



**MARIANA MACEDO DE SOUZA**

**IMPACTOS DE *Heterorhabditis amazonensis* GL NO  
PARASITISMO DE *Diachasmimorpha longicaudata*  
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE) NO CONTROLE DE  
*Ceratitis capitata* (DIPTERA: TEPHRITIDAE)**

**LAVRAS-MG  
2024**

**MARIANA MACEDO DE SOUZA**

**IMPACTOS DE *Heterorhabditis amazonensis* GL NO PARASITISMO DE  
*Diachasmimorpha longicaudata* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE): ESTRATÉGIAS  
PARA MINIMIZAR INTERAÇÕES ADVERSAS NO CONTROLE DE *Ceratitis*  
*capitata* (DIPTERA: TEPHRITIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Entomologia, área de concentração em  
Entomologia, para a obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Alcides Moino Junior

Orientador

**LAVRAS-MG  
2024**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Souza, Mariana Macedo de.

Impactos de *Heterorhabditis amazonensis* GL no parasitismo de *Diachasmimorphalongicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) no controle de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) / Mariana Macedo de Souza. - 2024.

109 p. : il.

Orientador(a): Alcides Moino Junior.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.  
Bibliografia.

1. Moscas-das-frutas. 2. Controle biológico. 3. Interação entre agentes de biocontrole. I. Moino Junior, Alcides. II. Título.

**MARIANA MACEDO DE SOUZA**

**IMPACTOS DE *Heterorhabditis amazonensis* GL NO PARASITISMO DE *Diachasmimorpha longicaudata* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE): ESTRATÉGIAS PARA MINIMIZAR INTERAÇÕES ADVERSAS NO CONTROLE DE *Ceratitis capitata* (DIPTERA: TEPHRITIDAE)**

**IMPACTS OF *Heterorhabditis amazonensis* GL ON PARASITISM OF *Diachasmimorpha longicaudata* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE): STRATEGIES TO MINIMIZE ADVERSE INTERACTIONS IN THE CONTROL OF *Ceratitis capitata* (DIPTERA: TEPHRITIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, área de concentração em Entomologia, para a obtenção do título de Doutora.

Aprovado em: 28 de março de 2024.

Dr. Alcides Moino Junior UFLA

Dr. