *D. brasiliensis* em diferentes temperaturas visando elaborar a tabela de vida de fertilidade e determinar as exigências térmicas. Estas informações são importantes para auxiliar no estabelecimento da criação massal deste parasitoide, visando programas de controle biológico aplicado de *A. fraterculus*.

Material e Métodos

As criações de *A. fraterculus* e *D. brasiliensis* foram realizadas no Laboratório de Entomologia da Embrapa Clima Temperado, em salas climatizadas, com temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de $70\pm 20\%$ e fotofase de 12 horas. A metodologia utilizada para criação de manutenção de *A. fraterculus* foi a de Nunes et al. (2013). Para estabelecimento da criação de manutenção de *D. brasiliensis* foram realizadas coletas de frutos de cerejeira-domato (*Eugenia involucrata* D.C. - Myrtaceae) no interior do município de Chiapeta, Rio Grande do Sul (RS) ($27^{\circ}55'$ S, $53^{\circ}56'$ O) e em frutos de pessegueiro (*Prunus persica* L. - Rosaceae) em área urbana do município de Rodeio Bonito, RS ($27^{\circ}28'$ S, $53^{\circ}10'$ O) e município de Pelotas, RS ($31^{\circ}37'$ S, $53^{\circ}31'$ O). Frutos maduros foram coletados da planta e do solo e levados para o laboratório, onde foram acondicionados em bandejas plásticas (11 x

12 x 19 cm) contendo vermiculita extrafina para absorver o excesso de umidade e propiciar ambiente para pupação. Semanalmente, a vermiculita foi peneirada e os pupários obtidos foram separados do substrato, e acondicionado em recipiente Gerbox[®] (11 x 11 x 3,5 cm) com vermiculita extrafina umedecida. Os frascos foram dispostos em sala climatizada, sob condições controladas de temperatura ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($70\pm 20\%$) e fotofase (12h), sendo observados diariamente até a emergência dos parasitoides. Após a emergência, parte dos adultos emergidos foram utilizados para a criação de manutenção e a outra parte armazenada em recipientes plásticos (5 mL) contendo álcool 70% para a identificação que foi realizada pelo Dr. Valmir Antônio Costa, do Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, em Campinas, São Paulo.

Os parasitoides utilizados para o estabelecimento da colônia em laboratório foram mantidos em gaiolas de plástico (30 x 50 x 30 cm), revestidas com tecido de *nylon* (0,5 x 0,5 mm). Os adultos foram alimentados com uma solução de mel a 30%, em recipientes de vidro (5 mL), sendo oferecida aos parasitoides por meio de rolete dental, cuja solução foi disponibilizada por capilaridade. Três frutos de goiabas (*Psidium guajava* L. - Myrtaceae) foram cortados na parte superior para a retirada de parte da polpa e colocação em seu interior de cerca de 200 larvas de *A. fraterculus* de 3º instar criadas em dieta artificial de acordo com Nunes et al. (2013). As goiabas contendo as larvas foram dispostas na base das gaiolas de criação dos adultos de *D. brasiliensis* para que as fêmeas pudessem parasitar as larvas no interior do fruto. Os frutos permaneceram por 24h no interior da gaiola. Decorrido este tempo as larvas foram retiradas de dentro do fruto e devolvidas para a dieta artificial, onde permaneceram até completarem o desenvolvimento larval. As pupas foram transferidas para recipiente Gerbox[®] (11 x 11 x 3,5 cm), sobre uma camada de vermiculita extrafina umedecida, onde permaneceram até a emergência dos parasitoides que constituíram as gerações seguintes, onde os insetos foram utilizados para realização dos experimentos.

Biologia de adultos de *D. brasiliensis*. Casais de *D. brasiliensis* recém emergidos foram individualizados em gaiolas plásticas formadas por copos de acrílico (500 mL), com a parte superior contendo tecido *nylon* (0,5 x 0,5 mm), para permitir a aeração e possibilitar o parasitismo das larvas de *A. fraterculus* que estavam alojadas nas unidades de parasitismo, colocadas sobre as gaiolas. No interior das gaiolas foram dispostos dois frascos, um contendo solução de mel 30% e outro contendo água destilada. Os insetos foram mantidos em câmaras climatizadas a 15, 18, 20, 22, 25, 28 e 30±1°C, umidade relativa de 70±20% e fotofase de 12 horas.

Após a formação dos casais foram ofertadas diariamente 30 larvas de 3º instar de *A. fraterculus* em unidades de parasitismo, até a morte das fêmeas. As unidades de parasitismo foram constituídas por larvas dispostas em placa de acrílico (1,7 cm de diâmetro x 0,5 cm de altura) com polpa de goiaba, sendo envolta em tecido “voile”. Após um período de 24 horas de exposição, as larvas foram mantidas em frascos de acrílico (5 cm de diâmetro x 6 cm de altura) contendo vermiculita extrafina umedecida. Cerca de 20 dias após o parasitismo, foi avaliado o número de moscas e parasitoides emergidos. Os pupários que permaneceram intactos foram abertos para se verificar a presença de moscas ou parasitoides, visando determinar a real taxa de parasitismo.

Foi avaliado o número de descendentes (ND), ritmo diário e acumulado de parasitismo, percentagem de emergência (E), razão sexual (rs) e longevidade de machos e fêmeas.

O número de descendentes foi obtido pela equação:

$$ND = \text{número de parasitoides emergidos} + \text{número de parasitoides não emergidos}$$

Para determinar o ritmo diário de parasitismo foi considerado somente o número de fêmeas que geraram descendentes em cada temperatura.

Para a determinação do percentual de emergência foi utilizada a seguinte equação:

$$E (\%) = \frac{\text{número de parasitoides emergidos} \times 100}{\text{número total de parasitoides}}$$

A razão sexual (rs) foi determinada utilizando a equação:

$$rs = \frac{\text{número de fêmeas}}{\text{número de fêmeas} + \text{número de machos}}$$

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema unifatorial. O fator de tratamento foi temperatura com sete níveis (15, 18, 20, 22, 25, 28 e 30°C) com 15 repetições, sendo cada repetição constituída por um casal de parasitoide.

Biologia de imaturos de *D. brasiliensis*. Larvas de *A. fraterculus* de 3º instar foram expostas ao parasitismo por 24 horas. Após, as mesmas foram transferidas para frascos de plástico (5 cm de diâmetro x 6 cm de altura), contendo vermiculita extrafina umedecida, para pupação e mantidas em câmaras climatizadas nas temperaturas de 15, 18, 20, 22, 25, 28 e 30±1°C, umidade relativa de 70±20% e fotofase de 12 horas. Diariamente foram realizadas observações para determinar a data de emergência dos parasitoides (machos e fêmeas), registrando assim, a duração do período ovo-adulto.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema unifatorial. O fator de tratamento foi temperatura com sete níveis, sendo utilizadas seis repetições e, cada repetição constituída por 20 larvas de *A. fraterculus*.

Elaboração da tabela de vida de fertilidade e determinação das exigências térmicas. A tabela de vida de fertilidade de *D. brasiliensis* foi calculada utilizando-se os dados de duração do período ovo-adulto, fecundidade, razão sexual, viabilidade e longevidade. Foram estimados o intervalo entre gerações (T) que representa o tempo médio entre a postura de uma geração e a postura da geração seguinte, taxa líquida de reprodução (Ro) que é a estimativa do número médio de fêmeas gerado por fêmea ao longo do período de oviposição e que chegarão na geração seguinte, taxa intrínseca de crescimento (rm) que é o fator relacionado com a velocidade de crescimento da população e a taxa finita de

crescimento (λ) que é o fator de multiplicação de crescimento diário da população. A partir da duração média dos períodos de desenvolvimento ovo-adulto de *D. brasiliensis* nas diferentes temperaturas, determinou-se a temperatura base (T_b) ou limiar térmico inferior de desenvolvimento e a constante térmica (K) pelo método da hipérbole.

Análise estatística. Os dados obtidos referente ao número de descendentes e razão sexual foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro Wilk; à homocedasticidade pelo teste de Hartley; e, a independência dos resíduos por análise gráfica. Após, os dados foram submetidos à análise de variância através do teste F ($p \leq 0,05$). Constatando-se significância estatística, os efeitos da temperatura foram avaliados por modelo de regressão polinomial quadrática ($p \leq 0,05$) representada pelas equações: $y = y_o + ax$ ou $y = y_o + ax + bx^2$, onde: y = variável resposta; y_o = variável resposta correspondente ao ponto mínimo da curva; a = valor máximo estimado para a variável resposta; b = declividade da curva; x = temperatura (SAS Institute, 2002). Para avaliar a variável longevidade foram construídas curvas de sobrevivência através do estimador de Kaplan-Meier, e posteriormente estas foram comparadas por meio do teste de log-rank (Francis et al., 1993).

A duração do período ovo-adulto foi analisada mediante uma análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste t a 5% de significância usando o programa estatístico JMP (versão 5.0.1.) e as exigências térmicas foram determinadas utilizando-se o software MOBAE (Modelos Bioestatísticos Aplicados à Entomologia) (Haddad et al., 1999).

Os parâmetros da tabela de vida de fertilidade foram estimados através da técnica de “jackknife” (Meyer et al., 1986) utilizando o software “Lifetable.sas” (Maia et al., 2013) no ambiente “SAS System”.

Resultados

Biologia de adultos de *D. brasiliensis*. Os dados referentes ao número total de descendentes gerados por fêmeas nas temperaturas estudadas se ajustaram à equação de

regressão polinomial quadrática ($F = 10,3010$; $gl = 5$; $P = 0,0453$) obtendo um coeficiente de determinação (R^2) de 0,87. Fêmeas mantidas a 20°C geraram o maior número de descendentes, perfazendo um acréscimo de 250% indivíduos, quando comparadas a temperatura de 15°C e de 489% quando comparado a temperatura de 28°C (Figura 1A). Entre o sexto e o décimo segundo dia, após a emergência foi gerado o maior número de descendentes na temperatura de 20°C (Figura 2). O número máximo de descendentes por fêmea estimado foi de 129,54 na temperatura de 21,26°C (Figura 1A).

Com o aumento da temperatura a razão sexual foi decrescendo e na faixa térmica estudada (15 a 28°C) esta resposta foi linear ($F = 16,9122$; $gl = 5$; $p = 0,0147$), com R^2 de 0,81, demonstrando adequado ajuste dos dados ao modelo estabelecido (Figura 1B). Fêmeas mantidas a 15, 20 e 22°C foram as que originaram a maior quantidade de descendentes fêmeas. A maior razão sexual foi registrada a 15°C e quando comparada as temperaturas de 20 e 22°C, estimou-se um decréscimo de 40 e 56%, respectivamente (Figura 1B). Porém, quando se analisa a razão sexual ao longo do período de oviposição, observa-se que no período entre o quarto e o 22º dia, nas temperaturas de 20 e 22°C, a razão sexual foi igual ou maior do que 0,5. Indicando que nesta faixa térmica, considerada ótima para *D. brasiliensis* ocorre a maior produção de fêmeas (Figura 3).

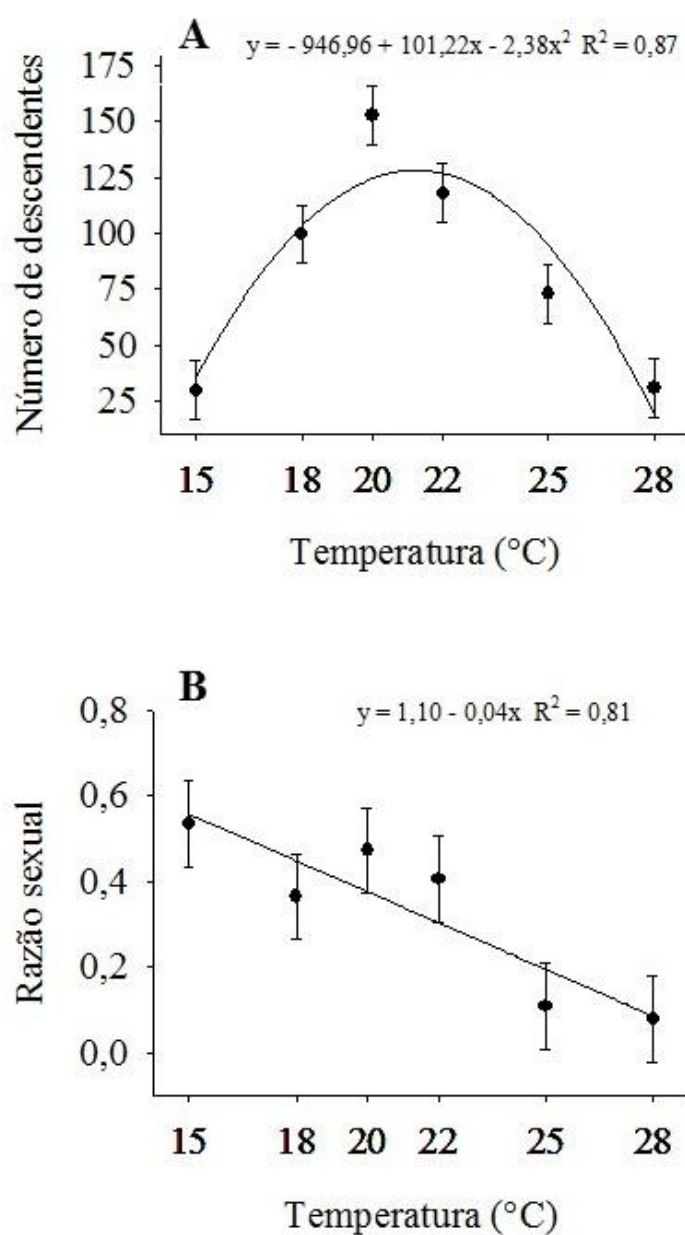


Figura 1. Número médio de descendentes por fêmea (A) e razão sexual (B) de *Doryctobracon brasiliensis* em larvas de *Anastrepha fraterculus* mantidos em seis diferentes temperaturas sob larvas de *Anastrepha fraterculus*. Umidade relativa do ar de $70 \pm 20\%$ e fotofase de 12 horas (As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%).

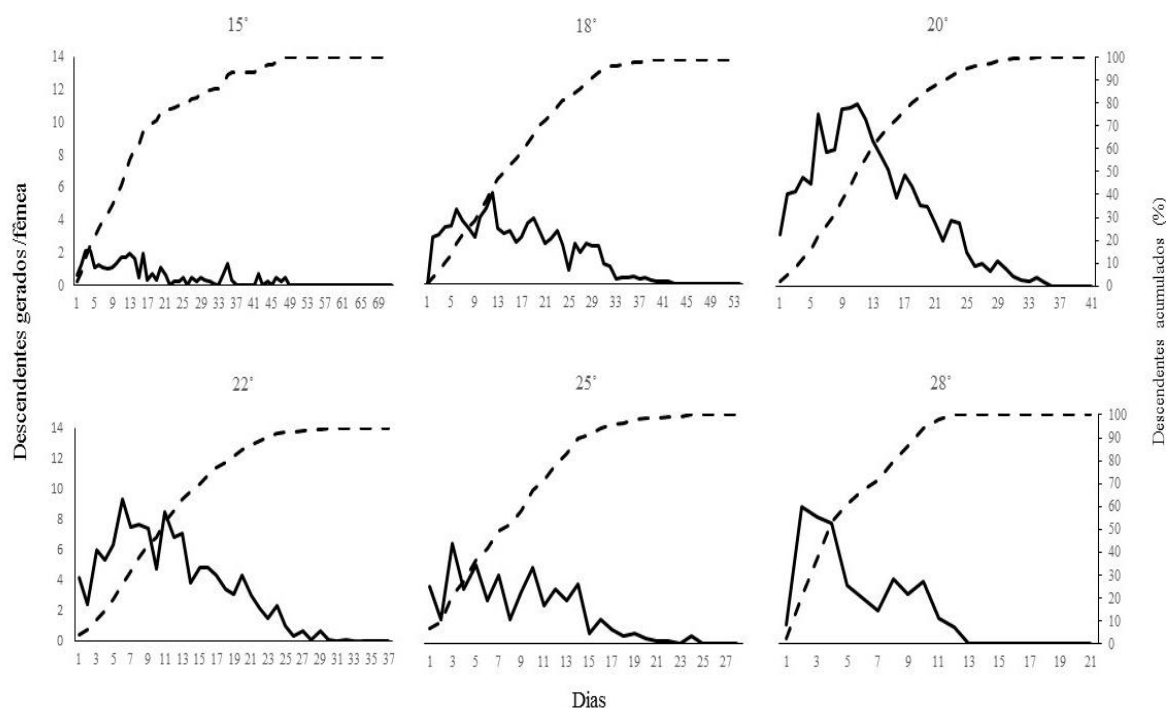


Figura 2. Número de descendentes gerados diariamente (—) e acumulado (---) por fêmea de *Doryctobracon brasiliensis* em larvas de *Anastrepha fraterculus* mantidos em seis diferentes temperaturas. Umidade relativa do ar de $70 \pm 20\%$ e fotofase de 12 horas.

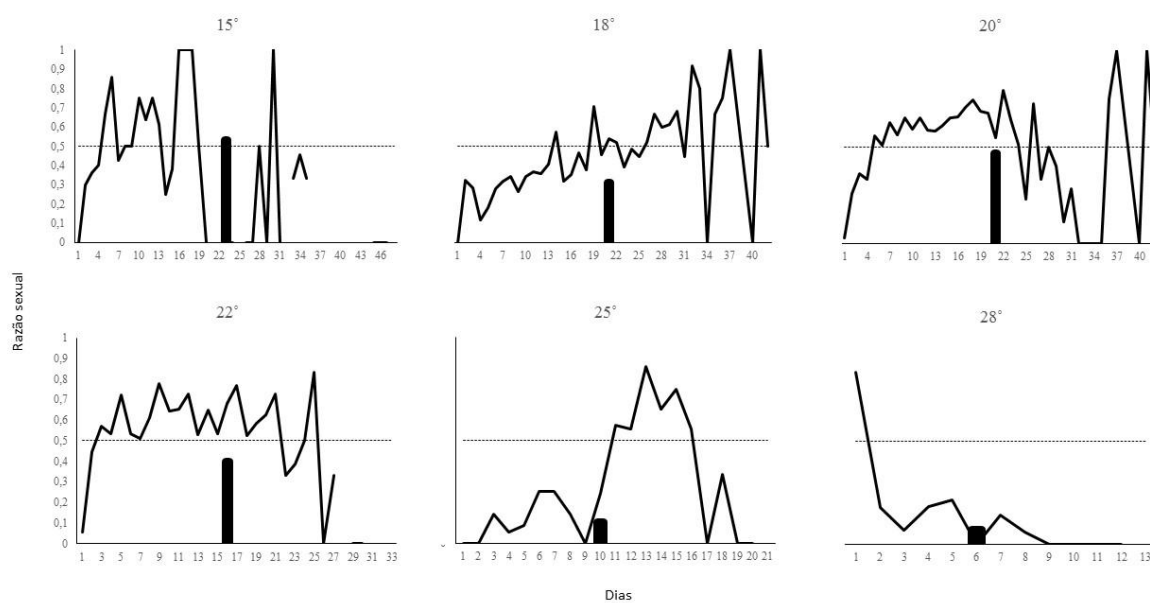


Figura 3. Razão sexual média (■) e diária (—) de *Doryctobracon brasiliensis* em larvas de *Anastrepha fraterculus* mantidos em seis diferentes temperaturas. Umidade relativa do ar de $70 \pm 20\%$ e fotofase de 12 horas.

A longevidade dos machos ($\chi^2 = 56,76$; $gl = 6$; $p < 0,0001$) e das fêmeas ($\chi^2 = 93,55$; $gl = 6$; $p < 0,0001$) também foi afetada significativamente pela temperatura (Figura 4). Os machos foram mais longevos na faixa térmica de 15 a 20°C, enquanto que para as fêmeas a maior longevidade ocorreu na faixa térmica de 15 a 18°C (Figura 4).

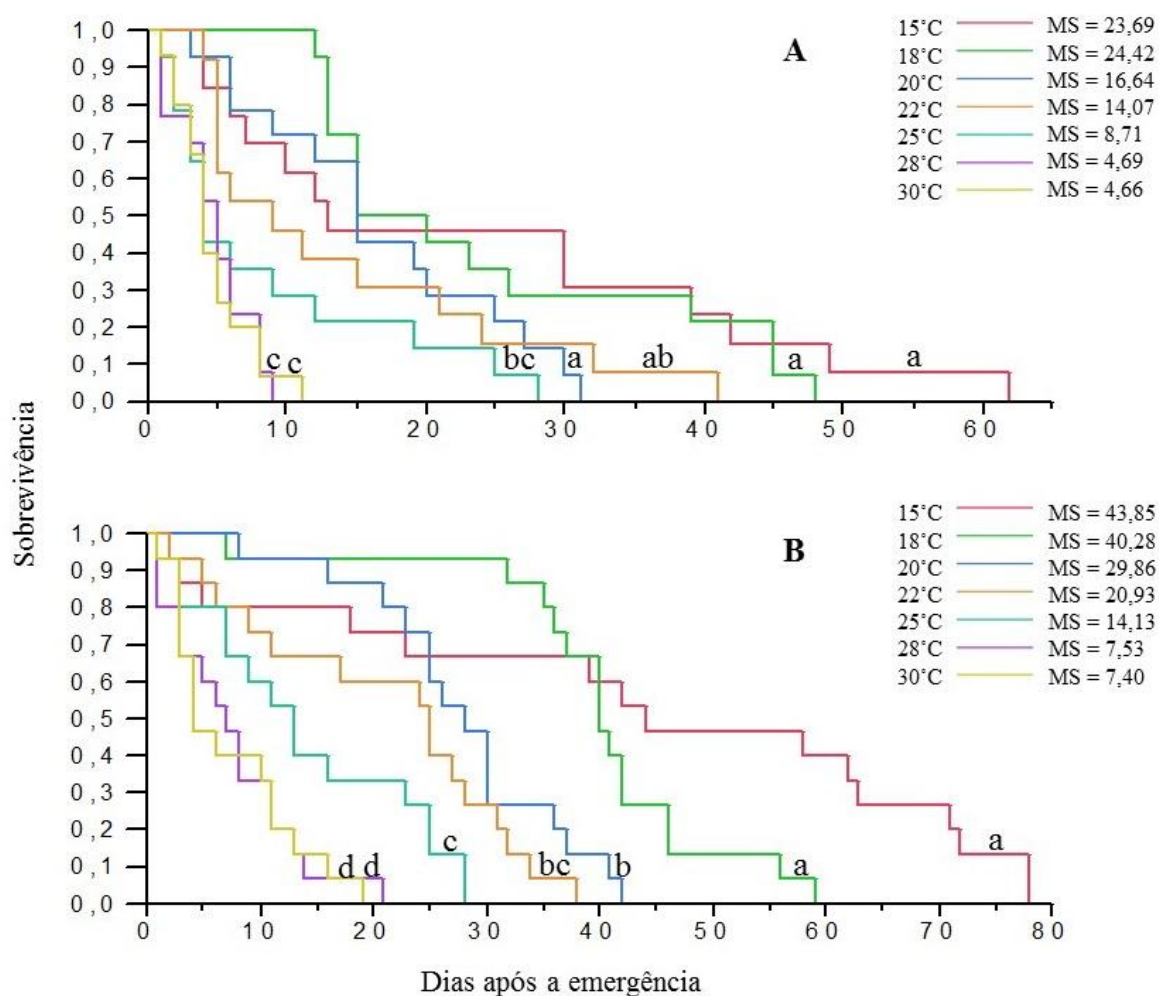


Figura 4. Curvas de sobrevivência de machos (A) e fêmeas (B) de *Doryctobracon brasiliensis* em larvas de *Anastrepha fraterculus* mantidos em sete diferentes temperaturas. MS = Média de sobrevivência. Umidade relativa do ar de $70 \pm 20\%$ e fotofase de 12 horas. Curvas identificadas com as mesmas letras não diferem significativamente entre si.

Biologia de imaturos de *D. brasiliensis*. A duração do desenvolvimento do período ovo-adulto de *D. brasiliensis* foi inversamente proporcional a temperatura, variando de 20,91 a 41,17 dias nas temperaturas de 25 a 18°C, respectivamente ($F = 768,33$; $gl = 3$; $p < 0,001$) (Figura 5). Não houve desenvolvimento nas temperaturas de 15, 28 e 30°C. Nas temperaturas de 15, 28 e 30°C não ocorreu desenvolvimento dos imaturos.

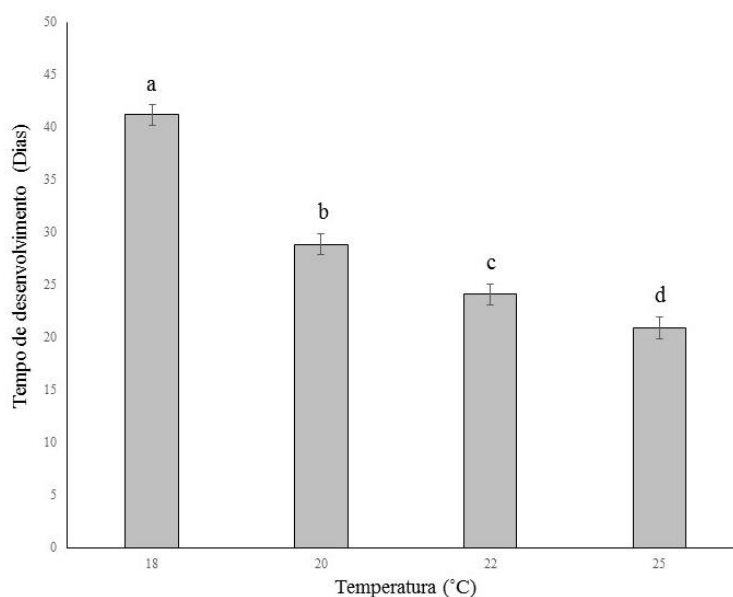


Figura 5. Duração do desenvolvimento ovo-adulto de *Doryctobracon brasiliensis* em larvas de *Anastrepha fraterculus* mantidos em quatro diferentes temperaturas. Umidade relativa do ar de $70 \pm 20\%$ e fotofase de 12 horas. Colunas seguidas com letras diferentes diferem entre si pelo teste t ($p \leq 0,05$).

Tabela de vida de fertilidade e determinação das exigências térmicas. Os dados utilizados para calcular a taxa líquida de reprodução (R_0) de *D. brasiliensis* ajustaram-se ao modelo de regressão polinomial quadrática ($F = 574,7266$; $gl = 3$; $p = 0,0295$; R^2 de 0,99) (Figura 6A). A maior taxa líquida de reprodução ocorre nas temperaturas de 20 e 22°C, sendo que a maior R_0 estimada (47) ocorre na temperatura de 21°C. Este mesmo comportamento também ocorre para a taxa intrínseca de crescimento (r_m). Os dados se ajustaram ao modelo de regressão polinomial quadrática ($F = 1109,1046$; $gl = 3$; $p = 0,0212$; $R^2 = 0,99$) (Figura 6B).

Os dados do intervalo médio entre gerações (IMG) de *D. brasiliensis* ajustaram-se ao modelo polinomial quadrático ($F = 1731,6664$; $gl = 3$; $p = 0,0170$; $R^2 = 0,99$) (Figura 6C). Ao realizar a comparação entre as temperaturas verificou-se que fêmeas expostas a 20 e 22°C obtiveram decréscimos na IMG, respectivamente de 32,3 e 36,2%, quando comparadas a temperatura de 18°C. Baseado na equação, o menor intervalo entre as gerações ocorre na temperatura de 22,5°C.

O tempo de duplicação entre gerações (TD) de *D. brasiliensis* apresentou comportamento quadrático, com adequado ajuste dos dados ao modelo estabelecido ($F = 485,4176$; $gl = 3$; $p < 0,0001$; $R^2 = 0,95$) (Figura 6D). Fêmeas expostas às temperaturas de 18, 20 e 22°C duplicaram a geração mais rapidamente em relação as mantidas a 25°C. Ao realizar a comparação entre as temperaturas observou-se que fêmeas expostas a 18, 20 e 22°C obtiveram decréscimos na TD de mais de 500%, quando comparadas a temperatura de 25°C. Baseado na equação, o mínimo TD foi obtido com a temperatura de 21,8°C.

Da mesma forma que os parâmetros anteriores, os dados da razão finita de crescimento (λ) de *D. brasiliensis* também se ajustaram ao modelo polinomial quadrático ($F = 9,4071$; $gl = 5$; $p = 0,0510$; $R^2 = 0,86$) (Figura 6E). Os maiores valores ocorreram a 20 e 22°C, enquanto nas temperaturas de 18 e 25°C os valores foram reduzidos. Comparando as temperaturas, observou-se que fêmeas expostas a 20 e 22°C obtiveram acréscimos na razão finita de crescimento (λ) de 15,1 e 12,8%, respectivamente, quando comparadas a temperatura de 18°C. A máxima razão finita de crescimento (λ) foi obtida com a temperatura de 20,5°C.

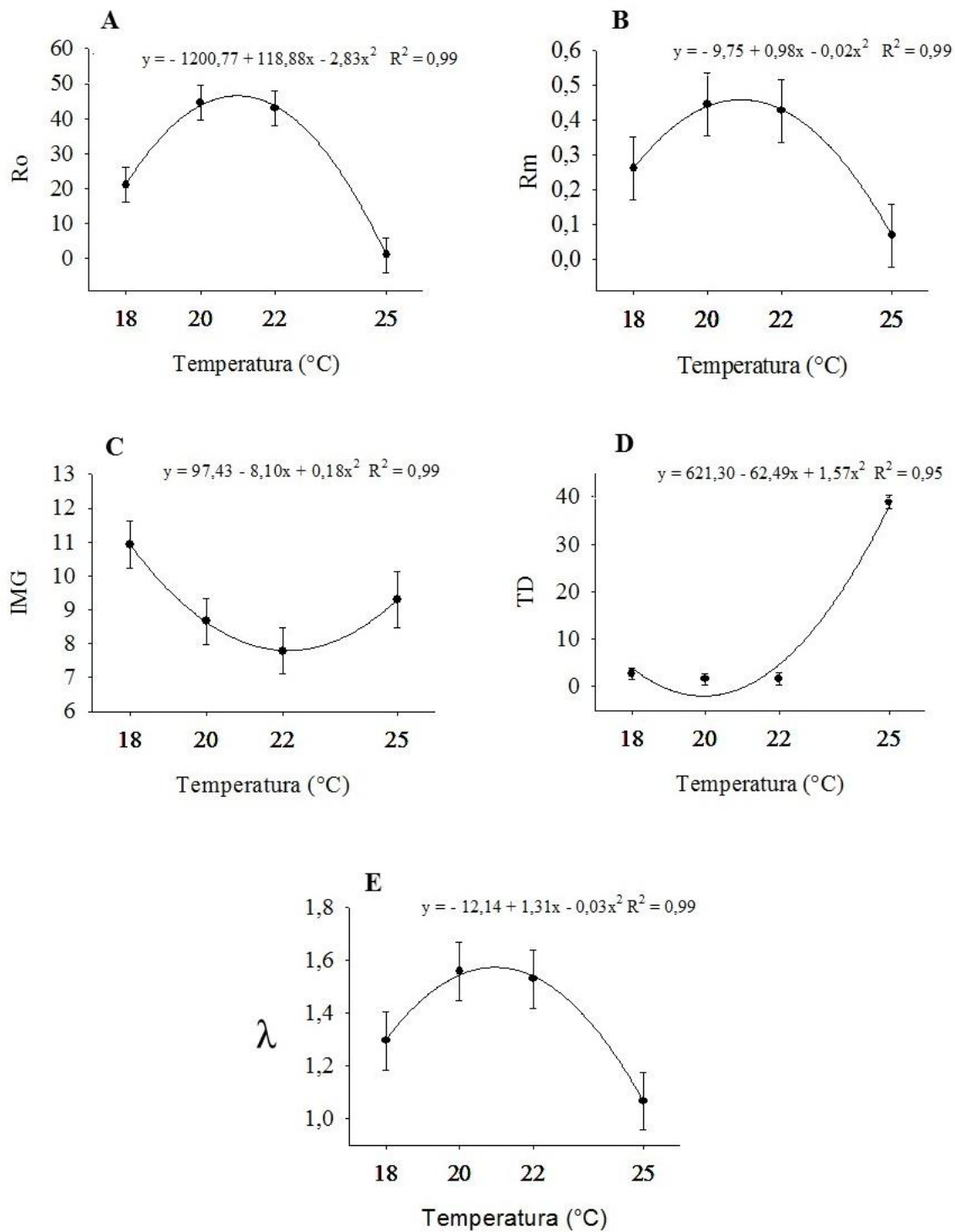


Figura 6. Parâmetros da tabela de vida de fertilidade de *Doryctobracon brasiliensis* em larvas de *Anastrepha fraterculus*. A) Taxa líquida de reprodução (Ro); B) taxa intrínseca de crescimento (Rm); C) intervalo médio entre gerações (IMG); D) tempo de duplicação (TD); e, E) razão finita de crescimento (λ) em diferentes temperaturas. As barras verticais representam os intervalos de confiança a 95%.

Com base na duração média do período de desenvolvimento ovo-adulto de *D. brasiliensis* nas temperaturas de 18, 20, 22 e 25°C determinou-se que o limite térmico inferior de desenvolvimento (T_b) foi de 10,0°C e a constante térmica (K) de 303,2 graus-dias (Figura 7).

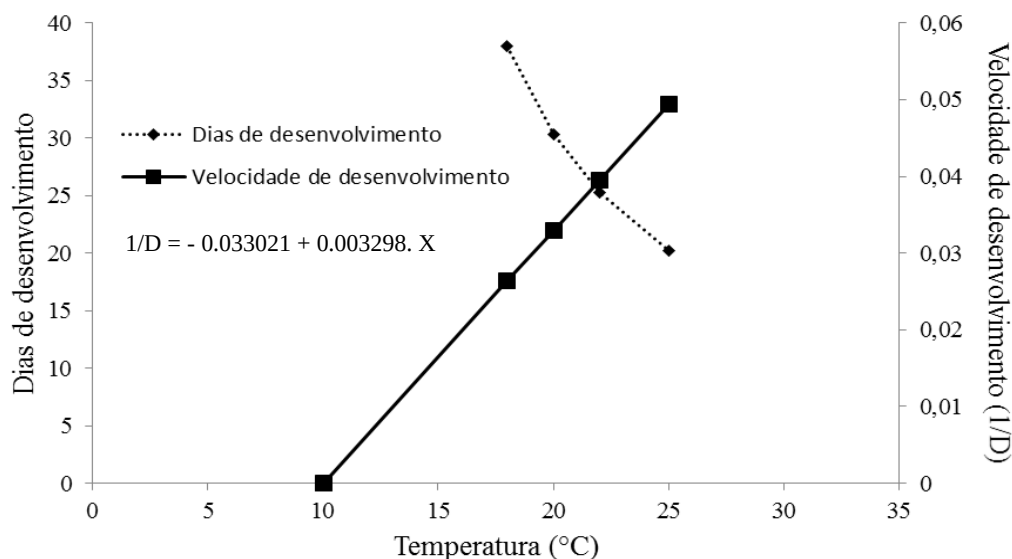


Figura 7. Curva de velocidade de desenvolvimento do período ovo-adulto de *Doryctobracon brasiliensis* em larvas de *Anastrepha fraterculus*, mantidos em quatro diferentes temperaturas. Umidade relativa de 70±20% e fotofase de 12h.

Discussão

As informações obtidas neste estudo demonstram que a temperatura influencia os parâmetros biológicos de *D. brasiliensis* tanto no período pré-imaginal, quanto na fase adulta, afetando o seu desenvolvimento. De uma maneira geral as temperaturas de 20 e 22°C foram as que propiciaram o melhor desenvolvimento e a maior reprodução do parasitoide.

A maior capacidade reprodutiva de *D. brasiliensis* ocorreu no início da fase adulta das fêmeas em todas as temperaturas, exceto para a temperatura de 30°C, onde não ocorreu reprodução. As temperaturas de 15, 28 e 30°C foram letais para a fase jovem de *D. brasiliensis*. A temperatura de 20°C foi a que gerou o maior número de descendentes,

associada a uma adequada razão sexual e alta sobrevivência. Segundo Hance et al. (2007) os extremos de temperatura podem ocasionar a diminuição da longevidade, sobrevivência e fecundidade de parasitoides. Os resultados obtidos são próximos do relatado para outros parasitoides de moscas-das-frutas, como *Psytalia cosyrae* (Wilkinson, 1927) (Hymenoptera: Braconidae) criado em *Ceratitis cosyra* (Walker, 1849) (Diptera: Tephritidae) (Mohamed et al., 2006) *Fopius arisanus* (Sonan, 1932) (Hymenoptera: Braconidae) e *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead, 1905) (Hymenoptera: Braconidae) criados em *Bactrocera invadens* Drew (Diptera: Tephritidae) (Appiah et al., 2013).

A faixa de temperatura mais adequada para obtenção do maior número de descendentes de *D. brasiliensis* foi de 18 a 22°C. Este resultado é próximo ao obtido por Gonçalves et al. (2014), que relataram o maior número de descendentes para *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes, 1924) (Hymenoptera: Figitidae) em larvas de *A. fraterculus* nesta mesma faixa de temperatura. Por outro lado, trabalhos com parasitoides de moscas-das-frutas comprovam que a faixa de temperatura de 20-25°C é a mais adequada para o parasitismo (Hurtrel et al., 2001; Appiah et al., 2013). Para *D. longicaudata* criada em larvas de *B. invadens* a temperatura de 25°C gera a maior quantidade de descendentes (21,8) e *F. arisanus* criado em ovos desse mesmo hospedeiro, também apresenta maior quantidade de descendentes (97,5) a 25°C (Appiah et al., 2013).

O ritmo diário de parasitismo apresentou oscilações em todas as temperaturas com visível declínio ao longo da vida das fêmeas, porém na temperatura de 20°C, a maior quantidade de descendentes foi gerada do quinto ao décimo segundo dia. Cancino (2002) observou que a oviposição de *D. longicaudata* se intensifica a partir do quinto dia e se estende por um período que varia entre dez e quinze dias. A partir desta observação, foi possível otimizar a criação massal de *D. longicaudata* na biofábrica Moscafrut, ofertando larvas no período de maior parasitismo (Cancino et al., 2006). Após o pico de oviposição que ocorre

nos primeiros dias, a capacidade de oviposição das fêmeas é reduzida drasticamente (Cancino, 2002), como ocorreu com *D. brasiliensis*.

O parasitismo acumulado apresentado por *D. brasiliensis* na temperatura de 20°C foi de 80% ao décimo oitavo dia, resultado este, superior ao descrito para parasitoide *D. longicaudata*, que nesta data apresentou parasitismo acumulado de 70% a 26°C (López et al., 2009). Provavelmente, *D. brasiliensis* apresenta maior nível de parasitismo a campo nas regiões de clima sub-tropical e temperado do Sul do Brasil, onde *D. longicaudata* apresentou alguns problemas de adaptação (Sugayama, 2000).

A temperatura esteve intimamente ligada com a razão sexual dos descendentes gerados, pois fêmeas mantidas em temperatura de 20°C geraram descendentes com razão sexual elevada ($>0,5$) e estável por mais tempo (5-23º dia). Segundo Cancino et al. (2002) a razão sexual dos parasitoides de mosca-das-frutas, pode ser afetada por fatores como qualidade do hospedeiro, temperatura e fotoperíodo. A razão sexual de parasitoides é um fator limitante em criação massal de parasitoides em programas de controle biológico aplicado, devendo ser tendenciosa para indivíduos fêmeas, para que possa ocorrer maior taxa de crescimento populacional e também porque machos não contribuem para a mortalidade da praga (Heimpel & Lundgren, 2000).

A longevidade de *D. brasiliensis* foi influenciada pela temperatura, e no geral, foi menor para os parasitoides mantidos nas temperaturas mais elevadas. O efeito negativo de altas temperaturas na longevidade de parasitoides braconídeos está bem estudada. Por exemplo, Mohamed et al. (2006) relataram que a longevidade de *P. cosyrae* foi maior em 25°C do que a 27 e 30°C para ambos os sexos. Machos e fêmeas de *F. arisanus* e *D. longicaudata* também foram mais longevos na temperatura de 15°C do que 25, 30 e 35°C (Appiah et al., 2013). Para o figitídeo *A. pelleranoi*, este mesmo efeito foi observado por Gonçalves et al. (2014) onde machos e fêmeas sobreviveram por maior tempo na temperatura

de 18 que 25, 28 e 30°C. Provavelmente isso ocorra em função de que insetos mantidos em alta temperatura constantemente sofrem com a perda de água (Denlinger & Yocum, 1998). Mas em condições de campo é provável que o inseto sobreviva a tais temperaturas, pois temperaturas extremas por longos períodos de tempo são raras, geralmente ocorre variações de temperatura durante o dia. Embora, a 15 e 18°C os insetos tenham sobrevivido por mais tempo, o maior número de descendentes foi obtido das fêmeas mantidas a 20 e 22°C.

O tempo de desenvolvimento de *D. brasiliensis* de ovo a adulto foi inversamente proporcional na faixa térmica de 18 a 25°C. Temperaturas extremas constantes foram prejudiciais a este parasitoide, principalmente, as temperaturas de 15, 28 e 30°C, possivelmente ao fato de *D. brasiliensis* não estar adaptado a estas condições, visto que se trata de uma espécie originária de regiões temperadas assim como para *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) onde nas temperaturas de 29 e 30°C também não ocorre desenvolvimento pré-imaginal (Hurtrel et al., 2001). Parasitoides com origem em regiões tropicais como *F. arisanus* e *D. longicaudata*, resistem mais a temperaturas elevadas, completando seu desenvolvimento a 30°C (Appiah et al., 2013). Porém, como o desenvolvimento pré-imaginal dos parasitoides de moscas-das-frutas ocorrem dentro dos frutos, os quais estão protegidos de temperaturas excessivas (Fletcher, 1987), assim, é possível que *D. brasiliensis* possa ser utilizado em regiões de clima tropical.

Baseado na taxa líquida de reprodução, as temperaturas mais favoráveis a reprodução de *D. brasiliensis* foram de 20 e 22°C. Nestas mesmas temperaturas, o número de vezes que a população aumentou a cada geração é próxima de 102%, quando comparado a temperatura de 18°C, assim como a razão finita de crescimento que também foi superior a 20 e 22°C. Nestas temperaturas também ocorre o menor tempo para a população duplicar. Assim, temperaturas de 20 e 22°C promovem maior crescimento populacional do parasitoide, tendo em vista que o incremento populacional depende do número de fêmeas sobreviventes e da produção

individual em cada intervalo de tempo. No entanto, *D. brasiliensis* pode expandir sua população em intervalo de temperatura de 18 a 25°C, baseado nos resultados deste trabalho. Assim, sugere-se que este parasitoide está mais bem adaptado ao clima temperado e subtropical. Os resultados apontam que *D. brasiliensis* apresenta potencial para controlar *A. fraterculus*, principalmente em aéreas com temperaturas mais amenas, onde esta praga é responsável pelas maiores perdas da fruticultura. Entretanto, é necessário a realização de outros estudos e que possibilitem discriminar o seu potencial com outras espécies de parasitoides.

Embora não haja dados de exigências térmicas de *D. brasiliensis* observa-se que o valor estimado é superior ao relatado para outras espécies de parasitoides de moscas-das-frutas. Por exemplo, Hurtrel et al. (2001) ao estudar o desenvolvimento de *D. tryoni* em diferentes temperaturas determinaram valores de Tb e K de 9,19°C e 322,6 graus-dia, respectivamente. Para *F. arisanus* os valores de Tb foi 10,1°C e de K de 359,59 graus-dia e para *D. longicaudata* os valores de Tb e K foram de 10,4°C e 281,6 graus-dias, respectivamente (Appiah et al., 2013).

A temperatura base de 10,01°C e a constante térmica de 303,21 graus dia de *D. brasiliensis* foram ligeiramente inferiores aos valores determinados por Salles (2000) para *A. fraterculus* (10,7 e 430,6, respectivamente), considerado o principal hospedeiro deste parasitoide. Provavelmente, *D. brasiliensis* deve ser capaz de causar impacto sobre a população da praga, já que este parasitoide apresenta sua temperatura ótima para o desenvolvimento dentro do intervalo estimado para *A. fraterculus*. Em relação a velocidade de desenvolvimento verificou-se que existe uma relação linear positiva com esta temperatura, assim como descreve Bursell (1974), que baixas temperaturas afetam a velocidade de desenvolvimento biológico dos insetos, promovendo o alongamento do ciclo. Uma pré-condição necessária para que o controle biológico supra uma população de insetos-praga, está

relacionada com a co-ocorrência (denso-dependencia) dos agentes de controle biológico com as pragas (Zhou et al., 2010). Normalmente, os insetos-praga ocorrem mais cedo do que os seus inimigos naturais em campo. Assim, para que o controle biológico possa atuar evitando perdas economicas das pragas, uma das alternativas é utilizar o controle biológico aplicado por meio da criação massal e liberação inundativa dos parasitoides (Pu, 1978). Os resultados obtidos, indicam que o controle biológico de *A. fraterculus* com o parasitoide *D. brasiliensis* pode ser viável e que as melhores condições térmicas para sua criação em laboratório são próxima de 21°C.

Considerações finais

Por meio da elaboração da tabela de vida de fertilidade foi possível determinar que as temperaturas de 20 e 22°C foram as mais adequadas para o desenvolvimento e reprodução de *D. brasiliensis* em relação as temperaturas de 15, 28 e 30°C. Além disto, a determinação da temperatura base de 10,0°C e dos graus-dias de 303,2 pode prever a produção de parasitoides, auxiliando as criações em laboratório comerciais.

Referências

- AGUIAR-MENEZES, E.L.; MENEZES, E.B. Natural occurrence of parasitoids of *Anastrepha* spp. Schiner, 1868 (Diptera: Tephritidae) in different host plants, in Itaguaí (RJ), Brazil. **Biological Control**, v.8, p.1-6, 1997.
- APPIAH, E.F.; EKESI, S.; SALIFU, D.; AFREH-NUAMAH, K.; OBEGON-OFORI, D.; KHAMIS, F.; MOHAMED, S.A. Effect of temperature on immature development and longevity of two introduced Opiine parasitoids on *Bactrocera invadens*. **Journal of Applied Entomology**, v.137, p.571-579, 2013.
- BURSELL, E. Environmental aspects: temperature. In: Rockstein, M. The Physiology of Insect. 2º ed. New York: Academic Press, 1974, p.1-41.

CANCINO, J.; VILLALOBOS, P.; DE LA TORRE, S. Changes in the rearing process to improve the quality of mass production of the fruit parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). In: LEPPLA, N.V.; BLOEM, K.A.; LUCK, R.F. (Eds.) **Proceeding of 7th workshop of the global IOBC Working Group**: Quality control of mass reared arthropods. Rimmi, Italy, 2002. P.74-82.

CANCINO, J.; LÓPEZ, P.; VILLALOBOS, P.L.; HIPÓLITO, P.; QUINTERO, J.L.; MATTIACCI, L. **Control de calidad en la cría masiva de *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae)**: fundamentos y procedimientos. Sagarpa, Senasica, Mexico, 2006. 54p.

CARVALHO, R. da S.; NASCIMENTO, A.S.; MATRANGOLO, W.J.R. Controle biológico. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Eds.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2000. p.113-117.

CIVIDANES, F.J. **Uso de graus-dias em entomologia**: com particular referência ao controle de percevejos pragas da soja. Jaboticabal: Funep, 2000, 31p.

DENLINGER, D.L.; YOCUM, G.D. Physiology of heat sensitivity. In: HALLMAN, G.J.; DENLINGER, D.L. (Eds.) **Temperature sensitivity in insects and application in integrated pest management**. Boulder: Westview Press, 1998. p.7-57.

FLETCHER, B.S. The biology of dacinae fruit flies. **Annual Review of Entomology**, v.32, p.115-144, 1987.

FRANCIS, B.; GREEN, M.; PAYNE, C. **Statistical system for generalized linear interactive modelling**. Clarendon Press, Oxford, UK, 1993, 82p.

GARCIA, F.R.M.; CORSEUIL, E. Native hymenopteran parasitoids associated with fruit flies (Diptera: Tephritoidea) in Santa Catarina State, Brazil. **The Florida Entomologist**, v.87, p.517-521, 2004.

- GARCIA, F.R.M.; LARA, D.B. Análise faunística e flutuação populacional de moscas-das-frutas (Diptera, Tephritidae) em pomar cítrico no município de Dionísio Cerqueira, Santa Catarina. **Biotemas**, v.19, p.65-70, 2006.
- GONÇALVES, R.S.; NAVA, D.E.; ANDREAZZA, F.; LISBÔA, H.; NUNES, A.M.; GRUTZMACHER, A.D.; VALGAS, R.A.; MAIA, A.H.N.; PAZIANOTTO, R.A.A. Effect of constant temperatures on the biology, life table, and thermal requirements of *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae), a parasitoid of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). **Environmental Entomology**, v.43, p.491-500, 2014.
- HADDAD, M.L.; PARRA, J.R.P.; MORAES, R.C.B. **Métodos para estimar os limites térmico inferior e superior de desenvolvimento de insetos**. Piracicaba: Fealq, 1999. p.29.
- HALLMAN, G.J.; DENLINGER, D.L. Introduction: temperature sensitivity and integrated pest management. In: HALLMAN, G.J.; DENLINGER, D.L. (Eds.) **Temperature sensitivity in insects and application in integrated pest management**. Boulder: Westview Press, 1998. p.1-6.
- HANCE, T.; VAN BAAREN, J.; VERNON, P.; BOIVIN, G. Impact of extreme temperatures on parasitoids in a climate change perspective. **Annual Review of Entomology**, v.52, p.107-126, 2007.
- HARTER, W.R.; GRUTZMACHER, A.D.; NAVA, D.E.; GONÇALVES, R.G.; BOTTON, M. Isca tóxica e disrupção sexual no controle da mosca-da-fruta sul-americana e da mariposa-oriental em pessegueiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, n.3, p.229-235, 2010.
- HEIMPEL, G.E.; LUNDGREN, J.G. Sex ratios of commercially reared biological control agents. **Biological Control**, v.19, p.77-93, 2000.
- HURTREL, B.; QUILICI, S.; NÉNON, J.; LELANNIC, E.J. Preimaginal developmental biology of *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron), a parasitoid of the mediterranean fruit fly. **International Journal of Tropical Insect Science**, v.21, p.81-88, 2001.

KOVALESKI, A. **Processos adaptativos na colonização da maçã (*Malus domestica*) por *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) na região de Vacaria, RS.** São Paulo: USP, 1997. 122f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LEONEL, J.R.; ZUCCHI, F.L.; WHARTON, R.A. Distribution and tephriti hosts (Diptera) of braconid parasitoids (Hymenoptera) in Brazil. **International Journal of Pest Management**, v.41, p.208-213, 1995.

LÓPEZ, O.P.; HÉNAUT, Y.; CANCINO, J.; LAMBIN, M.; CRUZ-LÓPEZ, L.; ROJAS, J.C. Is host size an indicator of quality in the mass-reared parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae)? **Florida Entomologist**, v.92, n.3, p.441-449, 2009.

MACHADO, D.L.M.; STRUIVING, T.B.; SANTOS, D.; SOUZA, S.A.S.; SIQUEIRA, D.L. Levantamento de moscas-das-frutas e seus parasitoides em citros, no município de Viçosa. **Revista Ceres**, v.59, n.6, p.877-880, 2012.

MAIA, A.deH.N.; PAZIANOTTO, R.A.A.; LUIZ, A.J.B.; PERVEZ, A. Modelling influence of quantitative factors on arthropod demographic parameters. In: 58º Reunião anual da região brasileira da sociedade internacional de biometria: 15º simpósio de estatística aplicada à experimentação agrônômica, 2013, Campina Grande. **Anais...** Sociedade Internacional de Biometria, 2013. P. 40-47.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A.; SUGAYAMA, R.L. Biogeografia. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Eds.). **Moscas-das-Frutas de Importância Econômica no Brasil: Conhecimento Básico e Aplicado.** Ribeirão Preto: Holos, 2000. p.93-98.

MARINHO, C.F.; SOUZA-FILHO, M.F. de; RAGA, A.; ZUCCHI, R.A. Parasitoides (Hymenoptera: Braconidae) de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no estado de São

Paulo: plantas associadas e parasitismo. **Neotropical Entomology**, v.38, n.3, p.321-326, 2009.

MOHAMED, S.A.; OVERHOLT, W.A.; WHARTON, R.A.; LUX, S.A. Effects of temperature on development time and longevity of *Psytalia cosyrae* (Hymenoptera: Braconidae). **Biocontrol Science and Technology**, v.16, p.717-726, 2006.

NAVA, D.E.; BOTTON, M. Bioecologia e controle de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* em pessegueiro. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 29p. (Embrapa Clima Temperado, Documentos, 315).

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

NUNES, A.M.; NAVA, D.E.; MÜLLER, F.A.; GONÇALVES, R.S.; GARCIA, M.S. Biology and parasitic potential of *Doryctobracon areolatus* on *Anastrepha fraterculus* larvae. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, p.669-671, 2011.

NUNES, A.M.; COSTA, K.Z.; FAGGIONI, K.M.; COSTA, M.L.Z.; GONÇALVES, R.S.; WALDER, J.M.M.; GARCIA, M.S.; NAVA, D.E. Dietas artificiais para a criação de larvas e adultos da mosca-das-frutas sul-americana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.48, p.1309-1314, 2013.

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, p.81-107, 2000.

OVRUSKI, S.M.; SCHLISERMAN, P. First records of hymenopterous larval-pupal parasitoids of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in the northwestern province of

Catamarca, Argentina. **Proceedings of the Entomological Society**, v.105, p.1056-1059, 2003.

PARRA, J.R.P. Técnicas de criação de *Anagasta kuehniella*, hospedeiro alternativo para produção de *Trichogramma*. In: PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A. (Eds). **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: FEALQ, 1997. p.121-150.

PU, Z.L. **Theory and technique of biological pest control**. China Science Press, Beijing, China. 1978

RAGA, A.; PRESTES, D.A.O.; SOUZA FILHO, M.F. de; SATO, M.E.; SILOTO, R.C.; GUIMARÃES, J.A.; ZUCCHI, R.A. Fruit fly (Diptera: Tephritoidea) infestation in citrus in the State of São Paulo, Brazil. **Neotropical Entomology**, v.33, n.1, p.85-89, 2004.

SALLES, L.A.B. **Bioecologia e controle da moscas-das-frutas sul-americana**. Pelotas, RS: Embrapa CPACT, 1995. 58p.

SALLES, L.A.B. Parasitismo de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) por Hymenoptera, na região de Pelotas, RS. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, n.11, p.769-774, 1996.

SALLES, L.A.B. Bioecologia e ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus*. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R.A. (Eds.) **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p.81-86.

SAS Institute. **SAS system for Windows, version 9.1**. Cary: SAS Institute, 2002.

SUGAYAMA, R.L. ***Anastrepha fraterculus* (Wiedeman) (Diptera: Tephritidae) na região produtora de maçãs do Rio Grande do Sul: relação com os inimigos naturais e potencial para o controle biológico**. 2000. 117f. Tese (Doutorado) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

TERBLANCHE, J.S.; DEERE, J.A.; CLUSELLA-TRULLAS, S.; JANION, C.; CHOWN, S.L. Critical thermal limits depend on methodological context. **Biological Sciences**, v.274, n.1628, p.2935–2943, 2007.

ZHOU, Z.S.; GUO, J.Y.; CHEN, H.S.; WAN, F.H. Effects of temperature on survival, development, longevity and fecundity of *Ophraella communa* (Coleoptera: Chrysomelidae), a biological control agent against invasive ragweed, *Ambrosia artemisiifolia* L. (Asterales: Asteraceae). **Environmental Entomology**, v.39, p.102-1027, 2010.

Artigo 3 – Revista: Neotropical Entomology

**Mass rearing of native parasitoids from the Americas for biological control of
Anastrepha obliqua (Macquart) (Diptera: Tephritidae)**

S Poncio¹, P Montoya², J Cancino², DE Nava³

¹ Programa de Pós-graduação em Fitossanidade, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil

² Programa Moscafrut SAGARPA-IICA, Metapa de Domínguez, Chiapas, México

³ Laboratório de Entomologia, Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, Brasil

Abstract

The success of mass rearing of parasitoids is directly related to the host quality, which includes selecting the best biological stage of the host to ensure optimal performance of parasitoids released into the field. This study investigated the development of larval parasitoids *Utetes anastrephae* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae) and *Odontosema anastrephae* Borgmeier (Hymenoptera: Eucoilidae), and pupal parasitoids *Coptera haywardi* (Ogloblin) (Hymenoptera: Diapriidae) and *Dirhinus* sp. (Hymenoptera: Chalcididae) under laboratory conditions, using larvae and pupae of *Anastrepha obliqua* (Macquart) of different

ages as hosts. Not all parasitoid species developed with the same efficiency in immatures of *A. obliqua*, and *U. anastrephae* and *C. haywardi* showed the greatest potential. The development of *U. anastrephae* was most successful in young larvae (5-6 days) and that of *C. haywardi* in 4-5-day-old pupae, mainly. These data suggest that native parasitoids can be used to strengthen the implementation of biological-control projects against *A. obliqua*, a pest of economic importance in mango crops.

Keywords: *Utetes anastrephae*, *Odontosema anastrephae*, *Coptera haywardi*, *Dirhinus* sp.

Introduction

Anastrepha obliqua (Macquart) is a pest species of fruit fly (Diptera: Tephritidae) very economic importance in the Americas. Its native hosts are fruits of the genus *Spondias* spp. (Aluja & Birke 1993). The commercial importance of *A. obliqua* is related mainly to damage caused to mango crops in Mexico and tropical America (Peña *et al* 2009).

Integrated management of this pest has effectively reduced its populations, and biological control can play an important part (Ovruski *et al* 2000). Biological control of fruit flies has been based mainly on augmentative release of parasitoids for short-term suppression of pest populations, which primarily requires mass rearing of the host (Montoya *et al* 2000, Ovruski *et al* 2000, Garcia & Ricalde 2013).

Augmentative releases have been conducted with the exotic parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), a species that has acted efficiently in population control of flies of the genus *Anastrepha* (Sivinski *et al* 1996, Montoya *et al* 2000, Paranhos *et al* 2003, Garcia & Ricalde 2013). However, in the Americas, a wide variety of important species of native parasitoids may have an important role in population control of *Anastrepha* spp.

Native parasitoids of *Anastrepha* with good potential for biological control include *Utetes anastrephae* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae), which occurs from Florida, USA, to Argentina (Ovruski *et al* 2000); and *Odontosema anastrephae* Borgmeier (Hymenoptera: Eucilidae), which oviposits in larvae by direct contact through holes in the fruits and, in South America, it parasitizes preferably larvae of *Anastrepha striata* Schiner and *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Ovruski 1994, Sivinski *et al* 1997, Ovruski *et al* 2004). These species are solitary koinobiont endoparasitoids that oviposit in the host larva and emerge as an adult from the puparium of members of Tephritidae. Another species with potential is the solitary pupal endoparasitoid *Coptera haywardi* (Ogloblin) (Hymenoptera: Diapriidae). This parasitoid has a wide range of hosts and occurs in countries such as Argentina, parasitizing pupae of *A. fraterculus* and *Anastrepha schultzi* Blanchard (Loiacono 1981), and Mexico, parasitizing pupae of *Anastrepha ludens* (Loew) (López *et al* 1999). In Venezuela, *C. haywardi* was reported attacking pupae of *A. striata* and *Anastrepha serpentina* (Wiedemann) (García & Montilla 2001), and in Brazil, pupae of *A. fraterculus* and *Anastrepha sororcula* Zucchi (Aguiar-Menezes *et al* 2003). Additionally, the solitary ectoparasitoid of pupae *Dirhinus* sp. (Hymenoptera: Chalcididae) has been reported in sympatry with *Anastrepha* spp., and because it is considered a generalist parasitoid, its potential as biological-control agent for pupae of *A. obliqua* is unknown.

In view of the importance of biological control for fruit flies of the genus *Anastrepha* in different regions of Latin America, this study evaluated methods of laboratory rearing of these native parasitoid species in larvae and pupae of *A. obliqua* at different ages, in order to select the best biological stage of the hosts for mass rearing of the parasitoids.

Material and Methods

Study site: The experiments were conducted in the Biological Control Laboratory of the Moscafrut Program, SAGARPA-IICA, located in Metapa de Domínguez, Chiapas, Mexico. The assessments were carried out at $23 \pm 1^\circ\text{C}$, relative humidity (RH) $70 \pm 10\%$ and a photoperiod of 12 h.

Biological material: Larvae and pupae of *A. obliqua* were provided by the Moscafrut plant, where *A. obliqua* is mass-reared at 65 million pupae per week, as described by Artiaga-López *et al* (2004) and Domínguez *et al* (2010).

We evaluated the native larval parasitoids *U. anastrephae* and *O. anastrephae*, and the pupal parasitoids *C. haywardi* and *Dirhinus* sp., which were obtained from the Biological Control Laboratory, reared according to Cancino *et al* (2009) and Aluja *et al* (2009).

Preference of U. anastrephae and O. anastrephae for host-larva age. Thirty couples of sexually mature adults (5 days old) of each parasitoid species were placed in individual Hawaii-type cages (30 x 30 x 30 cm) (Wong & Ramadan 1992). The insects were fed with honey and water. Larvae of *A. obliqua* aged 5, 6, 7, or 8 d were exposed to each species in parasitization-type Petri dishes (Petri dish 10 cm and 0.25 cm deep, containing diet and larvae, covered with a piece of tricot fabric secured with a rubber band). A total of four Petri dishes, each with 30 larvae, were used for each parasitoid species. In the case of *O. anastrephae*, the larvae were exposed without the fabric cover in a Petri dish 1 cm deep. The larvae were exposed to the parasites for a period of 2 h. After exposure, the host larvae were kept in containers with diet until the 9th day of age. Afterward, the larvae were washed and placed with vermiculite in the same container, where they remained for 15 d at 26°C . Seventy-two hours after exposure, the mortality rate of the larvae was recorded. When the adults emerged, we calculated the percentage of emergence and the sex ratio. Ten replications were carried out.

Preference of C. haywardi and Dirhinus sp. for host-pupae age. Fifty adult couples, 5 d old, of each parasitoid species were placed in aluminum-frame cages (20 x 20 x 20 cm), where they were fed with honey and water. Pupae of *A. obliqua* in four age ranges were exposed to the parasitoid (range 1: 1-4-d pupae; range 2: 5-8-d pupae; range 3: 9-11-d pupae; and range 4, pupae older than 12 d). One Petri dish per age was used for each parasitoid species. A total of four Petri dishes, each with 25 pupae and vermiculite as the soil substrate, were exposed. The petri dishes were covered with a layer of black cardboard (10 cm in diameter) to simulate dark conditions (as in Cancino *et al* 2012). After a 24-h exposure period, the host pupae were kept in containers with vermiculite at 26°C for a period of 30 d. The emergence and parasitism rates as well as the sex ratio were calculated based on the emergence of adults. Ten replications were carried out.

Fitness tests. Based on the preliminary results, *U. anastrephae* and *C. haywardi* were selected as the species with the best potential for mass rearing in larvae and pupae of *A. obliqua*, respectively. In the second phase, the fitness of the emerged parasitoids was assessed through the quality-control parameters of flight ability and survival without water and food, as described below.

Flight ability of *U. anastrephae*: 100 pupae at 14 d of age, obtained from each age of larvae previously tested, were placed in a black PVC tube (10 cm internal diameter and 10 cm high), which was then placed in a cage covered with tulle fabric (1.20 x 0.4 x 0.5 m). The inner walls of the tube were covered with neutral talc to prevent adults from escaping by climbing. Five days after emergence, any adults remaining in the tube were considered non-flying, and the number and percentage of flying adults were obtained by assessing the proportion of non-flying to total adults. Six repetitions were performed. In the case of *C. haywardi*, the same procedure was followed, except that pupae 28 d after exposure were used, and adults in the tube were considered non-flying 10 d later.

Survival of parasitoids: 50 newly emerged parasitoids of each sex, from each treatment were taken randomly using a sucking tube, and were placed in a Hawaii-type cage (30 x 30 x 30 cm) without water or food. The dead males and females were counted each day. The assessment period continued until all parasitoids died.

Statistical analysis. The experimental design to test age preference for larvae and pupae was fully randomized. For data normality, data were arc-sine-transformed (Pimentel-Gomes 2009). The data for sex ratio and flight ability were analyzed by comparison of means in the Tukey test ($p \leq 0.05$). Data on mortality rate of larvae, emergence and parasitism rates were analyzed in the ANOVA and comparison of means by the Tukey test ($p \leq 0.05$). The curves for adult survival were compared using the log-rank test (Francis *et al* 1993).

Results

Preference for age of larvae. The parasitism rate for *U. anastrephae* did not differ statistically among the ages of larvae offered ($F_{3,36}=0.73$, $P=0.53$), although 7-day larvae showed the highest value (Table 1). The sex ratio did not change significantly with the different host ages ($F_{3,36}=0.70$, $P=0.55$); (Table 1). Similarly, the emergence of adults (flies + parasitoids) from larvae of different ages showed no statistical difference ($F_{3,36}=2.04$, $P=0.12$), although in this case higher emergence rates were obtained with younger larvae (5-6 d; Table 1). The mortality rate of larvae showed no significant difference among the different ages of larvae ($F_{3,36}=1.45$, $P=0.24$) (Table 1).

Odontosema anastrephae showed no significant differences in parasitism rates at the different ages of larvae ($F_{3,36}=1.20$, $P=0.32$), and 6-day larvae showed the highest values (Table 1). The sex ratio did not change significantly with the different host ages ($F_{3,36}=0.33$, $P=0.79$). The emergence of adults (flies + parasitoids) from larvae of different ages showed statistical difference ($F_{3,36}=3.53$, $P=0.02$) (Table 1). The mortality rate of larvae showed no

significant differences among the different ages ($F_{3,36}=2.97$, $P=0.05$). Higher mortality rates were observed in 5-day larvae (Table 1).

Table 1 – Mean rates ($\pm$ SE) of mortality, emergence, parasitism, and sex ratio in larvae of *Utetes anastrephae* and *Odontosema anastrephae* at different ages.

Parameters	Age (days)			
	5	6	7	8
<i>Utetes anastrephae</i>				
Larvae mortality (%)	4.58 $\pm$ 1.34a	2.96 $\pm$ 1.62a	3.03 $\pm$ 1.40a	7.18 $\pm$ 2.23a
Emergence (%)	50.66 $\pm$ 6.79a	49.00 $\pm$ 6.49a	39.00 $\pm$ 3.44a	34.66 $\pm$ 2.81a
Parasitism (%)	81.43 $\pm$ 6.24a	81.53 $\pm$ 5.20a	87.11 $\pm$ 3.95a	72.03 $\pm$ 8.42a
Sex ratio	0.78 $\pm$ 0.03a	0.70 $\pm$ 0.05a	0.65 $\pm$ 0.06a	0.68 $\pm$ 0.07a
<i>Odontosema anastrephae</i>				
Larvae mortality (%)	5.10 $\pm$ 1.61a	0.96 $\pm$ 0.49a	1.27 $\pm$ 0.69a	1.61 $\pm$ 0.53a
Emergence (%)	74.66 $\pm$ 5.37b	83.00 $\pm$ 3.63ab	89.66 $\pm$ 2.78a	90.00 $\pm$ 2.98a
Parasitism (%)	29.35 $\pm$ 10.81a	30.25 $\pm$ 9.54a	11.31 $\pm$ 5.57a	11.85 $\pm$ 9.84a
Sex ratio	0.95 $\pm$ 0.02a	0.93 $\pm$ 0.02a	0.94 $\pm$ 0.02a	0.89 $\pm$ 0.05a

Means followed by the same letter in the row do not differ significantly. Tukey test ($P \leq 0.05$).

Preference for ages of pupae. *C. haywardi* showed statistical differences in the parasitism rate ($F_{3,36}=4.31$, $P=0.01$); the oldest pupae (+12 d) had significantly lower parasitism rates (Table 2). The ratio of females increased significantly in parasitoids emerged from pupae older than 5 d ($F_{3,36}=3.33$, $P=0.03$) (Table 2). The emergence rate (flies + parasitoids) showed no

statistical differences among pupae of different ages ($F_{3,36}=1.79$, $P=0.16$), although in older pupae (+12 d) the emergence rate tended to be lower (Table 2).

The emergence rate obtained from pupae exposed to the parasitoid *Dirhinus* sp. differed significantly between the different ages ($F_{3,36}=3.36$, $P=0.02$); older pupae (+12 d) had a lower emergence rate (Table 2). The parasitism rate was not statistically affected ($F_{3,36}=0.94$, $P=0.42$) by the ages of the pupae. The sex ratio was also not statistically different ($F_{3,36}=0.21$, $P=0.88$) (Table 2).

Table 2 – Mean rates ($\pm$ SE) of emergence, parasitism and sex ratio of *Coptera haywardi* and *Dirhinus* sp. in pupae of *Anastrepha obliqua* in age ranges: 1-4 days, 5-8 days, 9-11 days, and older than 12 days.

Parameters	Age (days)			
	1-4	5-8	9-11	+12
<i>Coptera haywardi</i>				
Emergence (%)	84.40 $\pm$ 5.91a	83.60 $\pm$ 5.76a	81.60 $\pm$ 4.30a	68.00 $\pm$ 7.27a
Parasitism (%)	67.12 $\pm$ 8.58a	63.43 $\pm$ 8.20a	63.56 $\pm$ 8.60a	31.74 $\pm$ 6.25b
Sex ratio	0.52 $\pm$ 0.07b	0.53 $\pm$ 0.07ab	0.58 $\pm$ 0.07ab	0.79 $\pm$ 0.05a
<i>Dirhinus</i> sp.				
Emergence (%)	87.60 $\pm$ 3.06ab	94.40 $\pm$ 1.06a	91.20 $\pm$ 2.58ab	80.40 $\pm$ 3.44b
Parasitism (%)	20.38 $\pm$ 4.69a	31.09 $\pm$ 6.41a	22.93 $\pm$ 7.03a	31.52 $\pm$ 7.78a
Sex ratio	0.57 $\pm$ 0.10a	0.53 $\pm$ 0.07a	0.59 $\pm$ 0.07a	0.62 $\pm$ 0.08a

Means followed by the same letter in the row do not differ significantly. Tukey test ($P \leq 0.05$).

Potential analyses: Flight ability of *U. anastrephae*: The ability to fly of adults emerged from larvae at different ages was statistically different ($F_{3,20}=3.51$, $P=0.03$). Significantly fewer parasitoids emerged from 8-day-old larvae were able to fly (= 79.03%).

Flight ability of *C. haywardi*: The ability to fly of adults emerged from pupae at different ages was not statistically different ($F_{3,20}=2.40$, $P=0.09$). All treatments produced a high proportion of adults able to fly (>90%).

Survival of *U. anastrephae* adults: The differences in survival rates of males and females emerged from larvae parasitized of different ages were significant for males ($\chi^2_3 = 75.74$, $P= <0.0001$) and for females ($\chi^2_3 = 203.31$, $P= <0.0001$) (Figure 1).

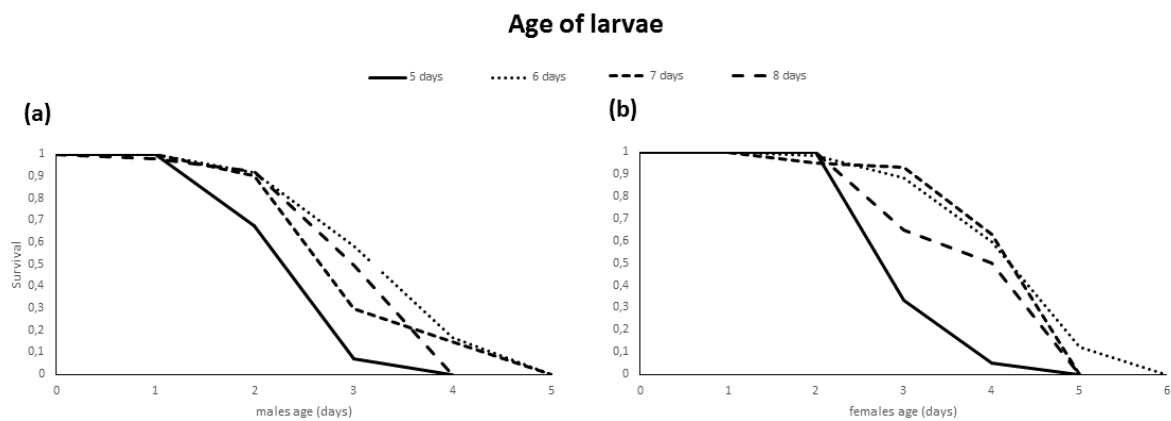


Fig 1 Survival of *Utetes anastrephae* males (a) and females (b) emerging from *Anastrepha obliqua* that had its larva parasitized at 5, 6, 7 and 8 days.

Survival of *C. haywardi* adults: The differences in survival of males and females emerged from pupae parasitized at different ages were significant for males ($\chi^2 = 149.84$, $P = <0.0001$) and for females ($\chi^2_3 = 167.69$, $P \leq 0.0001$) (Figure 2).

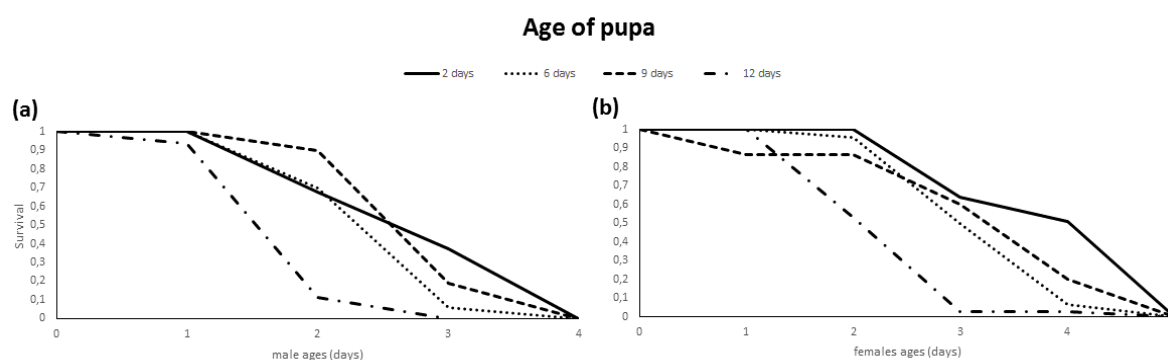


Fig 2 Survival of *Coptera haywardi* males (a) and females (b) emerging from pupae of *Anastrepha obliqua* parasitized at 2, 6, 9 and 12 days.

Discussion

Not all species of parasitoids evaluated developed efficiently in immatures of *A. obliqua*; *U. anastrephae* and *C. haywardi* showed the greatest potential for rearing in larvae and pupae of *A. obliqua*, respectively. The relatively low efficiency of *O. odontosema* and *Dirhinus* sp. could be attributed to the more-generalist nature of these species (Copeland *et al* 2010, Wang & Messing 2004). The host age was the most important determining factor to obtain a greater quantity and quality of viable adults of the two species of parasitoids. Ravensberg (1992) stated that the ultimate objective of all rearing systems of natural enemies, is to produce the largest number of organisms with optimal quality level.

In the evaluations of host age, *U. anastrephae* most successfully developed in larvae 5-6 days old, with higher emergence of adults, and therefore higher parasitism rates were obtained. These results may be associated with the high physiological susceptibility of hosts at early ages. Generally, defense mechanisms in young hosts are not fully developed, and parasitoids exploit this weakness by ovipositing in younger hosts (Gerlin & Rejouan 2004). For example, Lawrence *et al* (1976) found that younger larvae of *A. suspensa* were more effective for the development of the parasitoid *D. longicaudata*. In further studies, the authors

found that the hormonal relationship generated by older hosts was antagonistic to the development of *D. longicaudata* (Lawrence & Akin 1990). This physiological reaction in *A. obliqua* could explain the preference of *U. anastrephae* for young hosts.

In *O. anastrephae*, older larvae (7-8 days) showed a parasitism rate significantly lower than in younger larvae (e.g., 6-day larvae), where the highest emergence and the lowest parasitism rates were observed, possibly due to the increased degree of antagonism in older larvae of *A. obliqua*. Our results conflict with those obtained by Aluja *et al* (2009), who concluded that in *A. ludens*, 9-day-old larvae are a suitable host for laboratory rearing of *O. anastrephae*.

In *C. haywardi*, the age range of the host that enables mass rearing in laboratory was wider, since the development and emergence of the parasitoid were affected negatively only in older pupae (12 days or older). This could be explained by physiological inviability of the host, because the adults are close to emerging. A possible reason for the wide age range of the pupae susceptible to attack can be attributed to the more-generalist nature of pupal parasitoids and can therefore attack hosts with more widely varying physiological conditions. Our results diverge somewhat from those presented by Aluja *et al* (2009), who reported that the best development of *C. haywardi* in pupae of *A. ludens* occurs in younger pupae (0-2 days); whereas our data suggest that rearing of *C. haywardi* in pupae of *A. obliqua* is probably more successful, since it does not depend on a limited age range of pupae.

The relationship between the host age and development of immatures was less clear for *Dirhinus* sp., where the parasitism rate remained homogeneous at all ages of pupae evaluated, however with lower parasitism rates for *C. haywardi*. The ectoparasitic nature of *Dirhinus* may account for the lower requirement for a more-specific age range for parasitism (Sivinski *et al* 1998). On the other hand, the low parasitism rate can be attributed mostly to the low specificity of this species (Wang & Messing 2004).

The ability to fly was also affected by the host age. Fewer of the adults of *U. anastrephae* emerged from 8-day-old larvae were able to fly, probably because of the capacity of self-defense of older larvae, which could affect the quality of the final product. The ability to fly is closely related to acquisition of nutrients, which in the case of parasitoids are provided by their host. Silva *et al* (2002) reported significant changes in the composition of larvae of *A. obliqua* according to age, and in particular that the composition of older larvae is very different and produces different results in terms of parasitism. This factor may be more closely related to the decrease in the ability to fly. Similar impairment has been observed in species of the genus *Trichogramma* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) which do not develop properly when older eggs are used as hosts (Vinson 1994, 1997).

Another parameter affected by the host age was the survival of adults. Males and females of *U. anastrephae* emerged from 6-day-old larvae lived longer. Similar results have been reported for *D. longicaudata* with young larvae of *A. suspensa* (Lawrence *et al* 1996), and for the development of *C. haywardi* with young pupae of *A. ludens* (López-Arriaga *et al* 2014). According to Cancino *et al* (2006), survival is directly related to the quality of the host, which must offer adequate nutritional conditions.

In mass rearing of parasitoids, the main factor requiring evaluation is the capacity of development and emergence of the species reared. Sometimes a high parasitism rate can be harmful to young hosts that do not tolerate mass rearing, and this is expressed in a low recovery of adults. The low defense capability of hosts at young ages is an important reason for preferring this stage in mass rearing of parasitoids (Godfray 1994). However, it is advisable to analyze the best rearing conditions to determine the most appropriate balance of age with good susceptibility to parasitism, and which also allows subsequent management to reduce mortality and ensure high emergence rates of adults.

Our findings showed that: 1) the parasitoids *U. anastrephae* and *C. haywardi* have greater potential for mass rearing in larvae and pupae of *A. obliqua*, respectively; 2) based on rates of emergence, parasitism, ability to fly and survival, 6-day-old larvae of *A. obliqua* are the most suitable host for rearing *U. anastrephae*; 3) based on rates of emergence, parasitism, ability to fly and survival, 1-4-day-old pupae of *A. obliqua* are the most appropriate hosts for rearing *C. haywardi*. This information is basic, but important for the establishment of mass rearing of certain species such as those with the better potential, as determined in this study. This information will strengthen the prospects of using biological control against the fruit fly genus *Anastrepha*, especially *A. obliqua*, a pest of major economic importance in mango crops.

Acknowledgments

The authors thank the Moscafrut Plant (SAGARPA-IICA) for providing the biological material for the study. Thanks to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Brazil) for the doctoral scholarship granted to the first author.

References

- Aguiar-Menezes EL, Menezes EB, Loiácono MS (2003) First record of *Coptera haywardi* Loiácono (Hymenoptera: Diapriidae) as a parasite of fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Brazil. *Neotropical Entomol* 32:355-358
- Aluja M, Birke A (1993) Habitat use by adults of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) in a mixed mango and tropical plum orchard. *Ann Entomol Soc Am* 86:799-812
- 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. *Biological Control* 19:49–79

Artiaga-López T, Hernández E, Domínguez-Gordillo J, Moreno DS, Orozco-Dávila D (2004) Mass-production of *Anastrepha obliqua* at the Moscafrut Fruit Fly Facility, Mexico. p. 389-392. In Barnes BN (ed) *Proceedings of the 6th. International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance*. Irene, South Africa.

Cancino J, López P, Villalobos PL, Hipólito P, Quintero JL, Mattiacci L (2006) *Control de calidad en la cría masiva de Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae): Fundamentos y Procedimientos. Sagarpa, Senasica, Mexico, 54p.

Cancino J, Ruíz L, Hendrichs J, Bloem K (2009) Evaluation of sequential exposure of irradiated hosts to maximize the mass rearing of fruit fly parasitoids. *Biocontrol Science and Technology* 19:95-109

Cancino J, Liedo P, Ruiz L, López G, Montoya P, Francisco J, 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 Science and Technology* 22:899-914

Copeland C, Hoy MA, Jeyaprakash A, Aluja M, Ramirez-Romero R, Sivinski J (2010) Genetic characteristics of bisexual and female-only populations of *Odontosema anastrephae* (Hymenoptera: Figitidae). *Florida Entomologist* 93:437-443

Domínguez J, Artiaga-López T, Solís E, Hernández E (2010) Métodos de colonización y cría masiva. In: Montoya P, Toledo J, Hernández E (eds) *Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo*. S y G Editores Coyoacán, Mexico, pp. 259-276.

Francis B, Green M, Payne C (1993) *Statistical system for generalized linear interactive modelling*. Clarendon Press, Oxford, UK

- Garcia, FRM, Ricalde MP (2013) Augmentative Biological Control Using Parasitoids for Fruit Fly Management in Brazil. *Insects* 4:55-70
- García JL, Montilla R (2001) *Coptera haywardi* Loíacono (Hymenoptera: Diapriidae) parasitoide de pupas de *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) en Venezuela. *Entomotropica* 16:191-195
- Gerlin D, Rejouan N (2004) Age-related pupal defense against congeneric internequine activity in *Encarsia* species. *Entomol Exp Appl* 110:87-93
- Godfray HCJ (1994) Parasitoids, Behavioal and Evolutionary Ecology. Princeton University Press, Princeton, N.J., USA.
- Lawrence PO, Baranoswski RM, Greany PD (1976) Effects of host age on development of *Biosteres* (=Opius) *longicaudatus*, a parasitoid of the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. *Fla Entomol* 59:33-39
- Lawrence PO, Akin D (1990) Virus-like particles in the accessory glands of *Biosteres longicaudatus*. *Can J Zool* 68:539-546
- López M, Aluja M, Sivinski J (1999) Hymenopterous larval-pupal and pupal parasitoids of *Anastrepha* flies (Diptera: Tephritidae) in Mexico. *Biolog Control* 15:119-129
- López-Arriaga F, Montoya P, Cancino J, Toledo J, Liedo P (2014) Female pupae of the genetic sexing strain “Tap-7” of *Anastrepha ludens* as hosts of *Coptera haywardi*. *BioControl* 59:149-157
- Montoya P, Liedo P, Benrey B, Cancino J, Barrera JF, Sivinski J, Aluja M (2000) Biological control of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in mango orchards through augmentative releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biolog Control* 18:216-224

- Ovruski S (1994) Comportamiento de detección del huésped de *Aganaspis pelleranoi* (Bréthes) (Hymenoptera: Cynipoidea, Eucoilidae) parasitoide de larvas de *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). Rev Soc Entomol Arg 53:121-127
- 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 Manag Rev 5:81-107
- Ovruski S, Schliserman P, Aluja M (2004) Indigenous parasitoids (Hymenoptera) attacking *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in native and exotic host plants in Northwestern Argentina. Biolog Control 29:43-57
- Peña JE, Aluja M, Wysoki M (2009) Pests. In: Litz RE (ed) The Mango: Botany, Production and Uses. CABI, pp 317-366
- Pimentel-Gomes F (2009) Curso de estatística experimental. 15th Ed. FEALQ, Piracicaba, p 451
- Paranhos BJ, Walder JMM, Papadopoulos NT (2003) A simple method to study parasitism and field biology of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) on *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Biocontrol Sci Techn 13:631-639
- Ravensberg WJ (1992) Production and utilisation of natural enemies in western European glasshouse crops. In: Anderson TE, Lepia NC (eds) Advances in insect rearing for research & pest management. Westview Press, Oxford, pp 465-487
- Silva JEB, Boleli IC, Simões ZLP (2002) Hemocyte types and total and differential counts in unparasitized and parasitized *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae) larvae. Braz J Biol 62:689-699
- Sivinski J, Calkins C, Baranowski R, Harris D, Brambila J, Diaz J, Burns R, Holler T, Dodson G (1996) Suppression of a Caribbean Fruit Fly (*Anastrepha suspensa* (Loew) Population

- through Augmented Releases of the Parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biolog Control* 6:177-185
- Sivinski J, Aluja M, López M (1997) Spatial and temporal distributions of parasitoids of the Mexican *Anastrepha* Species (Diptera: Tephritidae) within the canopies of fruit trees. *Ann Entomol Soc Am* 90:604-618
- Sivinski J, Vulinec K, Menezes E, Aluja M (1998) The bionomics of *Coptera haywardi* (Oglobin) (Hymenoptera: Diapriidae) and other pupal parasitoids of Tephritid fruit flies (Diptera). *Biolog Control* 11:193-202
- Vinson SB (1994) Physiological interactions between egg parasitoids and their hosts. In: Wajnberg E, Hassan SA (eds). *Biological control with egg parasitoids*. Wallingford: CAB International, pp 201-217
- Vinson SB (1997) Comportamento de seleção hospedeira de parasitoides de ovos, com ênfase na família Trichogrammatidae. In: Parra JRP, Zucchi RA (eds) *Trichogramma e o controle biológico aplicado*. FEALQ, Piracicaba, pp 67-119
- Wang XG, Messing RH (2004) Potential interactions between pupal and egg- or larval-pupal parasitoids of Tephritid fruit flies. *Environ Entomol* 33:1313-1320
- Wong TTY, Ramadan M (1992) Mass rearing biology of larval parasitoids (Hymenoptera: Braconidae, Opiinae) of tephritid flies (Diptera: Tephritidae). In: Anderson TE, Leppla NC, Boulder CO (eds) *Advances in insect rearing for research and pest management*. Westview Press in Hawaii, pp 405-426.

Artigo 4 – Revista: Austral Entomology

Is *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) a natural host of the Neotropical parasitoids *Doryctobracon crawfordi* and *Opius hirtus*?

Sonia Poncio^{1*}, Pablo Montoya², Jorge Cancino² and Dori Edson Nava³

¹Phytosanitary Department, Universidade Federal de Pelotas, Avenida Eliseu Maciel s/n, CEP 96010-900, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil. Email: soniaponcio@yahoo.com.br

²Moscafrut Program SAGARPA-IICA, Camino a los Cacahotales S/N, CP 30680, Metapa de Domínguez, Chiapas, Mexico. Email: pablo.montoya@iica-moscafrut.org.mx; jorge.cancino@iica-moscafrut.org.mx

³Entomology Laboratory, Embrapa Clima Temperado, Rodovia BR 392 km 78, CEP 96010-970, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. Email: dori.edson-nava@embrapa.br

ABSTRACT

An understanding of the search, selection and host use behaviours of parasitoids that have the potential to be used as biological control agents is becoming increasingly important. We studied under laboratory conditions, the host suitability of *Anastrepha obliqua* (Macquart) and *Anastrepha ludens* (Loew) larvae for the parasitoids *Doryctobracon crawfordi* (Viereck) and *Opius hirtus* (Fischer), which are native to the Americas. By counting the oviposition scars on the puparium, we found that both types of larvae were equally attacked; however, the pupa dissections revealed that different numbers of eggs were laid in each type of larvae. The *A. obliqua* larvae were significantly less parasitised than those of *A. ludens* and immature insect development or adult emergence was not affected in either parasitoid species. Dissections of

the parasitised *A. obliqua* pupae also showed that the immature parasitoids of both species died by encapsulation and melanisation, and there was a high proportion of unemerged adult flies. By contrast, *A. ludens* parasitised pupae contained several viable immature parasitoids that subsequently emerged as adult parasitoids. These results indicated contrasting suitability conditions of *A. ludens* and *A. obliqua* larvae as hosts of *O. hirtus* and *D. crawfordi* parasitoids, which suggest that *A. obliqua* is not a natural host for either parasitoid species. These findings will improve the understanding for the use of these parasitoid species in projects for biological control against economically important fruit flies of the genus *Anastrepha*.

Keywords: Biological control, Fruit flies, Braconidae

1. INTRODUCTION

Fruit flies (Diptera: Tephritidae) are considered one of the primary pests affecting fruit production worldwide (Aluja 1994; Souza-Filho *et al.* 2003). The fruit fly *Anastrepha obliqua* (Macquart) is an important species among those causing the most damage to fruit crops in the Neotropical region, with a wide distribution from the southern United States (Texas) to northern Argentina. In Mexico, this pest is found in tropical regions, causing damage primarily to mango crops (Peña *et al.* 2009) and to fruits from the genus *Spondias* (Aluja & Birke 1993). In Brazil, this species is the second most important of the genus, after *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Zucchi 2008).

The parasitoids *Doryctobracon crawfordi* (Viereck) and *Opius hirtus* (Fischer) (Braconidae: Opiinae) can be an important alternative for the implementation of biological control projects against these types of pests because they coexist in the same habitat as *A. obliqua*, and their colonisation and domestication have been reported by authors such as Aluja *et al.* (2009) and Cancino *et al.* (2009). These parasitoid species have a wide range and

distribution of hosts. *D. crawfordi* is distributed from the central region of Mexico to Argentina (Ovruski *et al.* 2005) and is mainly associated with *Anastrepha ludens* (Loew) (López *et al.* 1999), although this parasitoid has also been reported as a parasitoid of *A. fraterculus*, *Anastrepha striata* (Schiner), *Anastrepha serpentina* (Wiedemann) and *A. obliqua* larvae in the states of Chiapas and Veracruz in Mexico (Aluja *et al.* 1990; López *et al.* 1999). In Central America, *D. crawfordi* has been recovered from *A. striata* and *Anastrepha distincta* (Greene) larvae (Jiron & Mexzon 1989) and from *Anastrepha anomala* (Stone) and *A. serpentina* (Medianero *et al.* 2006). For South America, the list of countries and genera from which this parasitoid has been recovered is long and includes the following: 1) in Ecuador, from *A. obliqua*, *A. striata* (Arias *et al.* 2003), *A. fraterculus* and *A. distincta* (Tigrero 2007); 2) in Colombia, from *A. fraterculus* and *A. striata* (Bueno *et al.* 2004) pupae; 3) in Bolivia, from *A. fraterculus* pupae (Ovruski *et al.* 2005); 4) in northwestern Argentina, from *A. fraterculus* pupae (Ovruski *et al.* 2005); and 5) in northern Brazil, as parasites of *Anastrepha atrigona* (Hendel) and *A. serpentina* larvae (Zucchi *et al.* 2011; Silva *et al.* 2011).

Opius hirtus has a more restricted distribution (Mexico, Costa Rica and the Dominican Republic) (Ovruski *et al.* 2000) and is apparently a more specialised parasitoid, with most of the specimens recovered in Mexico taken from *Anastrepha cordata* Aldrich, *Anastrepha alveata* Stone (Hernández-Ortiz *et al.* 1994; López *et al.* 1999) and the larvae of *A. obliqua* (Hernández-Ortiz *et al.* 1994; Sivinski *et al.* 2000). Moreover, *O. hirtus* has been recovered from *Toxotrypana curvicauda* Gerstaecker and from *Rhagoletis* spp. (Hernández-Ortiz 1993).

Contrary to the range of hosts previously described for both parasitoid species, preliminary results indicated that parasitoid adults did not emerge when either of these two species parasitised *A. obliqua* larvae under laboratory conditions (Personal information). However, a different situation, with emergence of parasitoid adults, occurred when the attacked host was *A. ludens* (see Cancino *et al.* 2009; Aluja *et al.* 2009). These findings

highlight the necessity of performing more detailed studies on the parasitoid-host relationship that each of these parasitoid species has established with the fruit fly species with which it coexists under natural conditions.

Similar results have been published by different authors, but with different species involved. Ramadan *et al.* (1994) observed that the parasitoid *Diachasmimorpha tryoni* (Cameron) could only emerge from *Bactrocera dorsalis* (Hendel) larvae when *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) attacked under multiparasitic conditions; Messing and Ramadan (2000) reported that *Diachasmimorpha kraussii* (Fullaway) did not develop in *B. dorsalis* and *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) larvae, and Ero *et al.* (2010) reported that this parasitoid did not develop in *Bactrocera cacuminata* (Hering) and *Bactrocera cucumis* (French) larvae. Behavioural ecology studies have become more relevant because they can reveal the mechanisms involved in parasitoid search and selection behaviour and the methods by which parasitoids use their hosts (Hassan 1994; Vinson 1998; Eben *et al.* 2000; Duan *et al.* 2000), especially for parasitoid species with the potential to be used as biological control agents.

Therefore, in this study we aimed to determine the host suitability of *A. obliqua* and *A. ludens* larvae for the development of native parasitoids *O. hirtus* and *D. crawfordi* because all these species occur sympatrically in the Neotropical region. We also aimed to elucidate if these parasitoid species show any host preference between the two types of larvae.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Study site

The experiments were performed in the Biological Control Laboratory of the Moscafrut Program, SAGARPA-IICA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y

Alimentación-Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura), located on Metapa de Domínguez, Chiapas, Mexico, under controlled conditions with a temperature of $23 \pm 1^\circ\text{C}$, a relative humidity of $70 \pm 10\%$ and a photoperiod of 12 hours.

2.2 Biological material

The *A. obliqua* and *A. ludens* larvae were provided by the Moscafrut production facility where these species are mass produced at a rate of 65 and 130 million pupae every week, respectively, following the procedures reported by Artiaga-López *et al.* (2004) and Domínguez *et al.* (2010). The native parasitoids *D. crawfordi* and *O. hirtus* were provided by the Biological Control Laboratory, where they are reared on *A. ludens* larvae for more than 100 generations following the protocols reported by Cancino *et al.* (2009).

2.3 Determination of host suitability

This experiment was performed separately for each parasitoid species using Hawaii type cages (27 x 27 x 27 cm, Wong & Ramadan 1992) in which 30 adult, sexually mature (five days old) parasitoid couples were placed and fed with honey and water. Different numbers and proportions of *Anastrepha* larvae (*A. obliqua* at eight days and *A. ludens* at nine days of age) mixed with yeast and corn diet (see Domínguez *et al.* 2010) were exposed to the caged parasitoids after the larvae were placed in Petri dish lids (5.5 cm diameter and a depth of 0.9 cm for the *D. crawfordi* and 0.3 cm for the *O. hirtus* parasitoids) covered with a thin fabric. The exposure duration was three hours. The treatments were as follows: 1) the exposure of 90 *A. obliqua* larvae and 90 *A. ludens* larvae in separated cages, 2) the exposure of 45 *A. obliqua* larvae and 45 *A. ludens* larvae inside the same cage but in different Petri dishes, which were rotated to avoid any positional bias, and 3) the exposure of 45 *A. obliqua* larvae and 45 *A. ludens* larvae mixed inside the same cage and in the same Petri dish. For each *Anastrepha* species, the control consisted of 90 larvae that were not exposed to parasitoids but were

maintained under the same experimental conditions as the larvae in the treatments. Ten replicates were performed for each treatment.

To determine which larvae species experienced greater parasitism activity by the female parasitoids within the same experimental arena (treatment 2), 10 *Anastrepha* pupae of each species per replicate were collected 72 hours after larval exposure. Using a stereoscopic microscope (Discovery V8, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany), we obtained the number of oviposition scars (a dark and melanised point on the puparium) per pupa following the methods of Montoya *et al.* (2000, 2011), and dissect the pupae with fine point tweezers and entomological need to quantify the number of immature parasitoids (eggs and/or first instar larvae) inside the pupae.

The following parameters were determined: percentage of emerged and unemerged parasitoids, sexual proportion of adult parasitoids, percentage of dead *Anastrepha* larvae (72 hours after exposure), percentage of “dry” pupa (i.e., not containing a fly or parasitoid), and percentage of flies that were emerged and unemerged.

2.4 Statistical analysis

The effects of the treatments on the percentages of larvae that died, flies that emerged and pupae that dried up were analysed using analysis of variance (ANOVA), and the means were compared using Tukey’s test ($p \leq 0.05$). The relationship between the number of oviposition scars per pupa and the number of immature parasitoids per pupa was determined with a simple linear regression. The analyses were performed using the statistical software Statgraphics Centurion XV (Statgraphics 2008).

3. RESULTS

3.1 Host suitability

***Opius hirtus*.** In all the treatments, adult parasitoids emerged from the *A. ludens* but not from the *A. obliqua* insects exposed to the parasites as larvae (Table 1). The sexual proportion favoured female parasitoids in all the treatments: 0.72 when the larvae were exposed in different cages (treatment 1), 0.63 when the larvae were exposed in different Petri dishes but in the same cage (treatment 2) and 0.79 when the larvae of both species were exposed in the same Petri dish (treatment 3). The percentages of unemerged formed flies in the dissected pupae were significantly higher for *A. obliqua* than for *A. ludens* in all the treatments (Table 1), with the following statistics for treatments 1, 2 and 3, respectively: $F_{1,18} = 12.38$, $P = 0.002$; $F_{1,18} = 24.22$, $P = 0.0001$; and $F_{1,18} = 9.74$, $P = 0.0059$. The percentages of emerged flies were also significantly higher for *A. obliqua* in all the treatments (Table 1): $F_{1,18} = 11.76$, $P = 0.003$; $F_{1,18} = 22.92$, $P = 0.0001$; and $F_{1,18} = 15.03$, $P = 0.081$ for treatments 1, 2 and 3, respectively. The percentages of dried up parasitoid pupae did not show any significant difference between the *Anastrepha* species for treatments 1 ($F_{1,18} = 1.181$, $P = 0.194$) and 2 ($F_{1,18} = 3.14$, $P = 0.081$) but did differ significantly for treatment 3 ($F_{1,18} = 18.44$, $P = 0.0004$) (Table 1).

Table 1. Average ($\pm$ SD) percentages of emerged parasitoids, emerged flies and dead larvae; unemerged parasitoids, unemerged flies and dried parasitoid pupae of *Anastrepha obliqua* and *A. ludens* exposed as larvae to *Opius hirtus* parasitoids.

Treatments	Emergence (%)		Dead larvae (%)	Pupae without emergence (%)		
	Parasitoids	Flies		Formed parasitoids	Formed flies	Dried up pupae (%)
Separate exposure						
<i>A. obliqua</i>	-	63.66 ± 2.74a	7.66 ± 1.31a	-	18.77 ± 4.18a	9.88 ± 1.94a
<i>A. ludens</i>	28.00 ± 3.99	43.00 ± 5.36b	9.00 ± 2.18a	2.44 ± 0.67	3.11 ± 1.51b	14.44 ± 2.76a
Different dishes in the same cage						
<i>A. obliqua</i>	-	63.23 ± 6.69a	8.53 ± 3.82a	-	24.31 ± 4.69a	3.91 ± 2.76a
<i>A. ludens</i>	50.09 ± 5.75	25.47 ± 4.16b	6.11 ± 2.74a	6.94 ± 0.94	1.09 ± 0.44b	10.22 ± 2.02a
Mixed inside the same dish						
<i>A. obliqua</i>	-	68.66 ± 7.03a	12.66 ± 3.64a	-	18.66 ± 5.23a	0.00 ± 0.00a
<i>A. ludens</i>	43.33 ± 6.30	30.66 ± 6.82b	5.33 ± 2.77a	7.33 ± 3.05	2.00 ± 1.01b	11.33 ± 2.53b
Control						
<i>A. obliqua</i>	-	91.33 ± 2.92	0.44 ± 0.18	-	7.11 ± 2.57	1.11 ± 0.52
<i>A. ludens</i>	-	95.57 ± 1.16	0.00 ± 0.00	-	4.42 ± 1.16	1.35 ± 0.23

Means within columns and larval exposure treatments followed by different letters are statistically different by ANOVA and Tukey tests ($P \leq 0.05$).

SD, standard deviation

Doryctobracon crawfordi. In all the treatments, the adult parasitoids emerged from the *A. ludens* but not the *A. obliqua* insects that were exposed to the parasites as larvae (Table 2). The sexual proportion slightly favoured male parasitoids in all the treatments: 0.47 for the larvae exposed in different cages (treatment 1), 0.41 for the larvae exposed in different Petri dishes but in the same cage (treatment 2) and 0.49 when the larvae of both species were exposed in the same Petri dish (treatment 3). The percentages of formed unemerged flies in the dissected pupae were significantly higher for *A. obliqua* than for *A. ludens* in all the treatments (Table 2), with the following statistics for treatments 1, 2 and 3, respectively: $F_{1,18} = 357.84$, $P < 0.0001$; $F_{1,18} = 29.01$, $P < 0.0001$; and $F_{1,18} = 26.51$, $P < 0.0001$. The percentages of emerged flies did not differ significantly between the *Anastrepha* species for treatment 1 ($F_{1,18} = 0.08$, $P = 0.7727$) but were significantly higher for *A. obliqua* in the other two treatments ($F_{1,18} = 4.44$, $P = 0.0493$ for treatment 2 and $F_{1,18} = 16.86$, $P = 0.0007$ for treatment 3) (Table 2). The percentages of dried up parasitoid pupae were significantly different between the *Anastrepha* species in treatment 1 ($F_{1,18} = 9.24$, $P = 0.0070$) and were similar in treatments 2 ($F_{1,18} = 0.05$, $P = 0.8134$) and 3 ($F_{1,18} = 0.16$, $P = 0.6913$) (Table 2). The percentages of dead larvae were similar for both species in all the treatments (Table 2).

Table 2. Average ($\pm$ SD) percentages of emerged parasitoids, emerged flies and dead larvae; unemerged parasitoids, unemerged flies and dried parasitoid pupae of *Anastrepha obliqua* and *A. ludens* exposed as larvae to *Doryctobracon crawfordi* parasitoids.

Treatment	Emergence (%)		Dead larvae (%)	Pupae without emergence (%)		
	Parasitoids	Flies		Formed parasitoids	Formed flies	Dried up pupae (%)
Separate exposure						
<i>A. obliqua</i>	-	14.88 ± 2.05a	2.22 ± 1.49a	-	55.88 ± 2.78a	27.00 ± 3.05a
<i>A. ludens</i>	57.11 ± 5.23	16.00 ± 3.18a	2.44 ± 1.14a	6.00 ± 1.44	1.77 ± 0.64b	16.66 ± 1.48b
Different dishes in the same cage						
<i>A. obliqua</i>	-	23.32 ± 6.19a	7.88 ± 4.61a	-	52.09 ± 9.18a	16.69 ± 7.07a
<i>A. ludens</i>	58.89 ± 3.94	9.20 ± 2.55b	0.85 ± 0.43a	13.93 ± 3.97	2.27 ± 1.11b	14.89 ± 2.57a
Mixed inside the same dish						
<i>A. obliqua</i>	-	35.33 ± 4.77a	8.66 ± 4.10a	-	42.00 ± 7.63a	14.00 ± 9.29a
<i>A. ludens</i>	59.33 ± 7.27	8.00 ± 4.64b	2.00 ± 1.42a	10.66 ± 2.66	2.00 ± 1.42b	18.00 ± 3.44a
Control						
<i>A. obliqua</i>	-	91.33 ± 2.92	0.44 ± 0.18	-	7.11 ± 2.57	1.11 ± 0.52
<i>A. ludens</i>	-	95.57 ± 1.16	0.00 ± 0.00	-	4.42 ± 1.16	1.35 ± 0.23

Means within columns and larval exposure treatments followed by different letters are statistically different by ANOVA and Tukey tests ($P \leq 0.05$).

SD, standard deviation

3.2 Oviposition scars and immature parasitoids per pupa

***Opius hirtus*.** A significant relationship was observed between the number of parasite oviposition scars on the *A. ludens* pupae and the number of immature parasitoids in the pupae ($P < 0.001$, $R^2 = 30.58$). However, the relationship between oviposition scar numbers and the number of immature parasitoids was not statistically significant for the *A. obliqua* pupae ($P = 0.94$, $R^2 = 0.004$) (Figure 1). Of all the *A. ludens* pupae examined, 92% showed scars, with a mean of 4.18 scars per pupa, and 80% carried first-instar larvae (98% viable and 2% not viable). For the *A. obliqua* pupae, 81% showed scars, with a mean of 3.11 scars per pupa, but only 34% carried immature parasitoids (68% encapsulated eggs and 32% melanised first-instar larvae) (Table 3).

***Doryctobracon crawfordi*.** A significant relationship was observed between the number of parasite oviposition scars on the *A. ludens* pupae and the number of immature parasitoids inside the pupae ($P < 0.001$, $R^2 = 16.27$), but a similar relationship in *A. obliqua* pupae was not significant ($P = 0.08$, $R^2 = 2.95$) (Figure 2). For the *A. ludens* pupae, 94% showed scars with a mean of 4.77 scars per pupa, and 83% carried first-instar larvae (98% viable and 2% not viable). In *A. obliqua*, 95% showed scars, with a mean of 4.85 scars per pupa, but only 35% had immature parasitoids (91% melanised first-instar larvae and 9% encapsulated eggs) (Table 3).

Table 3. Average ($\pm$ SD) percentage of *Anastrepha* pupae with scars, immature parasitoids and number of scars per pupa after exposure of *Anastrepha obliqua* and *A. ludens* larvae to adult parasitoids of *Opius hirtus* or *Doryctobracon crawfordi*.

	<i>A. obliqua</i>	<i>A. ludens</i>
<i>Opius hirtus</i>		
Pupae with scars (%)	81.00 $\pm$ 6.22a	92.00 $\pm$ 2.19a
Pupae with immature stages (%)	34.00 $\pm$ 6.35a	80.00 $\pm$ 5.16b
Scars per pupae ($\approx$)	3.11 $\pm$ 0.66a	4.18 $\pm$ 0.48a
<i>Doryctobracon crawfordi</i>		
Pupae with scars (%)	95.0 $\pm$ 02.23a	94.00 $\pm$ 2.21a
Pupae with immature stages (%)	35.00 $\pm$ 9.45a	83.00 $\pm$ 4.98b
Scars per pupae ($\approx$)	4.85 $\pm$ 0.61a	4.77 $\pm$ 0.49a

Means within rows followed by different letters are significantly different by Tukey's test ($P \leq 0.05$).

SD, standard deviation

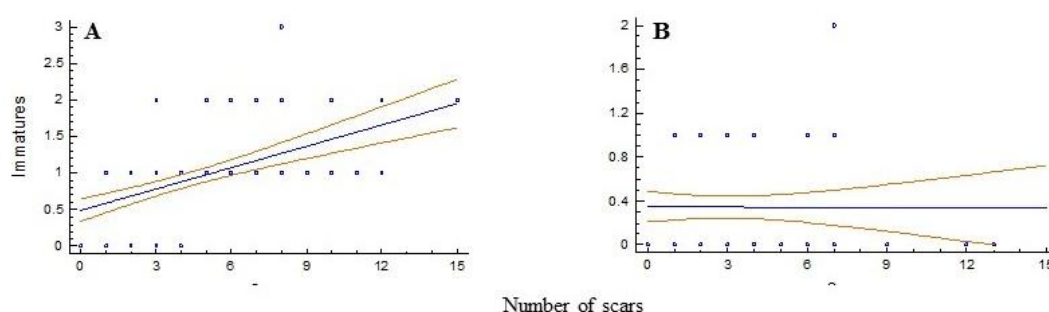


Figure 1. Relationship between the number of scars and the number of immature *O. hirtus* parasitoids per pupa of *A. ludens* (a) and *A. obliqua* (b) exposed to the parasitoids as larvae in different Petri dishes within the same cage.

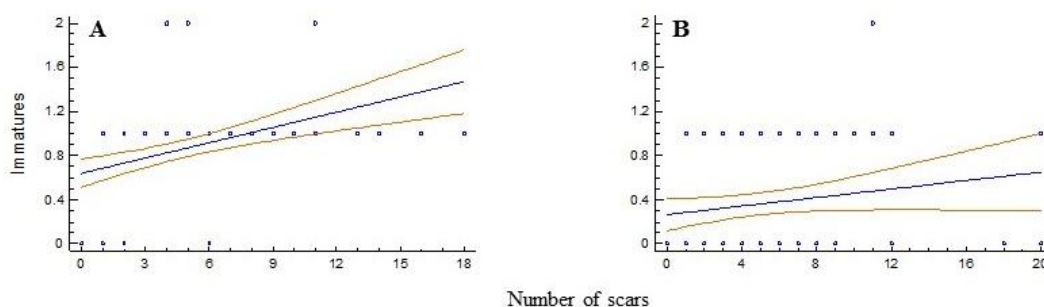


Figure 2. Relationship between the number of scars and the number of immature *D. crawfordi* parasitoids per pupa of *A. ludens* (a) and *A. obliqua* (b) exposed to the parasitoids as larvae in different Petri dishes within the same cage.

4. DISCUSSION

The results of this study indicate that the progeny of *O. hirtus* and *D. crawfordi* could not complete their development during the larva–pupa period of *A. obliqua*. Nevertheless, the female parasitoids of these species laid their eggs in the *A. obliqua* larvae at reduced rate compared with the eggs laid in the larvae of *A. ludens*. Several studies (e.g., van Alphen & Janssen 1982; van Alphen & Vet 1986; Mohamed *et al.* 2003) have indicate that braconid females only lay their eggs in suitable hosts and reject inappropriate ones, whereas other studies (e.g., Ramadan *et al.* 1994; Messing & Ramadan 2000; Ero *et al.* 2010) have shown that certain braconids also oviposited in unsuitable hosts .

When dissecting the *A. obliqua* pupa, we observed a high percentage of encapsulated and melanised eggs (68% for *O. hirtus* and 9% for *D. crawfordi*) and first-instar larvae that had hatched but died (32% for *O. hirtus* and 91% for *D. crawfordi*), which revealed the poor host suitability of this fruit fly species. Encapsulation is a typical immunological reaction of host insects in response to parasitoid attacks (Mohamad *et al.* 2003; Bokonon-Ganta *et al.* 2005). In this process, eggs are suffocated by the formation of a capsule from plasmocytes around foreign bodies, causing a hardened capsule (Bernal 2007; Carton *et al.* 2008). According to Ramadan *et al.* (1994), the eggs suffer encapsulation because the host is not a

natural one, and therefore, an immune response is triggered in the presence of a component foreign to the host. We considered eggs with dark, thick walls to be encapsulated, as described by Ero *et al.* (2010), and dead first-instar larvae were occasionally readily visible inside these capsules.

The encapsulation and melanisation of the immature parasitoids could also be responsible for the large number of unemerged *A. obliqua* adults (or half-emerged) because these mechanisms require considerable energy to surround the invading organism with multiple layers of plasmocytes (Strand & Pech 1995). This process affects the normal development of metamorphosis and manifests as failure of those adults to emerge. Ramadan *et al.* (1994) also reported a significant number of unemerged flies because of the parasitism of *B. dorsalis* larvae by *D. tryoni*. In contrast, for *A. ludens*, in more than 80% of the pupae parasitised by either parasitoid species, 98% of the first-instar larvae were alive, and just 2% had died from unknown causes. According to Pemberton and Willard (1918), most eggs of fruit fly parasites hatch in suitable hosts, as occurred in the present study in the parasitised *A. ludens* larvae.

One of the questions we sought to answer was whether *O. hirtus* and *D. crawfordi* females showed a preference for or were capable of differentiating between *A. obliqua* and *A. ludens* larvae during egg laying because these species co-occur in the same habitat (Aluja *et al.* 1990; Montoya *et al.* 2000). In the present study, significant differences were not observed in the level of attack (*i.e.*, the percentage of pupae with oviposition scars, and the average number of scars per pupa) experienced by the larvae of the two species. However, in the case of the parasitised pupae, (*i.e.*, pupae with immature parasitoids inside), the situation was different, with a much lower percentage of *A. obliqua* than *A. ludens* parasitised. This result also suggests that *A. obliqua* larvae are not a suitable host for *O. hirtus* and *D. crawfordi* parasitoids, which was indicated by the high percentage of females of these parasitoids

species who did not lay their eggs in most of the *A. obliqua* larvae ($\approx 60\%$) into which they inserted their ovipositor. These results differ from those reported by Messing and Ramadan (2000) and Ero *et al.* (2010), who reported that *D. tryoni* and *D. kraussii* females, respectively, do not have the capacity to discriminate between suitable and unsuitable hosts for the development of their progeny, finding extremely high percentages of egg encapsulation in unsuitable hosts.

Our results suggest that parasitoid females also showed good ability to discriminate among conspecifics when introducing their ovipositor into previously parasitised larvae. When attacking *A. ludens* larvae, only 9% of the larvae parasitised by *O. hirtus* and 3% of the larvae parasitised by *D. crawfordi* contained more than one parasitoid larva, even though these pupae showed more than one or two oviposition scar on their surface. These findings indicate that females did not choose to lay eggs in most already parasitised larvae by conspecifics. The above pattern was stronger in the case of *A. obliqua*. These observations are consistent with those reported for *D. crawfordi* by Ayala *et al.* (2014), who concluded that superparasitism is not an adaptive strategy in this species. The present observations are also partially consistent with those reported by Montoya *et al.* (2003), who observed an intermediate capacity of the braconid *D. longicaudata* to discriminate hosts previously attacked by conspecifics.

Our findings are inconsistent with those of a large number of field surveys (Aluja *et al.* 1990; López *et al.* 1999; Arias *et al.* 2003; Hernández-Ortiz *et al.* 1994; Sivinski *et al.* 2000) that reported the emergence of *O. hirtus* and *D. crawfordi* from *A. obliqua* pupae. Certain factors may explain this inconsistency. First, a previous or simultaneous attack on *A. obliqua* larvae by another parasitoid such as *D. longicaudata*, which has been reported to carry an entomopoxvirus that damages the immune system of the host, may promote the development of *O. hirtus* and *D. crawfordi*, as reported by Ramadan *et al.* (1994) for the emergence of *D.*

tryoni from *B. dorsalis*. A second potential explanatory factor is a possible confusion regarding the host from which these parasitoids emerged because *A. ludens* and *A. obliqua* can simultaneously attack host fruits such as mango and emerge as adults from them (see Díaz-Fleischer & Aluja 2003; Montoya *et al.* 2000). To validate these potential explanatory factors, it is necessary to generate the appropriate empirical evidence because there are multiple factors in the field associated with the tritrophic relationship among host, herbivore and entomophage, creating relations that are not easy to elucidate (*e.g.*, Vet & Dicke 1992).

Based on our results, we can conclude that the larvae of the studied fruit fly species showed contrasting suitability conditions for the development of *O. hirtus* and *D. crawfordi* immature stages, and that *A. obliqua* larvae do not represent a natural host for either parasitoid species. These findings may improve the use of these natural enemies in the development of biological control programs against economically important fruit flies of the *Anastrepha* genus.

Acknowledgments

We thank the Moscafrut production facility (SAGARPA-IICA) for providing the biological material for these studies. We also thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior [Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel] (CAPES Brazil) for the Sandwich doctoral scholarship granted to SP, and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [National Council for Scientific and Technological Development] (CNPq) for the research productivity grants to DEN.

