

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Programa de Pós-Graduação em Entomologia



Dissertação

**Estratégias reprodutivas de *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911)
(Hymenoptera: Braconidae) relacionadas à cópula e ao parasitismo**

Karina Jobim Pinto

Pelotas, 2018

Karina Jobim Pinto

**Estratégias reprodutivas de *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911)
(Hymenoptera: Braconidae) relacionadas à cópula e ao parasitismo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Entomologia.

Orientador: Dr. Dori Edson Nava

Co-orientador: Dr. Rafael da Silva Gonçalves

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P659e Pinto, Karina Jobim

Estratégias reprodutivas de *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: braconidae) relacionadas à cópula e ao parasitismo / Karina Jobim Pinto ; Dori Edson Nava, orientador ; Rafael da Silva Gonçalves, coorientador. — Pelotas, 2018.

73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Protandria. 2. Controle biológico. 3. Comportamento reprodutivo. 4. Parasitoide de moscas-das-frutas. I. Nava, Dori Edson, orient. II. Gonçalves, Rafael da Silva, coorient. III. Título.

CDD : 595.774

Banca Examinadora:

Dr. Dori Edson Nava (Orientador)

Dr. Daniel Bernardi

Dr. Edison Zefa

Dr. Thiago de Araújo Mastrangelo

**Dedico este trabalho à minha família
e amigos.**

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde, força, coragem e determinação para completar mais este desafio em minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade da realização do curso de Mestrado.

À CAPES pela concessão da bolsa ao longo do período de mestrado.

À Embrapa Clima Temperado - Laboratório de Entomologia pela permissão para a utilização de suas instalações e infraestrutura para realização deste trabalho.

Ao Dr. Dori Edson Nava pela orientação, paciência, auxílio e amizade durante a execução deste trabalho.

À Dr. Rafael da Silva Gonçalves pela co-orientação, amizade, companheirismo e colaboração no planejamento e execução do trabalho.

Aos Professores e pesquisadores colaboradores do Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela atenção e ensinamentos.

Ao Pesquisador MSc. Ricardo Alexandre Valgas pela disponibilidade, auxílio e colaboração nas análises estatísticas.

À minha família, em especial a minha mãe Luciana e a minha avó Orlanda pelo carinho, amor e por me orientarem a seguir meus sonhos.

À minha família de coração Fátima e Fernando, pelo amor, carinho, apoio e hospitalidade durante este período.

Aos meus irmãos caçulas Maria Luísa e Pedro Henrique pela motivação e compreensão, pelo amor mais puro que existe.

Aos meus padrinhos Léo e Estela por todo incentivo, apoio, motivação e carinho que apesar da distância se fazem tão presentes.

A minha prima-irmã Aline e seu esposo Gustavo por todo incentivo, motivação, amizade, carinho e compreensão.

Aos colegas de pós-graduação, estagiários e bolsistas do Laboratório de Entomologia, pelos bons momentos de descontração que passamos juntos e pelo auxílio sempre que necessário.

Aos funcionários do Laboratório de Entomologia, a pesquisadora Mirtes Melo, ao técnico de laboratório Gilmar Barros pelo auxílio sempre que necessário.

À dona Elisa responsável pela limpeza e organização do Laboratório.

Ao colega de Laboratório Dr. Heitor Lisbôa, pela amizade, paciência, pelo auxílio na realização deste trabalho, bem como pelos momentos de descontração que tivemos.

Aos colegas de Laboratório MSc. Sabrina Ongaratto e MSc. Vinícius Soares Sturza, pela amizade, incentivo e reflexões sobre o trabalho.

À amiga MSc. Maria Sousa, da Universidade Federal do Amapá, pelo companheirismo, incentivo e auxílio na execução deste trabalho.

Ao Dr. Sandro Daniel Nornberg pela amizade, incentivo, auxílio e dedicação na realização deste trabalho, como também pelas discussões e reflexões sobre o mesmo.

Aos amigos Catiúcia Mullet, e Luís Dominguez pela paciência, amizade, compreensão e apoio, sendo eles, os maiores incentivadores desta jornada.

À minha amiga Tatiane Bialves, pela amizade, incentivo, apoio e auxílio na execução deste trabalho.

À minha grande amiga Fabíola Mattos Pereira e seu esposo Angelo da Silva Lopes, sendo ela, um exemplo de mulher e profissional, a qual me inspirou a concluir mais esta etapa.

Ao meu felino de estimação Darwin, por me fazer companhia durante as madrugadas de escrita.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

PINTO, Karina Jobim. **Estratégias reprodutivas de *Doryctobracon areolatus* (Szépliget, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) relacionadas à cópula e ao parasitismo.** 2018. 73f. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Programa de Pós-Graduação em Entomologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Doryctobracon areolatus (Szépliget, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) é um endoparasitoide cenobionte, nativo da região Neotropical e possui como hospedeiro preferencial, larvas de segundo instar do gênero *Anastrepha*, onde sua eficiência de parasitismo pode chegar a 80% em condições naturais. Nos últimos anos estudos referentes à biologia e multiplicação foram realizados, no entanto, ainda não existem pesquisas relacionadas a sua biologia reprodutiva. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi conhecer a biologia e o comportamento reprodutivo relacionado à cópula e oviposição de *D. areolatus*, utilizando-se como hospedeiro larvas de *A. fraterculus*. As criações de manutenção dos insetos e a realização dos experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, sob condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C), umidade relativa do ar (70 ± 10 %) e fotofase (12 horas). Foram realizados experimentos para verificar a sequência de emergência entre machos e fêmeas, verificando a possível ocorrência de protandria em *D. areolatus*. Foram realizados experimentos para verificar a influência da idade dos insetos na reprodução, assim como a importância da cópula para a geração de descendentes, tempo de duração da cópula, verificação de ocorrência de poligamia e monogamia na espécie, além da observação da frequência de cópula ocorrida durante 24h. Foi comprovada a ocorrência de protandria em *D. areolatus*, sendo a razão sexual de 0, 0,06, 0,62, 0,87, 0,98, 1,0, e 1,0 para o 1^o, 2^o, 3^o, 4^o, 5^o, 6^o e 7^o dias de emergência, respectivamente, totalizando uma razão sexual de 0,61. Casais em que as fêmeas são mais jovens, originam uma maior quantidade de fêmeas, tendo, portanto, uma maior razão sexual. Fêmeas virgens só geram descendentes machos, por partenogênese arrenótoca, diferentemente do que ocorre com as fêmeas acasaladas, onde geram machos e fêmeas, sendo a média de 30,4 para fêmeas fecundadas e 14 para fêmeas virgens, denotando média muito maior do que as fêmeas que não acasalaram, sendo a razão sexual 0,63 para as fêmeas fecundadas. Dentre as observações para a

determinação de ocorrência de poligamia e monogamia observou-se que 40% do total dos machos acasalaram mais de uma vez, enquanto as fêmeas acasalaram uma única vez. No entanto, de acordo com experimento que verificou a frequência de cópula durante 24h, observou-se que mesmo as fêmeas sendo monogâmicas, ocorrem múltiplas cópulas. O tempo de duração da 1ª cópula não diferiu significativamente da segunda, embora exista uma redução de 6,53 seg. *D. areolatus* possui as atividades reprodutivas durante o período da fotofase, sendo considerada uma espécie diurna. Comparando a frequência de cópula e recópula entre os casais, considerando a influência da alimentação para o macho, observa-se que dentre os machos alimentados somente na hora do pareamento, 60% não copularam durante o período de 24h de observação. Dentre os machos alimentados previamente, ocorreram 57 tentativas de cópula, enquanto nos machos alimentados durante o experimento ocorreram 24 tentativas de cópula em um período de 24h de observação. Desta forma, os resultados deste trabalho contribuem para ampliar o conhecimento básico sobre a biologia reprodutiva de *D. areolatus*, visto que conhecer as estratégias reprodutivas é importante para o estabelecimento de um programa de controle biológico.

Palavras-chave: protandria; controle biológico; comportamento reprodutivo; parasitoides de mosca-das-frutas

Abstract

PINTO, Karina Jobim. **Reproductive strategies of *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) for mating and parasitism.** 2018. 73f. Dissertation (Master's degree in Entomology) – Post-Graduation program in Entomology, Biology Institute, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Doryctobracon areolatus (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) is a koinobiont endoparasitoid, native to the Neotropics and has the larvae of second instar of the genus *Anastrepha* as preferred host, where its parasitism efficiency can reach 80% under natural conditions. Recent studies have investigated *D. areolatus* biology and multiplication; however, no studies have assessed its reproductive biology. This study investigated the biology and reproductive behavior of mating and oviposition of *D. areolatus*, using larvae of *A. fraterculus* as hosts. The maintenance rearing and experiments were carried out at the Laboratory of Entomology of Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil, under controlled conditions of temperature (25 ± 2 °C), air relative humidity (70 ± 10 %) and a photophase of 12 hours. Experiments were conducted to assess the sequence of male and female emergence as well as possible occurrence of protandria in *D. areolatus*. We also determined the influence of insect age on its reproduction as well as the importance of mating on offspring, duration of mating period, occurrence of polygamy and monogamy in the species, in addition to observation of mating frequency during 24 hours. Protandria was confirmed on *D. areolatus*, with the sex ratio of 0, 0.06, 0.62, 0.87, 0.98, 1.0, and 1.0 for the 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 6th and 7th days of emergence, respectively, totaling a sex ratio of 0.61. Couples in which the females are younger produce more female offspring with thus a higher sex ratio. Virgin females only generate male descendants by arrhenotoca parthenogenesis, contrary to what occurs with the mated females, which produced males and females. Fertilized females showed an average of 30.4 offspring with a sex ratio of 0.63, while virgin females had an average of 14 offspring, all males. Observations of polygamy and monogamy showed that 40% of males mated more than once, while females mated only once. However, the mating frequency during 24 hours showed that despite monogamous, females had multiple copulations. The duration of the first copulation did not differ significantly from the second with a reduction of 6.53 sec. *D. areolatus* has reproductive activities during the photophase, considered a diurnal species.

Comparison of mating and re-mating frequencies between couples, considering the influence of feed on the male, showed that among males fed only on pairing time, 60% did not mate during the 24-hour period of observation. Among males fed previously, there were 57 attempts to mate, whereas in males fed during the experiment, there were 24 attempts for copulation in the 24-hour period of observation. The results of this study contribute to improve the basic knowledge of reproductive biology of *D. areolatus*, since knowing reproductive strategies is important for a biological control program.

Key words: protandria; biological control; reproductive behavior; parasitoids of fruit flies

Lista de Figuras

Artigo 1

- Figura 1 Ritmo de emergência de machos e fêmeas de *Doryctobracon areolatus*. Temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. Os valores sobre as barras indicam o número de machos e fêmeas emergidos. A porcentagem foi calculada a partir dos totais para cada sexo.....41
- Figura 2 Sexo da progênie de *Doryctobracon areolatus* por ocasião da avaliação da protandria, relativo a razão sexual diária. Temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.....42
- Figura 3 Progênie de *Doryctobracon areolatus* durante o período de parasitismo. A) Duração média diária do período ovo-adulto de parasitoides (machos e fêmeas). B) Razão sexual diária. Temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.....43

Artigo 2

- Figura 1 Influência da cópula de *Doryctobracon areolatus* sobre a produção de descendentes. A) Número médio de machos e fêmeas. B) Total de parasitoides. Temperatura de $25\pm 2^{\circ}$ C, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.....65
- Figura 2 Ocorrência de segunda cópula em *Doryctobracon areolatus*, quando expostos à novos parceiros virgens. A) Percentual de machos que acasalaram na primeira e na segunda cópula; B) Percentual de fêmeas que acasalaram na primeira e segunda cópula. Temperatura de $25\pm 2^{\circ}$ C, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.....66
- Figura 3 Duração média da cópula do primeiro e do segundo acasalamento de *Doryctobracon areolatus*. Temperatura de $25\pm 2^{\circ}$ C, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.67
- Figura 4 Ritmo de cópulas e recópulas de *Doryctobracon areolatus* ao longo do dia. Machos alimentados previamente a formação do casal. Machos alimentados por ocasião da formação do casal. Sobre as barras o valor absoluto. Temperatura de $25\pm 2^{\circ}$ C, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.....68
- Figura 5 Frequência de tentativas de cópulas e cópulas efetivas de *Doryctobracon areolatus* ao longo das 24h de observação para casais onde os machos foram alimento antes e durante o acasalamento. A) Tentativas de cópulas; e B) Cópulas efetivas. Sobre as barras, o valor absoluto. Temperatura de $25\pm 2^{\circ}$ C, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.....69

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Influência da idade dos machos e das fêmeas sobre a produção, origem, o número médio de descendentes e razão sexual de <i>Doryctobracon areolatus</i> . Temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.....	40
----------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Sumário

1 Introdução geral.....	17
2 Artigo 1 - Ocorrência de Protandria em <i>Doryctobracon areolatus</i> (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) e suas Implicações no Acasalamento.....	23
Resumo	24
Abstract	25
Introdução.....	26
Material e métodos	28
Bioensaio para observação ocorrência de protandria	28
Efeito da idade de machos e de fêmeas na geração de descendentes	30
Análise estatística.....	31
Resultados e Discussão	31
Agradecimentos.....	36
Referências bibliográficas.....	36
3 Artigo 2 – Comportamento reprodutivo do parasitoide larva-pupa de mosca-das- frutas <i>Doryctobracon areolatus</i> (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae)	45
Resumo	46
Abstract	48
1. Introdução	50
2. Material e Métodos	52
2.1. Bioensaios para observação do comportamento reprodutivo	52
Experimento 1 - O papel da cópula na determinação do sexo da prole	52
Experimento 2 - Sistema de acasalamento.....	53

Experimento 3 - Impactos da alimentação dos machos na frequência de cópula.....	54
2.2. Análise estatística	55
3. Resultados.....	56
Experimento 1 - O papel da cópula na determinação do sexo dos descendentes.....	56
Experimento 2 - Sistema de acasalamento.....	56
Experimento 3 - Impactos da alimentação dos machos na frequência de cópula.....	56
4. Discussão.....	58
5. Referências Bibliográficas	61
4 Conclusão.....	70
5 Referências	71

1 Introdução geral

O processo de reprodução é responsável pela geração de descendentes e perpetuação das espécies, sendo que nos insetos em sua grande maioria é do tipo sexuada, ou seja, machos e fêmeas devem estar sexualmente maduros para realizar a cópula (GULLAN; CRASTON, 2007; WAJNBERG et al., 2008). Alguns parasitoides himenópteros também podem se reproduzir de forma assexuada, porém, nessas situações alguns estudos sugerem que fêmeas são diploides e os machos haploides e, portanto, a geração de novas fêmeas é condicionada a ocorrência de cópula (WAJNBERG et al., 2008; FORBES et al., 2010; MOYNIHAN; SHUKER, 2011).

Espécies com reprodução sexuada utilizam diferentes estratégias reprodutivas e dentre elas, a protandria. A mesma se caracteriza pelo fato dos machos concluírem a maturação do aparelho reprodutivo antes das fêmeas, e como consequência os mesmos emergem antes das fêmeas (FAIRBAIM; PREZIOSI, 1994; FORBES et al., 2010). Diversos fatores estão relacionados a ocorrência desse fenômeno, como por exemplo, seleção sexual, monogamia e sinovigenia. A protandria pode ser classificada como sazonal, quando a emergência dos machos ocorre alguns dias em relação às fêmeas, ou diurna, quando os machos emergem poucas horas antes das fêmeas (FAGESETROM; WIKLUND, 1982).

Para Moller (2004) tal estratégia pode ser considerada parte da seleção sexual, pois machos alimentados anteriormente estariam mais fortes e teriam mais chances de vencer uma disputa pelo acasalamento e assim perpetuar seus descendentes. Além disto, Morbey et al. (2012) consideram que a protandria pode estar relacionada ao comportamento fisiológico e a seleção

natural, visto que os machos ao emergir antes, estarão sujeitos a predação, alterações ambientais, disputa territorial e posteriormente quando às fêmeas emergirem, somente os machos sobreviventes e mais resistentes à essas alterações poderão realizar a cópula.

Para *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera: Pteromalidae), Moynihan e Shuker (2011) sugerem que o fenômeno de protandria pode estar relacionado ao processo de seleção sexual. Neste caso, as fêmeas após a cópula armazenam os espermatozoides na espermateca e quando são liberados ocorre a fecundação dos óvulos, originando fêmeas; caso não ocorre fecundação apenas machos são gerados, por de partenogênese arrenótoca. Para o parasitoide de mosca-das-frutas *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes, 1924) (Hymenoptera: Figitidae), há ocorrência de protandria com uma variação de um dia de emergência, e verificando que fêmeas virgens originam somente machos como descendentes (OVRUSKI; ALUJA, 2002).

Para a espécie *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Vinson, 1972) (Hymenoptera: Braconidae), ocorre o fenômeno de protandria sazonal, uma vez que os machos emergem cerca de dois dias antes em relação às fêmeas (HIROSE; VINSON, 1988). O mesmo também ocorre em espécies de *Trichogramma*, em que todas apresentaram comportamento de protandria diurna, porém nessas espécies a variação é de apenas de algumas horas (POMPANON et al., 1995). Wiklund e Fagerstrom (1977) sugerem a existência de uma ligação entre os fenômenos de protandria e monogamia. Esta relação foi demonstrada na espécie *C. nigriceps*, em que as fêmeas apresentam caráter de monogamia, com preferência por apenas um único parceiro (HIROSE; VINSON, 1988).

Os termos monogamia e poligamia (esta última envolvendo poliginia e poliandria) são baseados em comportamentos juntos aos parceiros sexuais, considerando itens como número de cópulas de ambos os sexos durante um determinado período, frequência dessas cópulas, número de parceiros. A monogamia ocorre com mesmo parceiro, enquanto na poligamia os parceiros podem copular com vários indivíduos, sendo considerados comportamentos contrários. A poligamia pode ser de duas formas: a) poliginia, caracterizada pelo fato de machos acasalarem com várias fêmeas e estas acasalam com um único macho e b) poliandria quando ocorre exatamente ao contrário da poliginia

(THORNHILL; ALCOCK, 1983).

Em fêmeas monogâmicas, apenas uma única cópula pode ser suficiente para originar descendentes de ambos os sexos, a exemplo de *C. nigriceps* e *A. pelleranoi* (HIROSE; VINSON, 1988; RIDLEY, 1993; OVRUSKI; ALUJA, 2002). Em fêmeas poliândricas, copular com diferentes machos pode maximizar sua reprodução, porém é considerado um comportamento raro (DOWELL e HORN, 1975; GORDH; DEBACH, 1978; THORNHILL; ALCOCK, 1983; RIDLEY, 1993; WELLER, 1996; OVRUSKI; ALUJA 2002; BENELLI et al., 2012).

Diversos estudos relacionados a himenópteros descrevem que na reprodução dos parasitoides, a nutrição da larva pode influenciar diretamente o potencial reprodutivo da espécie (PRINCE, 1973; PAPAJ, 2000; GILLOT, 2003). Além da alimentação durante a fase larval, os parasitoides adultos também necessitam de uma nutrição adequada, principalmente as fêmeas, as quais requerem uma dieta eficiente, para assim ocorrer à produção e maturação de óvulos ou maximizar a mesma (JERVIS, 2001; RIVERO et al., 2001). Desta forma, definem-se como sinovigênicos, aqueles organismos cujas fêmeas necessitam ingerir proteínas e carboidratos logo após a emergência para a produção e maturação de novos ovos (RIVERO; WEST, 2005). Fêmeas sinovigênicas utilizam diferentes fontes como reserva nutritiva para a maturação dos oócitos, como por exemplo o fluído seminal que os machos transferem no momento de cópula (GILLOTT, 2003; DOSSI; CONSOLI, 2010). A dieta também é importante para a sobrevivência e longevidade dos adultos, interferindo de forma direta nos parasitoides. Fêmeas e machos de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead, 1905) (Hymenoptera: Braconidae) são capazes de sobreviver por um período de até seis dias quando for oferecido somente água. Sivinski et al. (2006), também relatam que a fertilidade e a produção de óvulos é reduzida quando os insetos não são alimentados. No caso dos machos que são mal alimentados ocorre a diminuição do vigor para acasalamento e, desta forma a fêmea se reproduziria por partenogênese e conseqüentemente só poderia originar machos, interferindo assim na razão sexual dos descendentes.

Diferentemente do que ocorre nas espécies provigênicas, como a espécie *Cotesia flavipes* (Cameron, 1891) (Hymenoptera: Braconidae), onde as fêmeas já emergem com uma quantidade fixa de ovos maduros e continuam

produzindo-os ao longo de sua vida, destinando assim a nutrição apenas para a sua manutenção no estágio adulto. Em razão dessa característica, é exigido das fêmeas um controle no tamanho da prole, reduzindo o número de oviposições quando os suprimentos forem escassos (FLANDERS, 1950; HEIMPEL; ROSENHEIM, 1998; PARKER; COURTNEY, 1984).

O número de cópulas, a frequência e a duração das mesmas podem interferir de forma direta na geração de descendentes. Estudos comportamentais realizados por Ovruski e Aluja (2002) com a espécie *A. pelleranoi*, demonstraram que a duração da cópula é crucial para a determinação da razão sexual da população descendente. De acordo com os autores, fêmeas que apresentaram curto período de cópula, não foram fertilizadas, e como consequência geraram apenas machos. Nessas situações, as fêmeas são chamadas de “pseudo” virgens (MATHEWS, 1975). Em contrapartida, fêmeas de *Chelonus insularis* (Cresson, 1863) (Hymenoptera: Braconidae) podem realizar múltiplas cópulas, totalizando sete no período de uma hora de observação (REZENDE et al., 1995).

Durante o processo de cômte, os machos podem apresentar comportamentos distintos, das quais só irá atrair fêmeas de mesma espécie, evitando assim que ocorram casos de hibridização com espécies próximas. O comportamento durante a cômte é diverso e característico de cada espécie, assim como o período da mesma e a frequência (MAYR, 1973). Tal comportamento vai desde a atração e o reconhecimento dos insetos através da possível liberação de feromônios bem como pela vibração das asas dos machos à espera pelo movimento de receptividade da fêmea. Sendo que tais comportamentos, possivelmente ocorrem de forma natural no meio ambiente, denotando assim importância de conhecer as estratégias que os mesmos se utilizam para reprodução (GILLOT, 2003).

Todos esses estudos despertam um interesse pela investigação das estratégias de comportamento reprodutivo exibido pelos himenópteros, sendo eles um importante aliado do controle biológico. Dentre os himenópteros, os parasitoides braconídeos, são os principais agentes de biocontrole de moscas-das-frutas, entre elas *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann, 1830) (Diptera: Tephritidae). Dentre os parasitoides destaca-se *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae), como um dos mais frequentes e

abundantes parasitoides, distribuído principalmente nos Estados das regiões Sudeste e Sul do Brasil, parasitando moscas-das-frutas em 21 espécies de frutíferas (CANAL; ZUCCHI, 2000). *D. areolatus* é um endoparasitoide cenobionte, considerado nativo da região Neotropical e possui como hospedeiros preferenciais larvas de segundo instar do gênero *Anastrepha*, onde sua eficiência de parasitismo pode chegar a 80% em condições naturais (STUHL; SIVINSKI, 2015; GONÇALVES, 2016). Estudos relacionados a biologia, ecologia e multiplicação já foram realizados (NUNES et al., 2012, GONÇALVES et al., 2018), no entanto, ainda não existem pesquisas relacionadas a biologia reprodutiva de *D. areolatus*.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi conhecer as estratégias relacionadas ao comportamento reprodutivo, incluindo cópula e ao parasitismo da espécie de parasitoide de mosca-das-frutas *D. areolatus*. Tendo como objetivos específicos: a) determinação da ocorrência de protandria e influência da idade de machos e fêmeas na geração de descendentes; b) biologia reprodutiva e estratégias do comportamento reprodutivo e sua influência na geração de descendentes. Estes estudos contribuirão para o conhecimento científico sobre a espécie. Posteriormente, conhecidas suas estratégias de comportamento reprodutivo, juntamente com o estudo com biologia reprodutiva desses parasitoides de moscas-das-frutas, torna o mesmo um elemento adicional para o estabelecimento de um programa de controle biológico.

Artigo1: Revista Neotropical Entomology

**2 Artigo 1 - Ocorrência de Protandria em *Doryctobracon areolatus*
(Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) e suas Implicações no
Acasalamento**

KJ Pinto¹, H Lisboa², RS Gonçalves², SD Nörnberg², RA Valgas² e DE Nava²

¹Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, IB/UFPel, 96010-900, Pelotas, RS, Brasil.

²Embrapa Clima Temperado, 96010-970, Pelotas, RS, Brasil.

Karina Jobim Pinto

Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Avenida Eliseu Maciel s/n, 96010-900, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil.

E-mail: nina.jobim@gmail.com

Título Resumido: Ocorrência de Protandria em *Doryctobracon areolatus*

Resumo

A protandria é uma estratégia reprodutiva que consiste na emergência dos machos antes das fêmeas, podendo ser sazonal ou diurna. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a ocorrência de protandria no parasitoide de moscas-das-frutas *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti) (Hymenoptera: Braconidae) bem como a influência da idade do macho e da fêmea no acasalamento e na razão sexual. Os experimentos foram realizados em condições controladas de temperatura ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade relativa do ar ($70\pm 10\%$) e fotofase (12 horas). Para avaliar a ocorrência da protandria, acompanhou-se a emergência de machos e fêmeas de *D. areolatus*. A partir da definição do ritmo de emergência foram formados casais com diferença de até 3 dias idades. Foi comprovada a ocorrência de protandria em *D. areolatus*, sendo a razão sexual de 0; 0,06; 0,62; 0,87; 0,98; 1,0; e 1,0 para o 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7^o dia de emergência, respectivamente, totalizando uma razão sexual de 0,61. Casais em que as fêmeas são mais jovens, originam uma maior quantidade de fêmeas, tendo, portanto, uma maior razão sexual. A constatação da protandria, como estratégia reprodutiva de *D. areolatus* e sua influência na geração de descendentes, contribui para ampliar o conhecimento básico sobre a espécie, possibilitando a otimização de criações em laboratório e posteriores liberações em campo.

Palavras-chave: Controle biológico, Parasitoide, Estratégia reprodutiva, Biologia

Abstract

Protandria is a reproductive strategy consisting of emergence of males before females and may be seasonal or diurnal. This work aimed to characterize the occurrence of protandria in parasitoids of fruit flies *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti) (Hymenoptera: Braconidae) as well as the influence of male and female ages on mating and sex ratios. Experiments were carried out under controlled conditions of temperature ($25\pm 2^\circ\text{C}$), air relative humidity ($70\pm 10\%$) and a photophase of 12 hours. To evaluate the occurrence of protandria, we monitored the emergence of males and females of *D. areolatus*. From the definition of the emergence rate, couples were formed with difference of up to three days. The occurrence of protandria in *D. areolatus* was confirmed with a sex ratio of 0, 0.06, 0.62, 0.87, 0.98, 1.0, and 1.0 for the 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 6th and 7th days of emergence, respectively, totaling a sex ratio of 0.61. Couples in which the females are younger produce more female offspring with thus a higher sex ratio. The occurrence of protandria as a reproductive strategy of *D. areolatus*, as well as its influence of offspring, contributes to improve the basic knowledge of the species, allowing optimization of laboratory rearing and later releases in the field.

Key words: Biological control, Parasitoids, Reproductive Strategy, Biology

Introdução

O fenômeno de protandria é considerado uma estratégia reprodutiva em que os machos emergem antes das fêmeas, podendo ser sazonal quando a diferença é de dias e diurno quando esta diferença é de algumas horas (Fagerstron & Wiklund 1982). Em espécies de *Trichogramma* ocorre a protandria diurna e em *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Vinson, 1972) (Hymenoptera: Braconidae) ocorre a protandria sazonal (Hirose & Vinson 1988, Pompanon *et al* 1995).

A protandria é um fator determinante na reprodução dos insetos, tanto do ponto de vista adaptativo como evolutivo, uma vez que machos ao emergir antes das fêmeas podem explorar o ambiente e as condições do mesmo, para estarem receptivos quando às fêmeas emergirem, no entanto estão mais suscetíveis podendo ser considerado um fator de seleção (Fairbaim & Preziosi 1994, Forbes *et al* 2010). Várias hipóteses têm sido levantadas para a ocorrência desse fenômeno e dentre elas a redução da endogamia, a seleção de machos aptos a reprodução, possibilitando uma vantagem competitiva aos machos que emergirem primeiro e fêmeas emergirem aptas para a cópula evita riscos de mortalidade como fatores ambientais e predação (Thornhill & Alcock 1983, Morbey 2013).

De acordo com Morbey (2013), o fato dos machos emergirem antes das fêmeas, favorece a competição entre os mesmos para a perpetuação da espécie, caso contrário, existe a possibilidade de quando os machos emergirem, as fêmeas já estarem acasaladas ou inaptas para tal, visto que as mesmas são consideradas responsáveis pela razão sexual. Para a espécie de parasitoide *Nasonia vitripennis* (Walker, 1836) (Hymenoptera: Pteromalidae), a

ocorrência do fenômeno de protandria está relacionada ao processo de seleção sexual, uma vez que os machos são haploides e as fêmeas diploides, e assim as fêmeas seriam responsáveis pelo sexo dos descendentes. No entanto, em insetos com reprodução sexuada, para ocorrer a geração de fêmeas, acredita-se ser necessária a realização de cópula. Neste caso, as fêmeas armazenam os espermatozoides em sua espermateca e quando estes são liberados, ocorre a fecundação do óvulo, originando fêmeas, caso não ocorra fecundação, os descendentes serão machos (Wajnberg *et al* 2008, Forbes *et al* 2010, Moynihan & Shuker 2011).

No entanto, conforme Holloway *et al.* (1999), questiona essa possível afirmação, visto que na espécie *Bracon hebetor* (Say, 1857) (Hymenoptera: Braconidae), as fêmeas virgens geram machos haploides e as acasaladas originam ambos os sexos diploides, além de machos haploides, existindo assim uma variação no cariótipo do macho. Porém não se pode afirmar se este comportamento de variação é padrão ou ocasional da espécie.

Wiklund & Fagerstrom (1977) sugerem que pode existir uma ligação entre o fenômeno de protandria e a monogamia. Esta relação foi comprovada para as espécies *C. nigriceps* e *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes, 1924) (Hymenoptera: Figitidae), onde a protandria está relacionada a preferência das fêmeas por um único parceiro (Hirose & Vinson 1988, Ovruski & Aluja 2002).

De uma maneira geral, poucos estudos têm sido realizados com biologia reprodutiva de parasitoides de moscas-das-frutas. Atualmente, no Brasil, pesquisas vêm sendo conduzidas com parasitoides nativos de moscas-das-frutas, especialmente com *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae), que ocorre na região Neotropical, possuindo uma

ampla distribuição do México até a Argentina (Paranhos *et al* 2018). *D. areolatus* é um endoparasitoide cenobionte de larvas de moscas-das-frutas, principalmente do gênero *Anastrepha*, onde pode apresentar um parasitismo de 80% (Stuhl & Sivinski 2012). As fêmeas realizam postura, preferencialmente em larvas de segundo instar, e a emergência irá ocorrer no estágio de pupa (Nunes *et al* 2012, Stuhl & Sivinski 2012, Gonçalves *et al* 2018). Desta forma, estudos vêm sendo realizados com o intuito de conhecer sua biologia visando sua produção em laboratório para viabilizar um programa de controle biológico aplicado de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi determinar a sequência de emergência de machos e fêmeas *D. areolatus*, visando a determinação da sequência de emergência de machos e fêmeas ao longo da vida das fêmeas, bem como a sua influência no sucesso de acasalamento.

Material e métodos

A criação de manutenção de *D. areolatus* foi realizada com o hospedeiro *A. fraterculus* utilizando-se a metodologia descrita por Gonçalves (2016). A criação de manutenção e os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul, em condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C), umidade relativa do ar (70 ± 10 %) e fotofase (12 horas).

Bioensaio para observação ocorrência de protandria

Foram individualizados 20 casais, sendo machos com 48 horas de idade e fêmeas com até 12 horas, colocados em gaiolas plásticas (copos plásticos 500 mL). Os insetos foram alimentados com uma gota de mel puro depositada

sobre uma tira de Parafilm® (1 cm²) e água, fornecida em tubo de vidro (5 mL) através de capilaridade por meio de um rolete de algodão hidrófilo. A cada três dias o alimento e a água foram substituídos.

Diariamente, desde a formação dos casais até a morte das fêmeas, foram ofertadas 30 larvas de segundo instar (6 dias de idade a 25±1°C) de *A. fraterculus*. As larvas foram depositadas em unidades de parasitismo (UP) constituídas por placa de acrílico (1,7 cm de diâmetro x 0,1 cm de altura) contendo uma dieta composta pela mistura de ágar (0,5 g), polpa de goiaba (45 g) e água destilada (50 mL), que evitava a desidratação das larvas e servia de alimento, envolta em tecido *voile*. As larvas foram expostas ao parasitismo por 24 horas e após transferidas para frascos plásticos contendo dieta artificial, preparada conforme metodologia de Nunes *et al* (2013), onde permaneceram até a formação dos pupários. Em seguida, os pupários foram removidos da dieta artificial por meio de lavagem em água corrente, sendo imediatamente transferidos para frascos de acrílico (2,5 cm de diâmetro x 4,5 cm de altura) contendo vermiculita de granulometria fina. Após seis dias os pupários foram removidos da vermiculita, contabilizados e individualizados em placas para cultura de células com 96 unidades, onde permaneceram até a emergência dos parasitoides ou dos hospedeiros. Esta avaliação foi realizada diariamente às 8:00h (considerando insetos emergidos durante a noite) e às 17:00h (considerando insetos emergidos no dia), sendo registrado também o sexo dos parasitoides.

Os parâmetros avaliados foram o período ovo-adulto de machos e fêmeas, e razão sexual (rs), por meio da fórmula: $rs = \frac{\text{Fêmea}}{\text{Fêmea} + \text{Macho}}$.

Efeito da idade de machos e de fêmeas na geração de descendentes

Diariamente, por sete dias consecutivos foram individualizados 200 pupários. Ao emergirem, adultos foram separados por sexo e acondicionados em gaiola (26,2 x 17,7 x 14,7 cm) contendo água e mel puro, onde permaneceram até a formação dos casais, utilizando-se diferentes idades de fêmeas e machos com até 3 dias de diferença. Os tratamentos foram estabelecidos de acordo com a sequência de emergência natural de machos e fêmeas, consistindo em: ♂ de 1 dia e ♀ de 1 dia, ♂ de 1 dia e ♀ de 2 dias, ♂ de 1 dia e ♀ de 3 dias, ♂ de 2 dias e ♀ de 1 dia, ♂ de 2 dias e ♀ de 2 dias, ♂ de 2 dias e ♀ de 3 dias, ♂ de 3 dias e ♀ de 1 dia, ♂ de 3 dias e ♀ de 2 dias, ♂ de 3 dias e ♀ de 3 dias. Para cada tratamento foram utilizadas 10 repetições, constituídas por um casal.

Durante 21 dias foram oferecidas, diariamente, a cada casal de parasitoides, uma unidade de parasitismo (UP), conforme metodologia descrita anteriormente.

Após seis dias, as pupas foram peneiradas para a remoção da vermiculita, contabilizadas e colocadas novamente no tubo de acrílico, onde permaneceram até emergência dos insetos.

Foram contabilizados os insetos emergidos, bem como computado o sexo no caso de parasitoides. As pupas intactas foram abertas com auxílio de pinça cirúrgica ponta fina, e os insetos não emergidos foram contabilizados anotando-se o sexo quando se tratava de parasitoides.

Os parâmetros avaliados foram número médio de descendentes, razão sexual, casais que geraram descendentes comparando-os entre os tratamentos.

Análise estatística

Para verificação da ocorrência de protandria em *D. areolatus* foi aplicado o teste Qui-quadrado ($p = 0,05$), comparando proporcionalmente a frequência de machos e fêmeas baseado nos intervalos de duração do período ovo-adulto.

Para observar a influência da idade de machos e fêmeas na reprodução e razão sexual de *D. areolatus* foi realizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ($p = 0,05$). Para as variáveis número de descendentes e número de emergidos foi considerado dados de contagem, utilizando-se a distribuição Poisson e então aplicado MLG (Modelos Lineares Generalizados). Na comparação da razão sexual foi utilizado a transformação do arco seno, conforme descrito por Pimentel-Gomes (2009).

Resultados e Discussão

Machos e fêmeas de *Doryctobracon areolatus* possuem diferentes durações do período ovo-adulto ($gl = 6$; $p < 0,0001$), de maneira que a emergência dos machos ocorre antes da emergência das fêmeas (Figura 1). A maior porcentagem de emergência dos machos (89,5%) ocorreu entre o 19º e 21º dia e para as fêmeas (92,8%) do 21º ao 23º dia (Figura 1).

Esta diferença de dias na emergência de *D. areolatus* caracteriza a protandria do tipo sazonal conforme mencionado por Hirose & Vinson (1988) para a espécie *C. nigriceps*. Esta variação no tempo de emergência está relacionada a vários fatores, podendo ser adaptativo e fisiológico pois ao emergir primeiro, o macho pode alimentar-se e maturar o aparelho reprodutivo para estar apto ao acasalamento por ocasião da emergência das fêmeas (Fagerstrom & Wiklund 1982). Além disto, fatores comportamentais podem

estar envolvidos na seleção, uma vez que machos mais fortes podem competir com outros machos pelo acasalamento e garantir a perpetuação da espécie (Hirose & Vinson 1988, Møller 2004).

A protandria em *D. areolatus* pode ser observada mesmo em diferentes temperaturas, uma vez que existe variação no período ovo-adulto dos insetos devido às exigências térmicas. Mesmo em condições de 18 à 30°C, a sequência de emergência entre machos e fêmeas permanece constante, sendo de aproximadamente 48h (Gonçalves 2016).

Em *Fopius arisanus* (Sonan, 1932) (Hymenoptera: Braconidae), parasitoide de moscas-das-frutas, também ocorre protandria, mesmo em diferentes hospedeiros com ciclo de vida diferente e com variação do período de oferta ovo-larva para o parasitoide, ocorrendo uma sincronização do ciclo do parasitoide em função do hospedeiro, porém, com machos sempre emergindo anterior às fêmeas (Zenil *et al.* 2004). O mesmo ocorre em *D. areolatus* quando submetido a parasitar diferentes instares de *Anastrepha obliqua* (Macquart, 1835) (Diptera: Tephritidae), do qual o parasitoide sincroniza seu desenvolvimento ao ciclo do hospedeiro (Murillo *et al.* 2015)

Outro fator que pode estar relacionado a protandria é o fato de que as fêmeas necessitam de um período maior comparado ao dos machos para o desenvolvimento e maturação do aparelho reprodutor e estarem aptas para a cópula após emergirem (Fagesetrom & Wiklund 1982). Esta teoria parece ser aceita para *D. areolatus* uma vez que as fêmeas ao emergirem são maiores do que os machos. Em média o tamanho da tíbia do primeiro par de pernas e o peso das fêmeas é 13 e 20% maior do que os machos, respectivamente (Gonçalves 2016).

A razão sexual registrada foi crescente e variou de 0 (somente machos) a 1 (somente fêmeas) ao longo do período de emergência, indicando que inicialmente emergem os machos e depois as fêmeas (Figura 2). A razão sexual no final do período de emergência foi de 0,61, indicando haver na população estudada 372 machos e 586 fêmeas, totalizando, 39 % e 61%, respectivamente.

Durante o período em que foi observado ocorrência de parasitismo, ou seja, 36 dias, a progênie de *D. areolatus* demonstra a constância na duração média do período ovo-adulto de machos e fêmeas ao longo deste período. Mantendo um padrão em que machos sempre emergem anterior às fêmeas (Figura 3A), considerando média de emergência de machos e fêmeas, 20,1 e 21,9 dias, respectivamente, sendo quase 48 horas de diferença.

A razão sexual ao longo do mesmo período demonstra existir uma proporção relativa ao longo dos dias de parasitismo, denotando assim que embora exista a protandria, a mesma não tem relação e não interfere na razão sexual diária de parasitismo, assim como também não interfere na razão sexual o envelhecimento da fêmea ao longo dos dias de parasitismo (Figura 3B).

Avaliando a influência da idade do macho e da fêmea na reprodução da espécie ($g= 8$; $p = 0,64$), foi observado nos tratamentos compostos por fêmea de 1 dia, que estes foram os tratamentos que mais originaram descendentes bem como maior proporção de fêmeas (Tabela 1). Diferentemente do que ocorre nos tratamentos compostos por fêmeas de 3 dias que embora tenha um número médio de descendentes consideráveis, são os tratamentos onde as fêmeas possuem o menor índice percentual de geração de fêmeas como descendentes. Onde 84% das fêmeas geraram somente machos como

descendentes, supondo que seja necessário o acasalamento para a geração de fêmeas, desta forma a idade da fêmea poderia interferir na razão sexual. Com exceção do tratamento machos de 1 dia e fêmeas de 3 dias, da qual obtive índices de geração de machos e fêmeas próximos aos de fêmeas de 1 dia.

Desta forma, é possível concluir que o fator idade dos insetos para acasalar pode interferir na geração de descendentes, porém percebe-se que a idade da fêmea influencia mais que a idade do macho, podendo existir a influência de feromônios, dos quais a fêmea pode deixar de emitir ao longo dos dias de vida (McClure et al. 2007).

As combinações com melhores índices na geração de descendentes e de forma proporcional, foram machos de 3 dias e fêmeas de 1 dia, juntamente com machos de 2 dias e fêmeas de 1 dia, comparando aos demais tratamentos (Tabela 1). Sendo que a combinação machos de 2 dias e fêmeas de 1 dia ocorre de forma natural, visto que machos emergem anterior às fêmeas.

De acordo com Ramadam *et al.* (1991) os machos de 1 dia de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead, 1905) (Hymenoptera: Braconidae) acasalam-se com 1 fêmea, machos de 4 dias acasalam com até 4 fêmeas e de 16 dias com até 5 fêmeas. Neste caso, a emergência do macho antes da fêmea, indica que quanto mais velho, maior sua capacidade de acasalar com diversas fêmeas, maximizando assim a possibilidade de perpetuação de descendentes. Sendo assim, a influência em questão estaria sobre a fêmea, visto que os machos permanecendo juntamente com as fêmeas durante o experimento, obtiveram a possibilidade de envelhecer e aumentar sua capacidade de reprodução.

No entanto, na espécie *F. arisanus*, os machos copulam somente após o 4º dia de emergência, visto que precisa de um período para o amadurecimento, sendo que antes desse período não possui espermatozoides (Quimio & Walter 2000). Desta forma pode-se perceber que a idade interfere no acasalamento, assim como também seria uma possível hipótese para a ocorrência de protandria.

No entanto, McClure et al. (2007) relatam que em testes com extratos de feromônios em *Aphidius ervi* (Haliday, 1834) (Hymenoptera: Braconidae), ocorre um declínio na sua produção, possivelmente em função da idade das fêmeas. Evidenciando também que a idade interfere na resposta dos machos pelos extratos, onde mesmo virgens, diminui a receptividade e percepção dos machos, uma vez que a idade da fêmea afeta a produção de feromônios. Neste caso há uma interferência posteriormente no acasalamento, já que dificultaria o encontro de ambos e conseqüentemente a geração de descendentes em uma proporção sexual favorável para as futuras gerações da espécie.

Considerando a utilização de parasitoides, uma importante ferramenta no controle biológico de moscas das frutas como uma alternativa extremamente viável (Walder 2002). Para que o mesmo venha a ser uma ferramenta eficaz, é necessário primeiramente a realização de estudos para o conhecimento dos aspectos biológicos, morfológicos, fisiológicos e comportamentais desses inimigos naturais, de maneira que possamos maximizar uma técnica de criação massal e posteriormente, utilizar em programas de manejo de moscas-das-frutas. Além disso, outro fator importante são as informações preliminares sobre esses insetos, como eficiência em

campo, hospedeiro preferencial e qualidade desses insetos que serão produzidos (Carvalho & Nascimento 2002).

Desta forma, os resultados do trabalho confirmam a ocorrência de protandria sazonal em *D. areolatus*, além de demonstrar a influência da idade na geração de descendentes. Contribuindo assim para ampliar o conhecimento básico sobre a espécie, visto que todos esses estudos de biologia básica são primordiais para estudos futuros e importante para o estabelecimento de um programa de controle biológico.

Agradecimentos

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo. Ao Conselho Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq) e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pelo financiamento da pesquisa.

Referências bibliográficas

- Carvalho ES, Nascimento SS, Mantrangelo WJR (2000) Controle biológico. In: Malavasli A., Zucchi R.A. (ed.) Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado. Holos Editora, Ribeirão Preto.
- Fairbairn DJ, Preziosi RF (1994) Sexual selection and the evolution of allometry for sexual size dimorphism in the water strider, *Aquarius remigis*. *Am Nat*, 144: 101-118.
- Fagerström T, Wiklund C (1982) Why do males emerge before females? Protandry as a mating strategy in male and female butterflies. *Oecologia*, 52: 164-166.

- Forbes AA, Pelz-Stelinski K, Isaacs R (2010) Transfer of life-history phenology from mothers to progeny in a solitary univoltine parasitoid. *Physiol Entomol*, 35: 192-195.
- Gonçalves RS, Nunes AM, Poncio S, Manica-Berto R, Nornberg SD, Grutzmacher AD, Nava DE (2018) Bionomics, thermal requirements and fertility life table of *Doryctobracon areolatus* at several thermal conditions. *Biol Control*, 127:101-108.
- Gonçalves RS (2016) Bioecologia e competição interespecífica de parasitoides (Hymenoptera: Braconidae) de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae). Tese (Doutorado em Fitossanidade). Faculdade de Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, p185.
- Hirose Y, Vinson SB (1998) Protandry in the parasitoid *Cardiochiles nigriceps*, as related to its mating system. *Adv Ecol Res*, 3: 217-226.
- Holloway AK, Heimpel GE, Strand MR, Antolon M.F (1999) Survival of diploid males in *Bracon* sp. near *hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Ann Entomol Soc Am*, 92: 110-116.
- McClure M, Whistlecraft J, McNeil JN (2007) Courtship behavior in relation to the female sex pheromone in the parasitoid, *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae). *J Chem Ecol*, 33: 1946–1959.
- MØller AP (2004) Protandry, sexual selection and climate change. *Glob Change Biol*, 10: 2028-2035.
- Morbey YE (2013) Protandry, sexual size dimorphism, and adaptive growth. *J Theor Biol*, 339: 93-99.
- Moynihan AM, Shuker DM (2011) Sexual selection on male development time in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. *J Evol Biol*, 24: 2002-2013.

- Murillo FD, Cabrera-Mireles H, Barrera JF, Liedo P, Montoya P (2015) *Doryctobracon areolatus* (Hymenoptera, Braconidae) a parasitoid of early developmental stages of *Anastrepha obliqua* (Diptera, Tephritidae). J Hymenopt Res 46: 91–105.
- Nunes AM, Müller FA, Gonçalves RS, Garcia MS, Costa VA, Nava DE (2012) Moscas frugívoras e seus parasitoides nos municípios de Pelotas e Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. Cienc Rural, 42: 6-12.
- Nunes AM, Costa KZ, Faggioni KM, Costa MLZ, Gonçalves RS, Walder, JMM, Garcia MS, Nava DE (2013) Dietas artificiais para a criação de larvas e adultos da mosca-das-frutas sul-americana. Pesq Agropec Bras, 48: 1309-1314.
- Ovruski S, Aluja M (2002) Mating behavior of *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes) (Hymenoptera: Figitidae, Eucoilinae), a fruit fly (Diptera: Tephritidae) larval parasitoid. J Insect Behav, 15: 139-151.
- Paranhos BJ, Nava DE, Malavasi A (2018) Biological control of fruit flies in Brazil. Pesq Agropec Bras. PRELO
- Pimentel–Gomes F (2009) Estatística Experimental. 15.ed. Piracicaba. Universidade de São Paulo: Fealq, 451 p.
- Pompanom F, Fouillet P, Bouletréau M (1995) Emergence rhythms and protandry in relation to daily patterns of locomotor activity in *Trichogramma* species. Evol Ecol, 9: 467-477.
- Quimio GM, Walter GH (2000) Swarming, delayed sexual maturation of males, and mating behavior of *Fopius arisanus* (Sonan) (Hymenoptera: Braconidae). J Insect Behav, 13: 797-813.

- Ramadan MM, Wong TTY, Wong MA (1991) Influence of parasitoid size and age on male mating success of *Opiinae* (Hymenoptera: Braconidae), larval parasitoids of fruit flies (Diptera: Tephritidae). *Biol Control*, 1: 248-255.
- Stuhl C, Sivinski J (2012) Wasp parasitoid *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti) (Insecta: Hymenoptera: Braconidae). Entomology and Nematology Department, UF/IFAS Extension, Gainesville, FL 32611.
- Wajnberg E, Bernstein C, Alphen J (2008) Behavioral ecology of insect parasitoids: from theoretical approaches to field applications. Ed. Blackwell Publishing Ltda.
- Walder JMM (2002) Produção de moscas-das-frutas e seus inimigos naturais: associação de moscas estéreis e controle biológico, In J. R. P. Parra, P. S. M. Botelho, B. S. Corrêa-Ferreira e J. M. S. Bento (eds.), Controle Biológico no Brasil: Parasitóides e Predadores. Editora Manole, Barueri. p. 181-190.
- Wiklund C, Fagerstrom T (1977) Why do males emerge before females? A hypothesis to explain the incidence of protandry in butterflies. *Oecologia*, 31: 153-158.
- Thornhill R, Alcock J (1983) The evolution of insect mating systems. Harvard University Press, 546p.
- Zenil M, Liedo P, Willians T, Vale J, Cancino J, Montoya P (2004) Reproductive biology of *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae) on *Ceratitidis capitata* and *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae). *Biol Control*, 29: 169-178.

Tabela 1 – Influência da idade dos machos e das fêmeas sobre a produção, origem e o número médio de descendentes e razão sexual de *Doryctobracon areolatus*. Temperatura de 25±2°C, umidade relativa do ar de 70±10% e fotofase de 12 horas.

Tratamento	Fêmeas que produziram descendentes (%) [*]	Fêmeas que originaram ambos os sexos (%) ^{**}	Fêmeas que originaram somente machos (%) ^{**}	Média de descendentes	Razão sexual
♂ de 1 dia x ♀ de 1 dia	60	83	17	10,1 ± 4,93 d	0,60 ± 0,13 bc
♂ de 1 dia x ♀ de 2 dias	50	60	40	5,8 ± 3,18 e	0,64 ± 0,10 abc
♂ de 1 dia x ♀ de 3 dias	20	50	50	5,8 ± 1,83 e	0,64 ± 0,09abc
♂ de 2 dias x ♀ de 1 dia	30	66	34	8,1 ± 5,72 de	0,83 ± 0,11 a
♂ de 2 dias x ♀ de 2 dias	40	75	25	1,0 ± 0,52 f	0,40 ± 0,13cd
♂ de 2 dias x ♀ de 3 dias	60	50	50	11,1 ± 4,79 cd	0,38 ± 0,11d
♂ de 3 dias x ♀ de 1 dia	50	100	-	14,9 ± 6,72 a	0,75 ± 0,13a
♂ de 3 dias x ♀ de 2 dias	30	66	34	7,0 ± 5,91 de	0,73 ± 1,14ab
♂ de 3 dias x ♀ de 3 dias	60	16	84	13,3 ± 6,69 bc	0,20 ± 0,07d

* Porcentagem baseada no (n) total do tratamento;

** Porcentagem baseada no (n) de fêmeas que produziram descendentes.

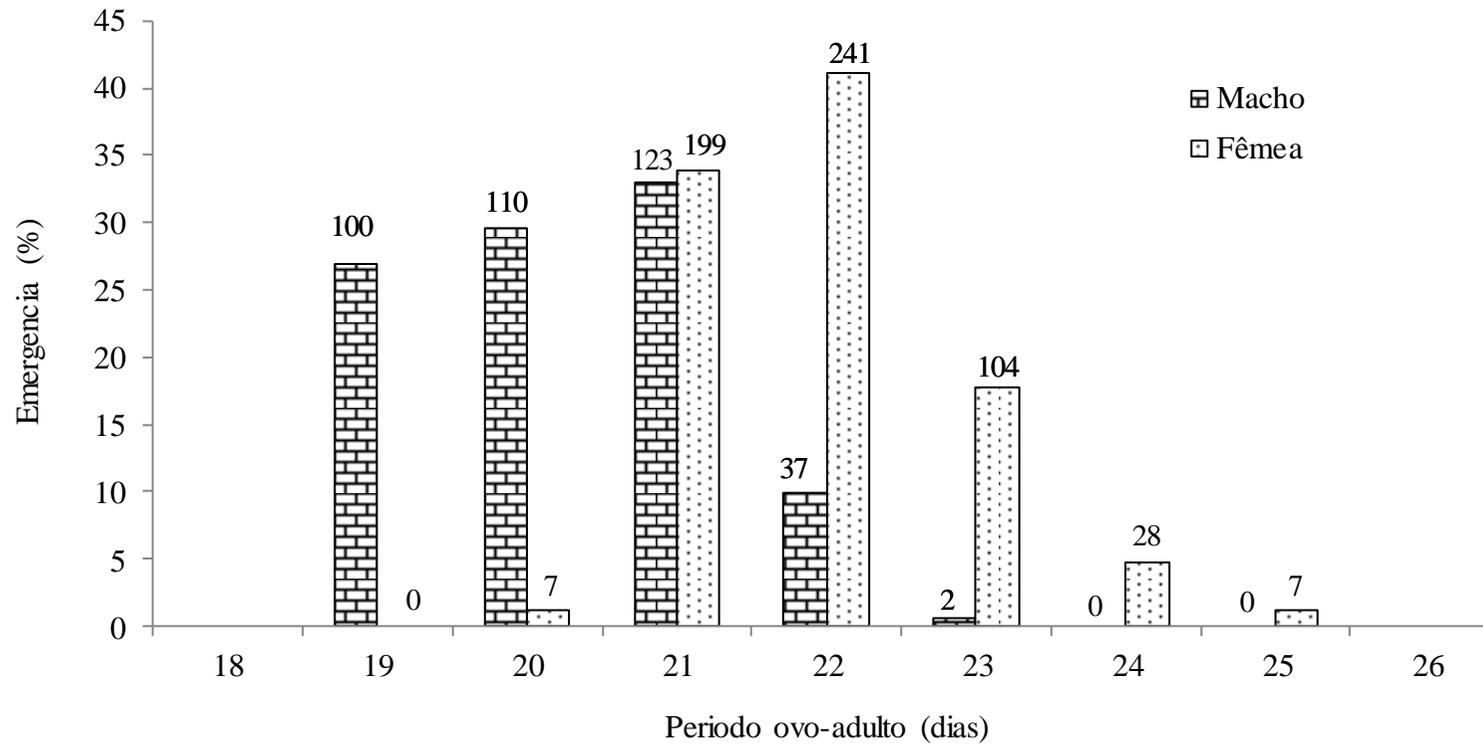


Figura 1 – Ritmo de emergência de machos e fêmeas de *Doryctobracon areolatus*. Temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. Os valores sobre as barras indicam o número de machos e fêmeas emergidos. A porcentagem foi calculada a partir dos totais para cada sexo.

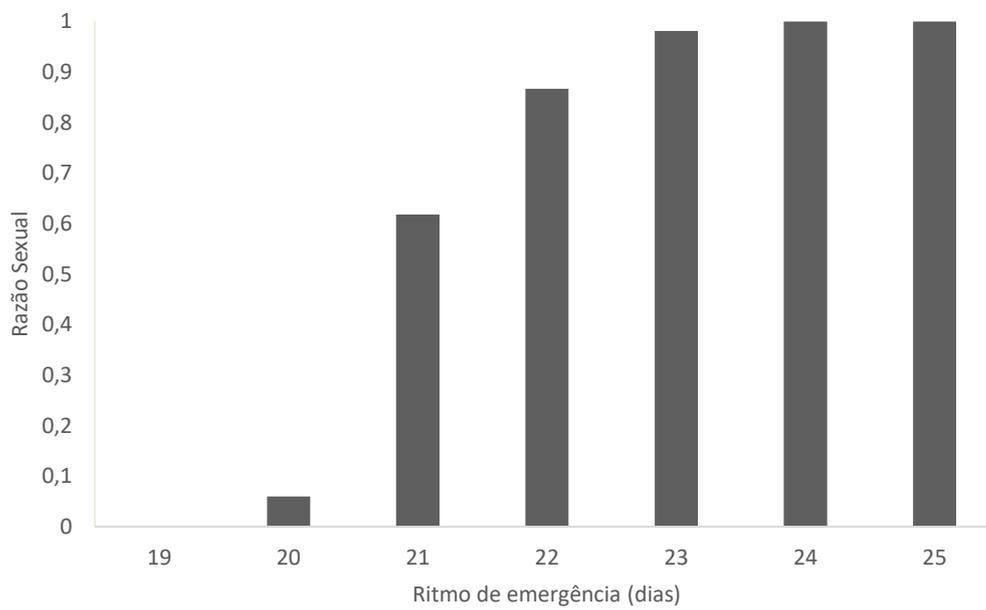


Figura 2 – Sexo da progênie de *Doryctobracon areolatus* por ocasião da avaliação da protandria, relativo a razão sexual. Temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 hora

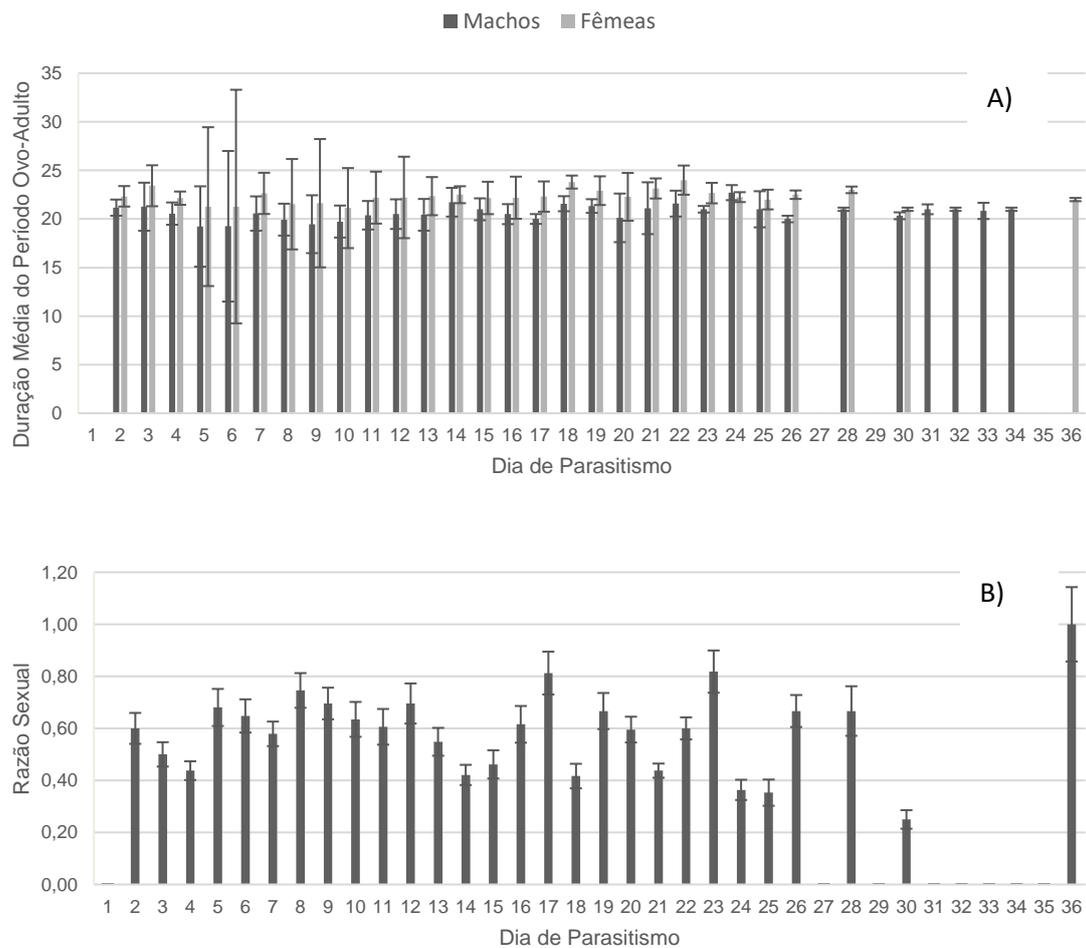


Figura 3 – Progenie de *Doryctobracon areolatus* durante o período de parasitismo. A) Duração média diária do período ovo-adulto de parasitoides (machos e fêmeas). B) Razão sexual diária. Temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

Artigo 2 - Revista Biological Control

**3 Artigo 2 – Comportamento reprodutivo do parasitoide larva-pupa de
mosca-das-frutas *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911)
(Hymenoptera: Braconidae)**

Karina Jobim Pinto¹ Sandro Daniel Nörnberg² Rafael da Silva Gonçalves²
Ricardo Alexandre Valgas² e Dori Edson Nava²

¹ Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Instituto de Biologia,
Universidade Federal de Pelotas, Avenida Eliseu Maciel s/n, 96010-900, Capão
do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Embrapa Clima Temperado, BR 392, KM 78, Caixa Postal 403, CEP 96001-
970, Pelotas, RS. Brasil.

Destaques

- Fêmeas virgens de *Doryctobracon areolatus* só originam machos como descendentes;
- Machos de *Doryctobracon areolatus* exibem comportamento de poliginia e fêmeas de monogamia.
- *Doryctobracon areolatus* não possuem atividade durante período de escotofase.

Resumo

A reprodução dos insetos é responsável pela geração e perpetuação das espécies, envolvendo inúmeras estratégias comportamentais reprodutivas. O objetivo deste trabalho foi conhecer algumas das estratégias do comportamento reprodutivo do parasitoide de moscas-das-frutas *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae), visando um melhor entendimento de sua biologia. Para avaliar a influência da cópula na geração de descendentes foram avaliadas fêmeas virgens e não virgens. Para a determinação da ocorrência de poligamia e monogamia, foram avaliados 15 casais que copularam e em seguida, foram pareados com outro parceiro virgem, observando a duração da cópula. Para verificar a frequência de cópula durante 24h, observou-se 30 casais, sendo 15 machos alimentados previamente e 15 machos alimentados por ocasião do experimento. Fêmeas virgens originam apenas machos, se reproduzindo por partenogênese arrenótoca. Machos de *D. areolatus* possuem comportamento de poliginia e fêmeas monogâmicas. Ocorreu uma redução da 1ª cópula para a 2ª, sendo 23 e 15,6 segundos, respectivamente. Observando a frequência de cópula e

recópula, cerca de 60% dos machos alimentados na hora do experimento não copularam. Dentre os machos alimentados previamente, ocorreram 57 tentativas de cópula, enquanto nos machos alimentados somente na hora do experimento ocorreram 24 tentativas de cópula. A espécie *D. areolatus* não possui atividade de acasalamento durante o período de escotofase. Os resultados aqui apresentados contribuem para um melhor entendimento da biologia reprodutiva da espécie.

Palavras chave: Poligamia, Reprodução, Cópula, Hymenoptera

**Reproductive behavior of the parasitoid parva-pupa of fruit fly
Doryctobracon areolatus (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae)**

Highlights

- Virgin females of *Doryctobracon areolatus* only originate males as descendentes;
- Males of *Doryctobracon areolatus* demonstrate behavior of polygyny and females of monogamy;
- *Doryctobracon areolatus* do not have actividad during period of scotophase.

Abstract

Insect reproduction is responsible for generation and perpetuation of species, involving numerous behavioral reproductive strategies. This work investigated strategies of the reproductive behavior of parasitoids of fruit flies *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae), aiming to better understand its biology. Virgin and non-virgin females were used to evaluate the influence of mating on offspring. To determine the occurrence of polygamy and monogamy, 15 couples that mated were assessed and then were paired with another virgin partner, observing the duration of copulation. For the frequency of mating during 24 hours, 30 couples were observed, being 15 males previously fed and 15 males fed at the time of the experiment. Virgin females generated only males by arrhenótoca parthenogenesis. Males of *D. areolatus* feature a behavior of polygyny, while females display monogamy. The duration of the first and second copulations was 23 and 15.6 seconds, respectively. Roughly 60%

of males fed at the time of the experiment did not mate. Among males previously fed, there were 57 attempts to mate, whereas in males fed only at the time of the experiment, there were 24 attempts for copulation. The species *D. areolatus* has no mating activity during the scotophase. The results contribute to a better understanding of the reproductive biology of the species.

Key words: Polygamy, Reproduction, Copulation, Hymenoptera

1. Introdução

A reprodução dos insetos é responsável pela geração e perpetuação das espécies. Para isto se utilizam de inúmeras estratégias comportamentais relacionados a corte, cópula e oviposição, das quais são únicas para cada espécie (Mayer 1973, Wajnberg et al. 2008, Gullan e Craston 2007).

Alguns parasitoides da ordem Hymenoptera, também podem se reproduzir de forma assexuada, considerando a ocorrência do sistema haplodiploide, que fêmeas são diploides e machos haploides. Assim, para originar fêmeas é necessário que ocorra a cópula (Wajnberg et al. 2008, Forbes et al. 2010, Moynihan e Shuker 2011).

As estratégias de acasalamento em insetos podem ser baseadas no número de cópulas de ambos os sexos durante um determinado período e pelo comportamento exibido junto ao parceiro (Thornhill e Alcock 1983). Fêmeas monogâmicas podem gerar os descendentes utilizando o sêmen de apenas uma cópula, como ocorre com *Cardiochiles nigriceps* Viereck (Vinson 1972) (Hymenoptera: Braconidae) e *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes) (Hymenoptera: Figitidae) (Hirose e Vinson 1988, Ridley 1993, Ovruski e Aluja 2002). Em espécies consideradas poliandricas, as fêmeas copulam com vários machos e podem maximizar sua reprodução, embora os casos de poliandria em fêmeas são considerados raros (Dowell e Horn 1975, Gordh e DeBach 1978, Thornhill e Alcock 1983, Ridley 1993, Reichardt e Wheller 1996, Ovruski e Aluja 2002, Benelli et al. 2012).

O número de acasalamentos, a frequência e a duração das cópulas também podem interferir de forma direta na geração de descendentes, visto que algumas fêmeas podem acasalar, mas a duração da cópula pode ser

insuficiente para que ocorra a transferência do sêmen (Ovruski e Aluja 2002). Desta forma, estas fêmeas podem ser consideradas “pseudo” virgens, pois mesmo realizando cópula, ocorreu de forma incompleta (Mathews 1975).

Esses estudos despertam um interesse pela investigação das estratégias de comportamento reprodutivos exibido pelos parasitoides himenópteros, uma vez que este grupo é utilizado para o controle biológico de insetos-praga. Dentre os himenópteros, destacam-se os parasitoides braconídeos que utilizam como hospedeiros moscas-das-frutas, que ocorrem naturalmente em altas taxas de parasitismo e são utilizados também para o controle biológico aplicado de várias espécies dos gêneros *Ceratitis* e *Anastrepha* (Nunes et al. 2012, Stuhl e Sivinski 2012). Dentre os parasitoides com potencial para controle de mosca-das-frutas do gênero *Anastrepha* destaca-se *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti, 1911) (Hymenoptera: Braconidae) (Paranhos et al. 2018). Este agente de controle biológico é considerado um endoparasitoide larva-pupa com preferência em parasitar larvas de segundo instar e ocorre do México ao norte da Argentina (Stuhl e Sivinski 2012, Paranhos et al. 2018).

Apesar de *D. areolatus* ser frequentemente relatado em levantamentos e com altos índices de parasitismo, no entanto poucos estudos foram realizados sobre biologia reprodutiva e aspectos básicos da espécie. Apenas foram realizados trabalhos relacionados a biologia, técnicas de criação e efeito de fatores abióticos que interferem no seu desenvolvimento (Gonçalves, 2016; Gonçalves et al. 2018). Desta forma, o objetivo do trabalho foi conhecer a biologia reprodutiva e as estratégias do comportamento reprodutivo de *D. areolatus* e sua influência na geração da prole.

2. Material e Métodos

Os experimentos e as criações de *D. areolatus* e *A. fraterculus* foram realizados em salas climatizadas com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas. A manutenção das criações dos insetos foi realizada conforme metodologia proposta por Gonçalves (2016).

2.1. Bioensaios para observação do comportamento reprodutivo

Experimento 1 - O papel da cópula na determinação do sexo da prole

Foram individualizados 200 pupários de *A. fraterculus* previamente parasitados por *D. areolatus*. No momento da emergência dos parasitoides, machos e fêmeas foram separados, transferidos para gaiolas (26,2 x 17,7 x 14,7 cm), sendo alimentados com mel e água disponibilizados em recipientes plásticos através de algodão hidrófilo. Quinze fêmeas com idade de um dia foram individualizadas em gaiolas plásticas (500 mL) e pareadas com machos de dois dias de idade. Após a observação da ocorrência da primeira cópula, os casais foram desfeitos, removendo-se os machos. Um segundo grupo de 15 fêmeas foi individualizado, sendo mantidas isoladas dos machos. Os insetos de ambos os grupos, pareados e virgens, foram alimentados com mel puro disposto em Parafilm® (1 cm²), e água oferecida por capilaridade em roletes de algodão hidrófilo colocados em tubos de vidro (5 ml). Tanto o alimento quanto a água foram substituídos a cada três dias.

Durante o pico de parasitismo entre o quinto e o 12º dia da idade reprodutiva das fêmeas, diariamente foi oferecido uma Unidade de Parasitismo (UP), contendo 30 larvas de segundo instar. A UP foi constituída por uma placa de acrílico (1,7 cm de diâmetro x 0,1 cm de altura) contendo uma mistura de

ágar (0,5 g), polpa de goiaba (45 g) e água destilada (50 mL), onde as 30 larvas foram depositadas. Para contenção das larvas a UP foi envolta com tecido *voile* e borracha de silicone. As larvas foram expostas ao parasitismo por 24 horas, quando então foram substituídas por outras. As larvas expostas ao parasitismo foram transferidas para frascos plásticos (4 cm de diâmetro x 4,5 cm de altura) contendo dieta artificial conforme metodologia de Nunes et al. (2013).

Após o término da fase larval, os insetos foram removidos da dieta artificial, com o auxílio de peneira e água corrente, e transferidos para tubos de acrílico (2,5 cm de diâmetro x 4,5 cm de altura) contendo uma camada de dois cm de vermiculita fina. Após uma semana, os pupários foram removidos da vermiculita e colocados novamente no tubo de acrílico, onde permaneceram até a emergência dos insetos. Os pupários intactos, que não deram origem a adultos de *A. fraterculus* ou parasitoides, foram dissecados com auxílio de pinça cirúrgica de ponta fina, para determinação da presença de parasitoides, os quais foram sexados quando possível. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado e as variáveis resposta mensuradas foram o número de descendentes e a razão sexual.

Experimento 2 - Sistema de acasalamento

Para determinar a ocorrência da monogamia e/ou poligamia em *D. areolatus* foram individualizados 500 pupários de *A. fraterculus* previamente parasitados. Por ocasião da emergência dos parasitoides, machos e fêmeas foram separados e mantidos conforme descrito no experimento 1. Quinze casais (machos com dois dias de vida e fêmeas com até 12h de emergência),

foram formados e mantidos em gaiolas plásticas transparentes (500 mL), e alimentados conforme descrito no experimento 1.

Após a formação dos casais os mesmos foram observados durante 40 minutos. Com a ocorrência da cópula, logo após, os casais foram separados, apresentados à novos parceiros virgens e mantidos com os mesmos por até 40 minutos.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 45 repetições (casais observados). As variáveis mensuradas foram número de cópulas, bem como a duração das mesmas.

Experimento 3 - Impactos da alimentação dos machos na frequência de cópula

Foram individualizados 500 pupários de *A. fraterculus* em eppendorf 2mL. Por ocasião da emergência foram selecionados 30 machos de *D. areolatus*, os quais foram colocados em gaiolas (26,2 x 17,7 x 14,7 cm), sendo disponibilizado, mel e água. Dos 30 machos selecionados, 15 foram alimentados com mel, 24h antes de terem contato com as fêmeas e a outra metade só recebeu alimento quando foram pareados com as fêmeas. Além dos 30 machos, também foram selecionadas 30 fêmeas para formar casais, sendo individualizados em gaiolas confeccionadas com copos plástico (500 mL), com a parte superior retirada e substituída por tecido "voile". Nas gaiolas foi disponibilizado um filete de mel em Parafilm® (1 cm²) com auxílio de uma agulha e água disposta em tubos de vidro (5 mL) com roletes de algodão hidrófilo para que a água fosse disponibilizada por capilaridade.

Os casais foram observados durante 24 h, e para as avaliações durante a escotofase foi utilizada luz vermelha (Lâmpada incandescente - E27

Vermelha / 15W). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos (T1 - casais com machos previamente alimentados e T2 – casais com machos alimentados no momento do pareamento) e 15 repetições por tratamento. As variáveis resposta mensuradas foram a ocorrência de cópula consumada, a tentativa de cópula (quando não aceito por um dos sexos) e o horário das cópulas. Além disso, determinou-se o percentual de casais que copularam.

2.2. Análise estatística

Para determinar a influência da cópula na geração de descendentes de *D. areolatus*, foram considerados dois tratamentos (fêmeas acasaladas e fêmeas virgens), ambos com 15 repetições. A razão sexual foi determinada utilizando-se a transformação do arco seno, conforme descrito por Pimentel–Gomes (2009). Para a comparação do número de descendentes, utilizou-se a distribuição Poisson e em seguida aplicado MLG (Modelos Lineares Generalizados), por meio do procedimento GENMOD do SAS® (SAS 9.2 Institute 2002).

Na tentativa de determinar a ocorrência do comportamento de poligamia na espécie, para a comparação de médias do tempo de duração da primeira para a segunda cópula, utilizou-se teste t ($p = 0,05$). Para avaliar a diferença entre os machos e fêmeas que acasalaram uma segunda vez, utilizou-se teste de proporção a 95% de confiança. Para a frequência de cópula e tentativas, utilizou-se a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis ($p = 0,05$).

3. Resultados

Experimento 1 - O papel da cópula na determinação do sexo dos descendentes

Fêmeas de *D. areolatus* que copularam originaram descendentes de ambos os sexos (razão sexual de 0,63), enquanto as fêmeas que não copularam geraram somente machos (razão sexual de 0), caracterizando a reprodução partenogenética arrenótoca.

Para a variável número de descendentes foram observadas diferenças significativas entre as fêmeas já copuladas e fêmeas virgens ($gl = 1$, $p < 0,0001$), com valores médios totais de 30,4 e 14,0 descendentes, respectivamente (Figura 1A). O número total de descendentes das fêmeas acasaladas foi superior, sendo 2,57 vezes maior que em fêmeas virgens (Figura 1B).

Experimento 2 - Sistema de acasalamento

Observou-se que 40% dos machos de *D. areolatus* copularam com uma segunda fêmea (Figura 2 A), enquanto todas fêmeas (100%) copularam somente com o primeiro parceiro (Figura 2 B). Portanto, verificou-se que machos são poligâmicos exibindo comportamento de poliginia e fêmeas monogâmicas. No que diz respeito a duração das cópulas, não foram observadas diferenças significativas tanto para a duração da primeira quanto da segunda cópula ($T = 1,33$; $p = 0,203$). No entanto, cabe ressaltar que a duração da primeira cópula foi numericamente maior (23 segundos) do que a segunda (15,6 segundos) (Figura 3).

Experimento 3 - Impactos da alimentação dos machos na frequência de cópula

Comparando-se a frequência média de tentativas de cópulas para machos alimentados previamente e de machos alimentados por ocasião do experimento, observou-se que dentre os três intervalos de avaliação pré-determinados, somente no primeiro intervalo ocorreu diferença significativa 8h30 às 11h30 ($\chi^2 = 7,822$; gl = 1; p = 0,005). Nos demais intervalos, não foram observadas diferenças significativas dessa frequência 11h31 a 14h30 ($\chi^2 = 0,724$; gl = 1; p = 0,394) e das 14:h31 a 17h30 ($\chi^2 = 1,251$; gl = 1; p = 0,263).

As cópulas de *D. areolatus* ocorreram somente durante a fotofase correspondendo ao intervalo das 8h30 a 17h30, não sendo observada a ocorrência de cópula e de outras atividades (caminhamento, voo, alimentação etc) durante o período de escotofase. Nos casais em que os machos foram alimentados previamente ao acasalamento ocorreram 67,4% das cópulas e recópulas, totalizando 31 eventos, enquanto para os machos alimentados somente por ocasião do experimento obteve-se 32,6% de cópulas e recópulas, totalizando apenas 15 eventos (Figura 4). Em relação às tentativas de cópulas, quando os machos foram alimentados 24 horas antes do experimento e de machos alimentados durante o experimento, foi de 57 e 24 tentativas de cópula, respectivamente (Figura 5A).

Dentre os machos alimentados previamente, apenas 6,7% (n=1) não tentaram copular, enquanto que para os machos não alimentados previamente, esse índice foi de 33,3% (n=5). Dentre os casais que tiveram mais de quatro tentativas de cópula, observou-se uma maior porcentagem para os alimentados previamente (46,7%; n=7) em relação aos machos alimentados somente por ocasião do pareamento (6,7%; n=1).

Em machos alimentados antes do experimento ocorreu no máximo oito cópulas (n=1) enquanto nos machos alimentado somente por ocasião do experimento esse número foi de sete cópulas (n=1). Sendo que 53,3% (n=8) dos casais onde machos foram alimentados previamente copularam por mais de 1 vez, enquanto em machos alimentados somente por ocasião do experimento, apenas 26,7% (n=4) copularam mais de uma vez e 60% (n=9) desses não copularam (Figura 5B).

4. Discussão

A partenogênese arrenótoca é um comportamento frequente em himenópteros e para parasitoides de moscas-das-frutas, ocorrendo na espécie nativa do parasitoide *D. areolatus* e também sendo relatado na espécie *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes) (Hymenoptera: Figitidae) (Ovruski e Aluja 2002). Em ambos os casos, fêmeas virgens só geraram descendentes machos, diferentemente do que ocorre com as fêmeas que copularam, as quais geram machos e fêmeas. Sendo o acasalamento importante para o número de descendentes gerados e razão sexual da espécie (Wajnberg et al. 2008, Forbes et al. 2010, Moynihan e Shuker 2011).

Desta forma, pode-se supor que provavelmente, as fêmeas sejam diploides e os machos haploides, de forma que, os ovos não fertilizados originam machos e os fertilizados originam fêmeas, conforme comprovado por avaliação citogenética na espécie *Chelonus insularis* Cresson 1865 (Hymenoptera: Braconidae) (Silva Junior et al. 2000).

Em diversas espécies, a fidelidade ao parceiro se faz presente, assim como ocorre em fêmeas de *D. areolatus*, que são monogâmicas acasalando

com um único macho, porém com múltiplas cópulas. Este último comportamento difere daquele apresentado por fêmeas de *A. pelleranoi*, as quais também são monogâmicas, porém não aceitam uma segunda cópula (Ovruski e Aluja 2002). Ainda assim, de acordo com Reichardt e Wheller (1996) em espécies poliândricas, existe a necessidade de múltiplas cópulas para maximizar a reprodução. No entanto, embora fêmeas de *D. areolatus* realizem múltiplas cópulas não poderiam ser consideradas como poliândricas visto que as recópulas ocorrem com mesmo parceiro. Fêmeas de *Chelonus insularis* (Cresson, 1863) (Hymenoptera: Braconidae) são um exemplo de espécie com múltiplas cópulas, podendo chegar a sete cópulas num intervalo de 1h (Rezende et al. 1995). Porém é considerado raro os casos em que as fêmeas de parasitoides acasalam mais de uma vez (Gordh e DeBach 1978; Benelli et al. 2012).

Assim como a frequência de cópula, a duração das mesmas também é importante ser considerada, conforme Ovruski e Aluja (2002) a duração da mesma pode interferir na efetivação da cópula, ou seja, se faz necessário o macho ter tempo suficiente para conseguir depositar o líquido seminal na fêmea. Tal situação é caracterizada por Mathews (1975) como “pseudo virgens”, fenômeno que pode ser comprovado facilmente através de descendentes originados, onde a razão sexual deve ser maior que zero.

Além disso, também é importante conhecer o período de ocorrência de cópulas ou horário mais propício para ocorrência das mesmas, informação complementar para o conhecimento básico das espécies. Os dados deste trabalho para *D. areolatus*, concordam Benelli et al. (2012), no qual sugerem que na espécie de parasitoide de moscas-das-frutas *Psytalia concolor*

(Szépligeti) (Hymenoptera: Braconidae), também apresentando preferência por cópulas durante o período da manhã, embora aqui, não tenha sido considerado o período de escotofase. Diferentemente do que foi verificado em *D. areolatus*, que apresentou estado de inércia durante a escotofase, podendo ser considerado um parasitoide de hábitos diurnos.

Um fator primordial para a sobrevivência dos parasitoides, está relacionado a alimentação dos mesmos, em que estudos sugerem que a nutrição é importante para a sobrevivência e reprodução dos mesmos. Em machos de *D. longicaudata*, o alimento se faz fundamental principalmente para a sobrevivência do inseto, onde machos mal alimentados, reduz sua capacidade reprodutiva e conseqüentemente as fêmeas se reproduzem por partenogênese, gerando somente machos como descendentes, causando um desequilíbrio da razão sexual da geração seguinte (Sivinski et al. 2006). No parasitoide *F. arisanus*, os machos só se tornam férteis após o 4º dia de idade, despertando hipóteses com relação a necessidade de alimentação para a maturação do aparelho reprodutor e possível relação com ocorrência de protandria na espécie (Quimio e Walter 2000).

Tal fato pode explicar o porquê da ocorrência da protandria de *D. areolatus*, visto que machos alimentados anteriormente obtiveram número de cópulas efetivas e tentativas de cópulas superiores aos demais machos. Moller (2004) considera tal fato sendo de seleção sexual, pois machos mais fortes teriam mais chances de vencer uma disputa para acasalar e assim perpetuar seus descendentes. Neste caso, a alimentação é essencial para a realização da cópula, ou seja, na natureza provavelmente *D. areolatus* irá se alimentar e só após gastará energia para realizar a cópula.

Todas as informações obtidas neste trabalho contribuem para o avanço do conhecimento da biologia reprodutiva de *D. areolatus*, visto que o mesmo apresenta grande importância para ser usado em programas de controle biológico. Num primeiro momento o estudo possibilita melhor entendimento da biologia básica da espécie, podendo também auxiliar no estabelecimento de outros estudos relacionados a competição com outros parasitoides, o comportamento de forrageamento em ambientes naturais e mesmo questões relacionadas a liberação do parasitoide em campo.

5. Referências Bibliográficas

- Benelli G., Bonsignori G., Stefanini C., Canale A., 2012. Courtship and mating behavior in the fruit fly parasitoid *Psytalia concolor* (Szépliget) (Hymenoptera: Braconidae): the role wing fanning. *J Pest Sci*, 85:55-63.
- Forbes A.A, Pelz-Stelinski K., Isaacs R., 2010. Transfer of life-history phenology from mothers to progeny in a solitary univoltine parasitoid. *Physiol Entomol*, 35: 192-195.
- Gonçalves R.S., Nunes A.M., Poncio S., Manica-Berto R., Nornberg S.D., Grutzmacher A.D., Nava D.E., 2018. Bionomics, thermal requirements and fertility life table of *Doryctobracon areolatus* at several thermal conditions. *Biol Control*.
- Gonçalves R.S., 2016. Bioecologia e competição interespecífica de parasitoides (Hymenoptera: Braconidae) de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae). Tese (Doutorado em Fitossanidade). Faculdade de Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, p185.
- Gordh G., DeBach P., 1978. Courtship behavior in the *Aphytis lingnanensis*

group, its potential usefulness in taxonomy, and a review of sexual behaviour in the parasitic Hymenoptera (Chalcidoidea: Aphelinidae). *Hilgardia*, 46: 37 - 75.

Gullan P.J., Craston P.S., 2007. *Os insetos: um resumo de entomologia*. São Paulo, Roca, 440p.

Hirose Y., Vinson S.B., 1998. Protandry in the parasitoid *Cardiochiles nigriceps*, as related to its mating system. *Adv Ecol Res*, 3: 217-226.

Matthews R.W., 1975. Courtship in parasitic wasps. In Price P.W. (ed), *Evolutionary strategies of parasitic insects and mites*. Plenum Press, New York, pp. 66-86.

Mayer E., 1973. *Populations, species and evolution*. Massachusetts, Harvard University Press, 485p.

MØller A.P., 2004. Protandry, sexual selection and climate change. *Glob Change Biol*, 10: 2028-2035.

Morbey Y.E., Coppack T., Pulido F., 2012. Adaptive hypotheses for protandry in arrival to breeding areas: a review of models and empirical tests. *J ornithol*, 153: 207-2015.

Moynihan A.M., Shuker D.M., 2011. Sexual selection on male development time in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. *J Evol Biol*, 24: 2002-2013.

Nunes A.M., Müller F.A., Gonçalves R.S., Garcia M.S., Costa V.A., Nava D.E., 2012. Moscas frugívoras e seus parasitoides nos municípios de Pelotas e Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc Rural*, 42: 6-12.

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., 2013. Dietas artificiais para a criação de

- larvas e adultos da mosca-das-frutas sul-americana. *Pesq Agropec Bras*, 48: 1309-1314.
- Ovruski S., Aluja M., 2002. Mating behavior of *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes) (Hymenoptera: Figitidae, Eucoilinae), a fruit fly (Diptera: Tephritidae) larval parasitoid. *J Insect Behav*, 15: 139-151.
- Paranhos B.J., Nava D.E., Malavasi A., 2018. Biological control of fruit flies in Brazil. *Pesq Agropec Bras*.
- Pimentel–Gomes F., 2009. *Estatística Experimental*. 15.ed. Piracicaba. Universidade de São Paulo: Fealq, 451 p.
- Quimio G.M, Walter G.H., 2000. Swarming, delayed sexual maturation of males, and mating behavior of *Fopius arisanus* (Sonan) (Hymenoptera: Braconidae). *J Insect Behav*, 13: 797-813.
- Reichardt A.K., Wheeler D.E., 1996. Multiple mating in the ant *Acromyrmex versicolor*: a case of female control. *Behav Ecol Sociobiol*, 38: 219-225.
- Ridley M., 1993. A sib competitive relation between clutch size and mating frequency in parasitic Hymenoptera. *Am Nat*, 142: 893 - 910.
- SAS INSTITUTE. SAS System – SAS/STAT. computer program, version 9.2. By SAS Institute, Cary, NC, 2002.
- Silva-Junior J.C., Pompolo S.G., Campos L.A.O., Cruz I., 2000. The karyotype of the parasitoid *Chelonus insularis* Cresson (Hymenoptera: Braconidae, Cheloninae). *Rev Brasil Biol*, 60: 337- 339.
- Sivinski J., Aluja M., Holler T., 2006. Food sources for adult *Diachasmimorpha longicaudata*, a parasitoid of tephritid fruit flies: effects on longevity and fecundity. *Entomol Exp Appl*, 118:193–202.

- Stuhl C., Sivinski J., 2012. Wasp parasitoid *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti) (Insecta: Hymenoptera: Braconidae). Entomology and Nematology Department, UF/IFAS Extension, Gainesville, FL 32611.
- Torres-Vila L.M., 2013. Polyandry-fecundity relationship in insects: methodological and conceptual problems. *J Evol Biol*, 26: 325 - 334.
- Thornhill .R, Alcock J., 1983. The evolution of insect mating systems. Harvard University Press, 546p.
- Wajnberg E., Bernstein C., Alphen J., 2008. Behavioral ecology of insect parasitoids: from theoretical approaches to field applications. Ed. Blackwell Publishing Ltd.

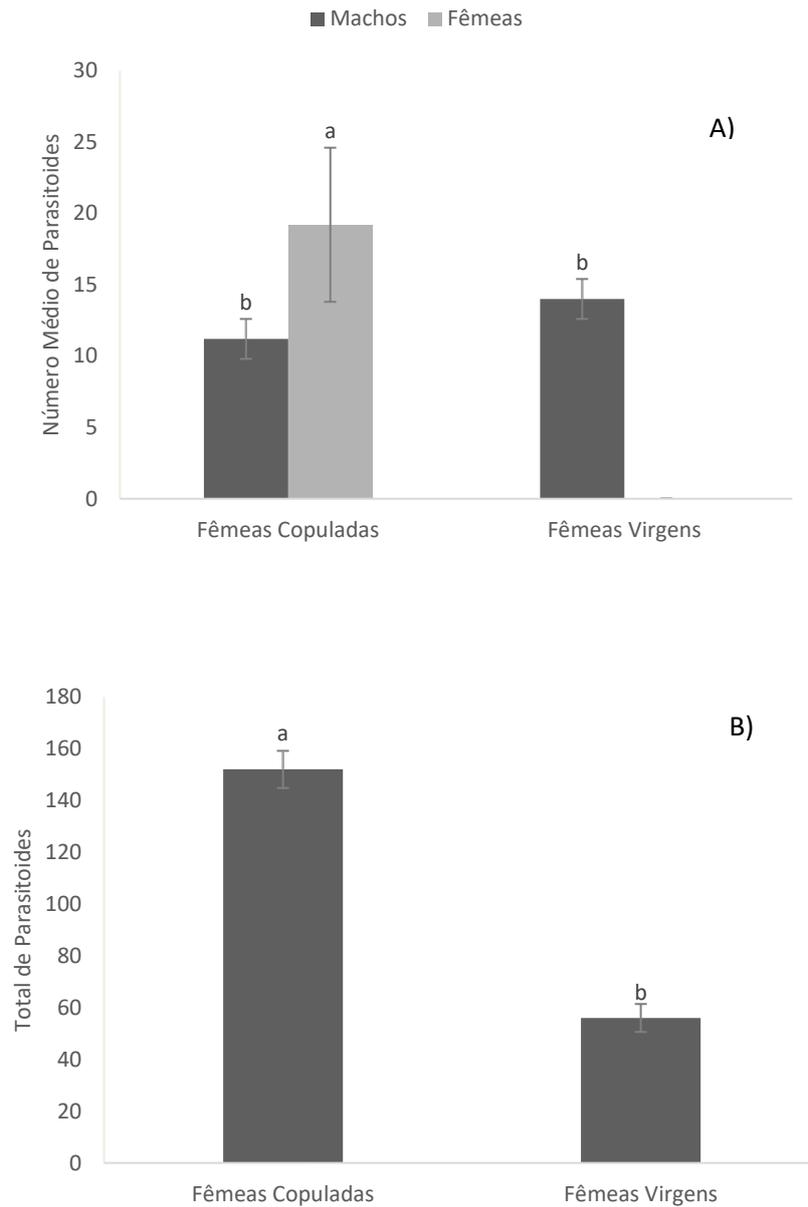


Figura 1 – Influência da cópula de *Doryctobracon areolatus* sobre a produção de descendentes. A) Número médio de machos e fêmeas. B) Total de parasitoides. Temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

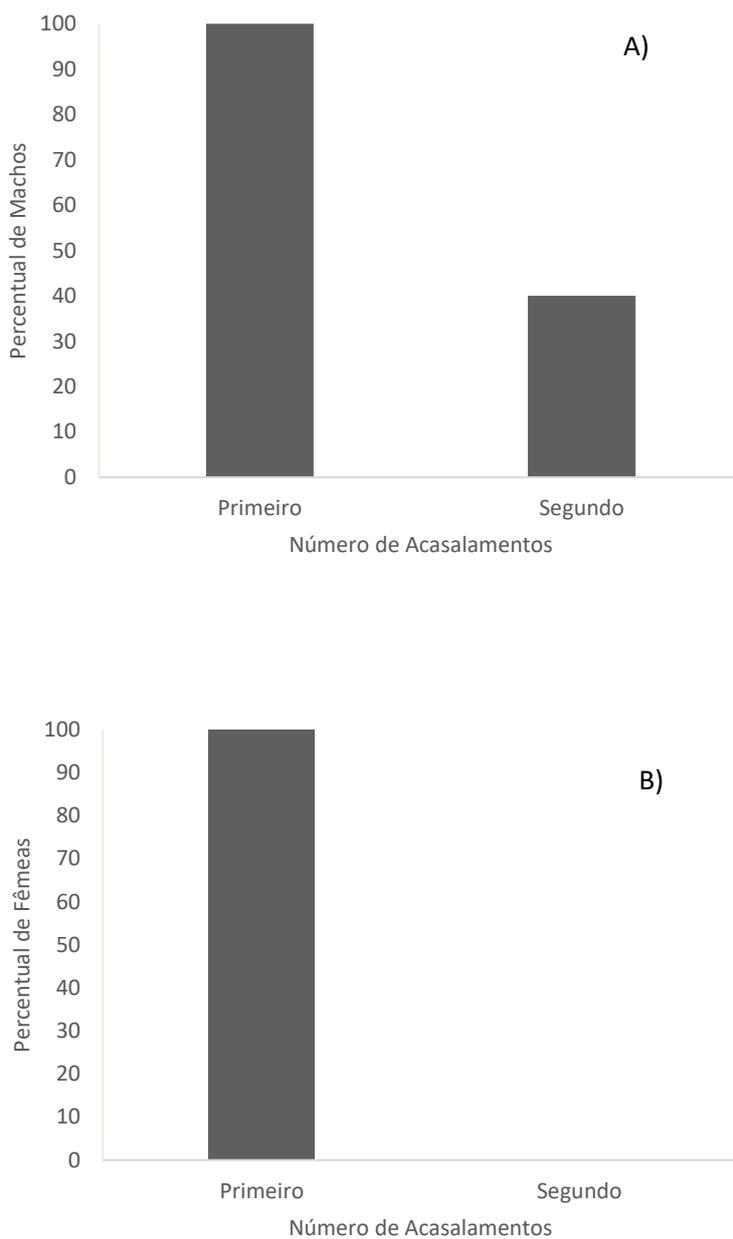


Figura 2 – Ocorrência de segunda cópula em *Doryctobracon areolatus*, quando expostos à novos parceiros virgens. A) Percentual de machos que acasalaram na primeira e na segunda cópula; B) Percentual de fêmeas que acasalaram na primeira e segunda cópula. Temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

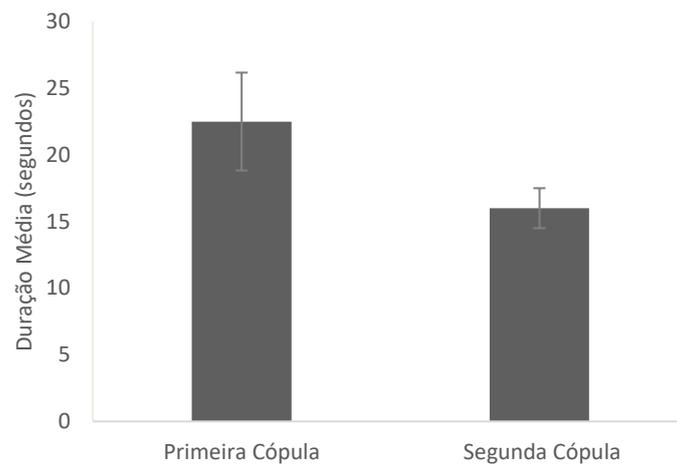


Figura 3 – Duração média da cópula do primeiro e do segundo acasalamento de *Doryctobracon areolatus*. Barras menores representam o erro padrão. Temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

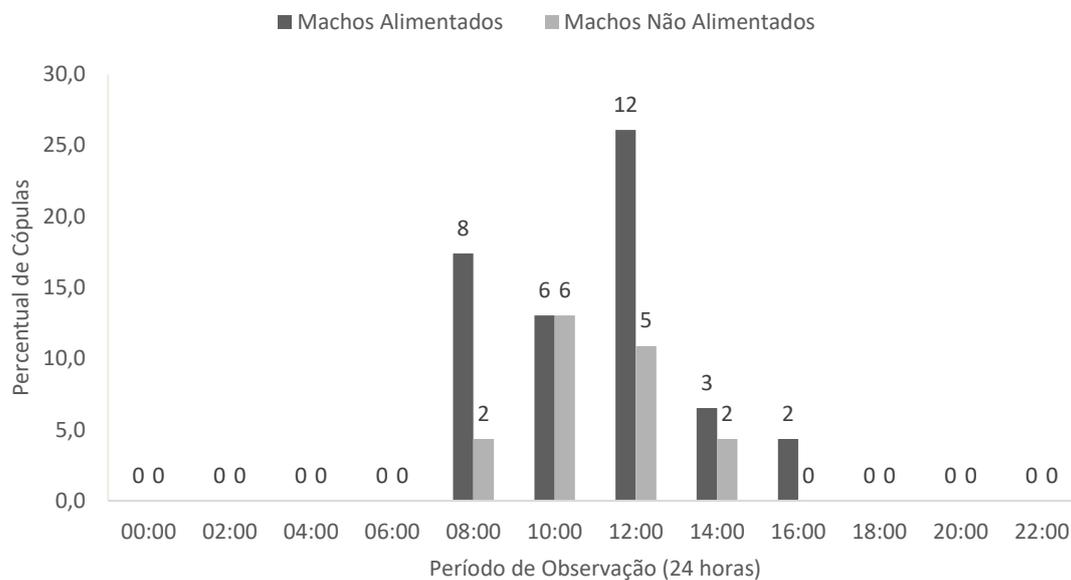


Figura 4 – Ritmo de cópulas e recópulas de *Doryctobracon areolatus* ao longo do dia. Machos alimentados previamente a formação do casal. Machos alimentados por ocasião da formação do casal. Sobre as barras o valor absoluto de cópulas. Temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

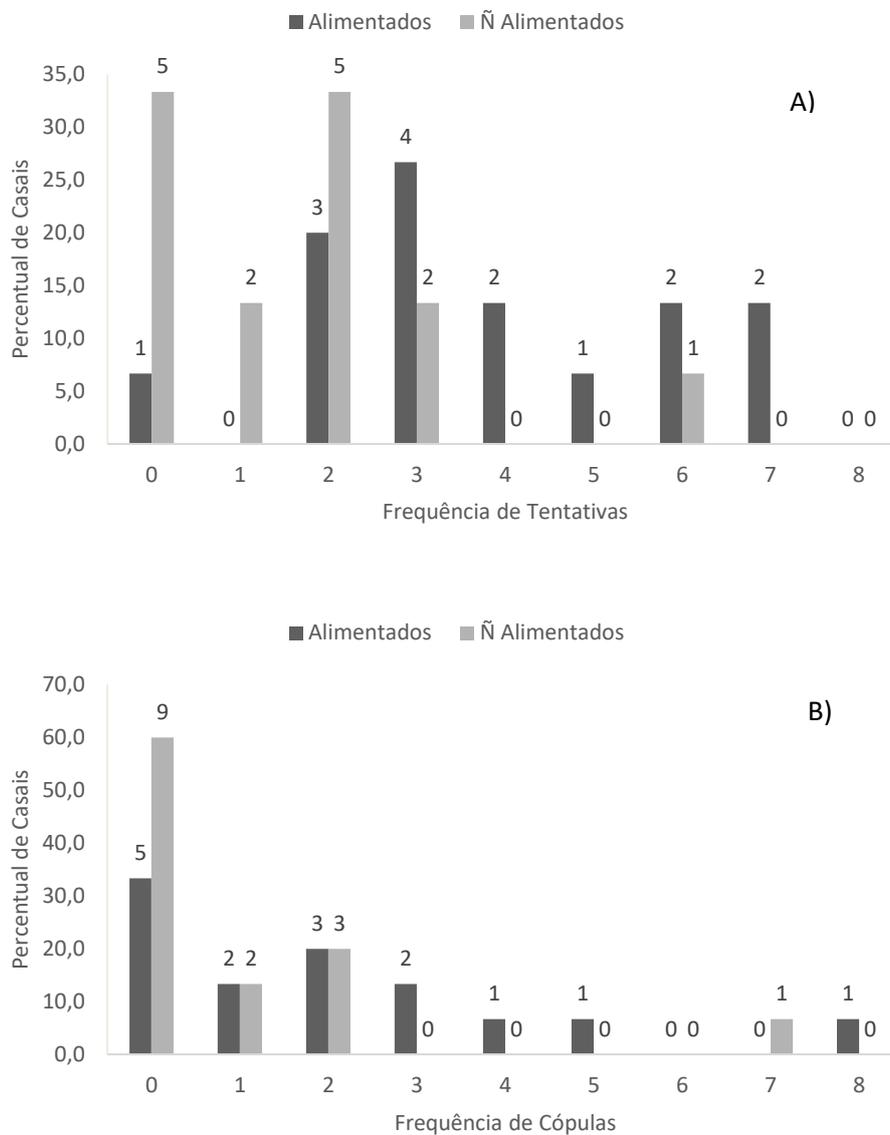


Figura 5 – Frequência de tentativas de cópulas e cópulas efetivas de *Doryctobracon areolatus* ao longo das 24h de observação para casais onde os machos foram alimento antes e durante o acasalamento. A) Tentativas de cópulas; e B) Cópulas efetivas. Sobre as barras, o valor absoluto. Temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

4 Conclusão

Existe a ocorrência de protandria sazonal na espécie de *Doryctobracon areolatus*;

A melhor combinação de idade para acasalamento, ocorre com machos de três dias e fêmeas de um dia, e machos de dois dias com fêmeas de um dia (condição natural da espécie);

Fêmeas virgens originarão somente descendentes machos;

Machos de *D. areolatus* exibem comportamento de poliginia e fêmeas são monogâmicas;

O horário propício para cópulas é entre as 8h às 12h, período correspondente a fotofase;

Não existe atividades de cópula durante o período de escotofase.

5 Referências

BENELLI G.; BONSIGNORI G.; STEFANINI C.; CANALE A. Courtship and mating behavior in the fruit fly parasitoid *Psyttalia concolor* (Szépligeti) (Hymenoptera: Braconidae): The role wing fanning. **Journal of Pest Science**, v. 85, p. 55-63, 2012.

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

DOSSI, F.A.C.; CONSOLI, F.L. Desenvolvimento ovariano e influência da cópula na maturação dos ovários de *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllide). **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 3, p. 414-419, 2010.

DOWELL, R.V.; HORN, D.J. Mating behavior of *Bathyplectes curculionis* (Hym: Icheumonidae) parasitoid of the alfafa weevil (Col.: Curculionidae). **Entomophaga**, v. 20, p. 271-273, 1975.

FAGERSTRON, T.; WIKLUND, C. Why do males emerge before females? protandry as a mating strategy in male and female butterflies. **Oecologia**, v. 52, p. 164-166, 1982.

FAIRBAIM, D.J.; PREZIOSI, R.F. Sexual selection and the evolution of allometry for sexual size dimorphism in the water strider, *Aquarius remigis*. **American Naturalist**, v.144, p. 101-118, 1994.

FLANDERS, S. E. Regulation of ovulation and eggs disposal in the parasitic Hymenoptera. **Canadian Entomologist**, v. 82, p. 134-140, 1950. DOI: 10.4039/Ent82134-6.

FORBES, A.A.; PELZ-STELINSKI, K.; ISAACS, R. Transfer of life-history phenology from mothers to progeny in a solitary univoltine parasitoid. **Physiological Entomology**, v. 35, p. 192-195, 2010.

GILLOTT, C. Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. **Annual Review of Entomology**, v. 48, p. 163-184, 2003.

GONÇALVES R.S.; NUNES A.M.; PONCIO S.; MANICA-BERTO R.; NORBERG S.D.; GRUTZMACHER A.D.; NAVA D.E. Bionomics, thermal requirements and fertility life table of *Doryctobracon areolatus* at several thermal conditions. **Biological Control**, v. 127, p. 101-108, 2018.

GONÇALVES, R.S. **Bioecologia e competição interespecífica de parasitoides (Hymenoptera: Braconidae) de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae)**. 2016. 185f. Tese (Doutorado em Fitossanidade). Faculdade de Agronomia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

GORDH G.; DEBACH P. Courtship behavior in the *Aphytis lingnanensis* group, its potential usefulness in taxonomy, and a review of sexual behaviour in the parasitic Hymenoptera (Chalcidoidea: Aphelinidae). **Hilgardia**, v. 46, p. 37-75, 1978.

GULLAN P.J.; CRASTON P.S. **Os insetos: um resumo de entomologia**. São Paulo, Roca, 2007. 440p.

HEIMPEL, G.E; ROSENHEIM, J.A. Egg limitation in parasitoids: A review of the evidence and a case study. **Biological Control**, v. 11, p. 160-168, 1998.

HIROSE, Y.; VINSON, S.B. Protandry in the parasitoid *Cardiochiles nigriceps*, as related to its mating system. **Ecological Research**, v. 3, p. 217-226, 1998.

JERVIS, M.A.; HEIMPEL, G.E.; FERNS, P.N. Life history strategies in parasitoid wasps: a comparative analysis of ovigeny. **Journal Animalia Ecology**, v. 70, p. 442-458, 2001.

MATTHEWS R.W. Courtship in parasitic wasps. In Price P.W. (ed), **Evolutionary strategies of parasitic insects and mites**. New York: Plenum Press, 1975. p. 66-86.

MAYER, E. **Populations, species and evolution**. Massachusetts, Harvard University Press, 1973. 485p.

MØLLER, A.P. Protandry, sexual selection and climate change. **Global Change Biology**, v. 10, p. 2028-2035, 2004.

MORBEY, Y.E.; COPPACK, T.; PULIDO, F. Adaptive hypotheses for protandry in arrival to breeding areas: a review of models and empirical tests. **Journal of Ornithology**, v. 153, p. 207-215, 2012.

MOYNIHAN, A.M.; SHUKER, D.M. Sexual selection on male development time in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 24, p. 2002-2013, 2011.

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

OVRUSKI, S.; ALUJA, M. Mating behavior of *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes) (Hymenoptera: Figitidae, Eucoilinae), a fruit fly (Diptera: Tephritidae) larval parasitoid. **Journal of Insect Behavior**, v. 15, p. 139-151, 2002.

PAPAJ, D.R. Ovarian dynamics and host use. **Annual Review of Entomology**, v. 45, p. 423-448, 2000.

PARKER, G.A.; COURTNEY, S.P. Models of clutch size in insect oviposition. **Theoretical Population Biology**, v. 26, p. 27-48, 1984.

POMPANOM, F.; FOUILLET, P.; BOULETRÉAU, M. Emergence rhythms and protandry in relation to daily patterns of locomotor activity in *Trichogramma* species. **Evolutionary Ecology**, v. 9, p. 467- 477, 1995.

PRICE, P.W. Reproductive strategies in parasitoid wasps. **American Naturalist**, v. 107, p. 684-693, 1973.

REZENDE, M.A.A.; DELLA LUCIA, T.M.C.; CRUZ, I.; VILELA, E.F. Comportamento de corte, acasalamento e postura de *Chelonus insularis* (Hymenoptera: Braconidae) em ovos de *Spodoptera frugiperda*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 55, p. 555-558, 1995.

RIDLEY M. A sib competitive relation between clutch size and mating frequency in parasitic Hymenoptera. **American Naturalist**, v. 142, p. 893-910, 1993.

RIVERO, A.; GIRON, A.; CASAS, J. Life time allocation of juvenile and adult nutritional resources to egg production in holometabolous insect. **Royal Society of London**, v. 266, p. 1169-1174, 2001.

RIVERO, A.; WEST, S.A. The cost and benefits of host feeding in parasitoids. **Animal Behaviour**, v. 74, p. 1163-1169, 2005.

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.; SIVINSKI, J. **Wasp parasitoid *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti) (Insecta: Hymenoptera: Braconidae)**. Entomology and Nematology Department, UF/IFAS Extension, Gainesville, FL 32611, 2012.

THORNHILL, R.; ALCOCK, J. **The evolution of insect mating systems**. Harvard University Press, 1983. 546p

WAJNBERG, E.; BERNSTEIN, C.; ALPHEN, J. **Behavioral ecology of insect parasitoids: from theoretical approaches to field applications**. Ed. Blackwell Publishing Ltd, 2008.

WEELER, D. The role of nourishment in oogenesis. **Annual Review of Entomology**, v. 41, p. 407-431, 1996.

WIKLUND, C.; FAGERSTROM, T. Why do males emerge before females? A hypothesis to explain the incidence of protandry in butterflies. **Oecologia**, v. 31, p. 153-158, 1977.