References

- Aluja M, Guillen J, Liedo P, Cabrera M, Ríos E, De la Rosa G, Celedonio H & Mota D. 1990. Fruit infesting tephritids (Dipt.: Tephritidae) and associated parasitoids in Chiapas, Mexico. *Entomophaga* **35**, 39-48.
- Aluja M. 1994. Bionomics and management of *Anastrepha*. *Annual Review of Entomology* **39**, 155-178.
- Aluja M & Birke A. 1993. Habitat use by adults of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae) in a mixed mango and tropical plum orchard. *Annals of the Entomological Society of America* **86**, 799-812.
- 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. *Biological Control* **19**, 49–79.
- Arias M, Jines A, Carrera C & Gutiérrez K. 2003. Enemigos naturales de moscas de la fruta en el litoral ecuatoriano [Natural enemies of fruit flies on the Ecuadorian coast]. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) [National Institute of Agricultural Research (INIAP)] – E. E. Boliche. *Informe técnico del Proyecto IG-CV-031*.
- Artiaga-López T, Hernández E, Domínguez-Gordillo J, Moreno DS & Orozco-Dávila D. 2004. Mass-production of *Anastrepha obliqua* at the Moscafrut Fruit Fly Facility, Mexico. p. 389-392. In: B. N. Barnes [Ed.]. *Proceedings of the 6th. International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance*. Isteg Scientific Publications Irene, South Africa.
- Ayala A, Martinez AM, Figueroa I, Pineda S, Miranda M, Liedo P & Montoya P. 2014. Superparasitism strategies by a native and an exotic parasitoid species attacking the

- Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Biocontrol Science and Technology* **24**, 925-935.
- Bernal JS. 2007. Biología, ecología y etología de parasitoides [Biology, ecology and ethology of parasitoids]. In: *Teoría y Aplicación del Control Biológico* [Theory and Application of Biological Control] (Eds LA Rodríguez-del-Bosque & HC Arredondo-Bernal) pp. 61-74). Sociedad Mexicana de Control Biológico, México [Mexican Society for Biological Control, Mexico].
- Bokonon-Ganta AH, Ramadan MM, Wang XG & Messing RH. 2005. Biological performance and potential of *Fopius ceratitivorus* (Hymenoptera: Braconidae), an egg-larval parasitoid of tephritid fruit flies newly imported to Hawaii. *Biological Control* **33**, 238-247.
- Bueno LN, Santos RG, Guarín G & León G. 2004. Moscas de las frutas (Díptera: Tephritidae) y parasitoides asociados con *Psidium guajava* L. y *Coffea arabica* L. en tres municipios de la Provincia de Vélez (Santander, Colombia) Parte 2: Identificación y evaluación de parasitoides del Orden Hymenoptera [Fruit flies (Diptera: Tephritidae) and parasitoids associated with *Psidium guajava* L. and *Coffea arabica* L. in three municipalities of the Province of Vélez (Santander, Colombia) Part 2: Identification and evaluation of parasitoids of the Hymenoptera Order]. *Revista Corpoica* **5**, 13-21.
- Cancino J, Ruiz L, Hendrichs J & Bloem K. 2009. Evaluation of sequential exposure of irradiated hosts to maximize the mass rearing of fruit fly parasitoids. *Biocontrol Science and Technology* **19**, 95-109.
- Carton Y, Poirié M & Nappi AJ. 2008. Insect immune resistance to parasitoids. *Insect Science* **15**, 67-87.

- Díaz-Fleischer F & Aluja M. 2003. Behavioural plasticity in relation to egg and time limitation: the case of two species in the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). *Oikos* **100**, 125-133.
- Domínguez J, Artiaga-López T, Solís E & Hernández E. 2010. Métodos de colonización y cría masiva [Colonisation and mass rearing methods]. In: *Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo* [Fruit Flies: Principles and Procedures for Management] (eds P Montoya, J Toledo & E Hernández) pp. 259-276. Coyacán, México.
- Duan JJ, Messing RH & Dukas R. 2000. Host selection of *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae): comparative response to fruit-infesting and gallforming tephritid flies. *Biological Control* **29**, 838-845.
- Eben A, Benrey B, Sivinski J & Aluja M. 2000. Host species and host plant effects on preference and performance of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Environmental Entomology* **29**, 87-94.
- Ero MM, Hamacek EL, Peek T & Clarke A. 2010. Preference among four *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae) by *Diachasmimorpha kraussii* (Fullaway) (Hymenoptera: Braconidae). *Australian Journal of Entomology* **49**, 324-331.
- Jiron LF & Mexzon RG. 1989. Parasitoid hymenopterans of Costa Rica: geographical distribution of the species associated with fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Entomophaga* **34**, 53-60.
- Hassan SA. 1994. Strategies to select *Trichogramma* species for use in biological control. In: *Biological control with egg parasitoids* (eds E Wajnberg & SA Hassan), pp. 55-71. CAB International, Wallingford.

- Hernández-Ortiz V. 1993. Description of a new *Rhagoletis* species from tropical Mexico (Diptera: Tephritidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* **95**, 418-424.
- Hernández-Ortiz V, Pérez-Alonso R & Wharton RA. 1994. Native parasitoids associated with the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) in Los Tuxtlas, Veracruz, Mexico. *Entomophaga* **39**, 171-178.
- López M, Aluja M & Sivinski J. 1999. Hymenopterous larval-pupal and pupal parasitoids of *Anastrepha* flies in Mexico. *Biological Control* **15**, 119-129.
- Medianero E, Korytkowski CA, Campo C & León C. 2006. Hymenoptera parasitoides asociados a *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) en Cerro Jefe y Altos de Pacora, Panamá. [Hymenoptera parasitoids associated with *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) in Cerro Jefe and Altos de Pacora, Panama] *Revista Colombiana de Entomología* **32**, 136-139.
- Messing RH & Ramadan MM. 2000. Host range and reproductive output of *Diachasmimorpha kraussii* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of tephritid fruit flies newly imported to Hawaii. In *Proceedings of the International Conference on Fruit Flies of Economic Importance*, pp. 713-718. Penerbit Universiti sains; Malaysia.
- Mohamed SA, Overholt WA, Wharton RA, Lux SA & Eltoum EM. 2003. Host specificity of *Psytalia cosyrae* (Hymenoptera: Braconidae) and the effect of different host species on parasitoid fitness. *Biological Control* **28**, 155-163.
- Montoya P, Liedo P, Benrey B, Cancino J, Barrera JF, 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.

- Montoya P, Benrey B, Barrera JF, Zenil M, Ruiz L & Liedo P. 2003. Oviposition behavior and conspecific host discrimination in *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a fruit fly parasitoid. *Biocontrol Science and Technology* **13**, 683-690.
- Montoya P, Cancino J, Pérez-Lachaud G & Liedo P. 2011. Host size, superparasitism and sex ratio in mass-reared *Diachasmimorpha longicaudata*, a fruit fly parasitoid. *BioControl* **56**, 11-17.
- 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, Wharton R, Schliserman P & Aluja M. 2005. Abundance of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) and its associated native parasitoids (Hymenoptera) in feral guavas growing in the endangered northernmost Yungas forests of Argentina with an update on the taxonomic status of Opiinae parasitoids previously reported in this country. *Environmental Entomology* **34**, 807-818.
- Pemberton CE & Willard HF. 1918. A contribution to the biology of fruit fly parasites in Hawaii. *Journal of Agricultural Research* **15**, 419-437.
- Peña JE, Aluja M & Wysoki M. 2009. Pests. In: *The Mango: Botany, Production and Uses* (ed RE Litz) pp. 317–366. CAB International, Wallingford, United Kingdom.
- Ramadan MM, Wong TTY & Herr JC. 1994. Is the oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae) a natural host for the Opiinae parasitoid *Diachasmimorpha tryoni* (Hymenoptera: Braconidae)? *Environmental Entomology* **23**, 761–769.
- Silva R A, Deus EG, Pereira JDB, Jesus CR, Souza-Filho MF & Zucchi RA. 2011. Conhecimento sobre moscas-das-frutas no Estado do Amapá. In: *Moscas-das-frutas na Amazônia brasileira: diversidade, hospedeiros e inimigos naturais* [Knowledge

- regarding fruit flies in the State of Amapá. In: Fruit flies in the Brazilian Amazonia: diversity, host range and natural enemies] (Eds. RA Silva, WP Lemos & RA Zucchi) pp. 223-236. Embrapa Amapá, Macapá.
- Sivinski J, Piñero J & Aluja M. 2000. The distribution of parasitoids (Hymenoptera) of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) along an altitudinal gradient in Veracruz, Mexico. *Biological Control* **18**, 258-269.
- Souza-Filho MF, Raga A & Zucchi RA. 2003. Moscas-das-frutas no estado de São Paulo: ocorrência e dano [Fruit flies in the State of São Paulo: occurrence and damage]. *Laranja* **24**, 45-69.
- Statgraphics. 2008. Statgraphics Centurion XV User Manual, by StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, Virginia, USA, 287 p.
- Strand MR & Pech LL. 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annual Review of Entomology* **40**, 31-56.
- Tigrero J. 2007. Arquitectura del fruto e incidencia de parasitismo sobre larvas de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) [Architecture of fruit and the incidence of parasitism on *Anastrepha* larvae (Diptera: Tephritidae)]. Sangolquí – Ecuador, *Boletín Técnico* **7**, Serie Zoológica **3**. 31-40.
- van Alphen JJM & Janssen ARM. 1982. Host selection by *Asobara tabida* Nees (Braconidae: Alysiinae), a larval parasitoid of fruit inhabiting *Drosophila* species. II. Host species selection. *Netherlands Journal of Zoology* **32**, 215-231.
- van Alphen JJM & Vet LEM. 1986. An evolutionary approach to host finding and selection. In: *Insect Parasitoids* (eds JK Waage & D Greathead) pp. 23-61. Academic Press, London.
- Vet LE & Dicke M. 1992. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Review of Entomology* **37**, 141-172.

- Vinson SB. 1998. The general host selection behaviour of parasitoid Hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species. *Biological Control* **1**, 79-96.
- Wong TTY & Ramadan MM. 1992. Mass-rearing biology of larval parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae) of tephritid flies (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. In: *Advances in Insect Rearing for Research and Pest Management* (eds TE Anderson & NC Leppla), pp. 405-426. Westview Press, San Francisco.
- Zucchi RA, Marinho CF & Silva RA. 2011. First record of the fruit fly parasitoid *Doryctobracon crawfordi* (Viereck) (Hym., Braconidae) in Brazil. *Neotropical Entomology* **40**, 711-712.
- Zucchi RA. 2008. Fruit flies in Brazil - *Anastrepha* species and their hosts plants. [Accessed 28 th Aug 2014.] Available from URL: www.lea.esalq.usp.br/anastrepha/, updated on July 24, 2014.

Considerações finais

Para se obter sucesso na criação de *D. brasiliensis* em larvas de *A. fraterculus*, com vista à criação massal, para ser utilizado em programas de controle biológico aplicado de *A. fraterculus*, deve-se proceder da seguinte forma:

- oferecer larvas de *A. fraterculus* de 3º instar;
- por um período de 12 horas;
- em uma proporção de 15 larvas por fêmea;
- os adultos devam ser alimentados com solução de mel a 20%, e;
- devem ser mantidos em temperaturas de 20 a 22°C.

Para se obter maiores taxas de emergência, porcentagem de parasitismo, capacidade de vôo e sobrevivência, com vista à criação massal dos parasitoides nativos das Américas (*U. anastrephae* e *C. haywardi*) para o controle biológico de *A. obliqua* deve-se proceder da seguinte forma:

- ofertecer larvas de seis dias de *A. obliqua* para a criação de *U. anastrephae* e pupas de 1 a 4 dias para a criação de *C. haywardi*.

Ficou evidente que larvas de *A. obliqua* não são hospedeiros naturais e também não são adequados para a multiplicação dos parasitoides nativos *O. hirtus* e *D. crawfordi*, apesar de que estas espécies ocorrem em simpatria.

E tendo em vista que a criação massal de parasitoides de moscas-das-frutas é um elemento indispensável para o estabelecimento de um programa de controle

biológico destas pragas, os resultados deste trabalho auxiliarão futuros programas de manejo de moscas-das-frutas em diferentes regiões.

Referências gerais

AGUIAR-MENEZES, E. L.; MENEZES, E. B.; LOIÁCONO, M. S. First record of *Coptera haywardi* Loíacono (Hymenoptera: Diapriidae) as a parasitoid of fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Brazil. **Neotropical Entomology**, v.32, p.355-358, 2003.

ALUJA, M. 1993. **Manejo Integrado de la Mosca de la Fruta**. México: Editorial Trillas, 1993. 252 pp.

ALUJA, M. Bionomics and management of *Anastrepha*. **Annual Review of Entomology**, v.39, p.155-178, 1994.

ALUJA, M.; MANGAN, R. L. Fruit fly (Diptera: Tephritidae) host status determination: critical conceptual, methodological, and regulatory considerations. **Annual Review of Entomology**, v.53, p.473-502, 2008.

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.

ARREDONDO, J.; DÍAZ-FLEISCHER, F.; PÉREZ-STAPLES, D. Biología y comportamiento. In: MONTOYA, P.; TOLEDO, J.; HERNÁNDEZ, E. Y. (Ed.). **Moscas de la Fruta: Fundamentos y Procedimientos para su Manejo**. México: S y G editores, 2010. p.91-106.

CARVALHO, E. S.; NASCIMENTO, S. S.; MATRANGOLO, W. J. R. Controle biológico. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p.113-117.

CHRISTENSON, L. D.; FOOTE, R. H. Biology of fruit flies. **Annual Review of Entomology**, v.5, p.171-192, 1960.

ENKERLIN, W. R. Impact of fruit fly programmes using the sterile insect technique. In: DYCK, V. A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A. S. (Ed.). **Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area Wide Integrated Pest Management**. The Netherlands: Springer, 2005. p.651-676.

GARCIA, F. R. M.; CORSEUIL, E. Native hymenopteran parasitoids associated with fruit flies (Diptera: Tephritoidea) in Santa Catarina State, Brazil. **The Florida Entomologist**, v.87, p.517-521, 2004.

GARCIA, F. R. M.; LARA, D. B. Análise faunística e flutuação populacional de moscas-das-frutas (Diptera, Tephritidae) em pomar cítrico no município de Dionísio Cerqueira, Santa Catarina. **Biotemas**, v.19, p.65-70, 2006.

GARCIA, F. R. M. Fruit fly: biological and ecological aspects. In: BANDEIRA, R. R. (Ed.). **Current trends in fruit flies control on perennial crops and research prospects**. Kerala: Transworld Research Network, 2009. p.1-35.

HERNÁNDEZ-ORTIZ, V. **El género *Anastrepha* Schiner en México (Diptera: Tephritidae). Taxonomía, Distribución y sus plantas huéspedes**. Instituto de Ecología, 1992. 162 pp.

HERNÁNDEZ-ORTIZ, V.; ALUJA, M. Listado de especies del género neotropical *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae), con notas sobre su distribución y plantas hospederas. **Folia Entomológica Mexicana**, v.88, p.89-105, 1993.

KOVALESKI, A. **Processo adaptativo na colonização da maçã (*Malus domestica* L.) por *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) na região de Vacaria, RS**. 1997. 122p f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

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.

MATRANGOLO, W.J.R.; NASCIMENTO, A.S.; CARVALHO, R.S.; MELO, E.D.; JESUS, M. Parasitoides de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) associados a fruteiras tropicais. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.27, p.593-603, 1998.

NAVA, D. E.; BOTTON, M. **Bioecologia e controle de *Anastrepha fraterculus* e *Ceratitis capitata* em pessegueiro**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 29p. (Embrapa Clima Temperado, Documentos, 315).

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

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.

SALLES, L. A. B. **Bioecologia e controle da moscas-das-frutas sul-americana**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 1995. 58p.

SALLES, L. A. B. Parasitismo de *Anastrepha fraterculus* (Wied.) (Diptera: Tephritidae) por Hymenoptera, na região de Pelotas, RS. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, p.769-774, 1996.

UCHÔA-FERNANDES, M. A.; MOLINA, R. M. S.; OLIVEIRA, I.; ZUCCHI, R. A.; CANAL, N. A.; DÍAS, N. B. Larval endoparasitoids (Hymenoptera) of frugivorous flies (Diptera, Tephritoidea) reared from fruits of the cerrado of the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v.4, p.181-186.

ZUCCHI, R. A. Espécies de *Anastrepha*, sinónímias, plantas hospedeiras e parasitóides. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das frutas de Importância econômica no Brasil: Conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p.41-48.

ZUCCHI, R. A.; MARINHO, C. F.; SILVA, R. A. First record of the fruit fly parasitoid *Doryctobracon crawfordi* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae) in Brazil. **Neotropical Entomology**, v.40, p.711-712, 2011.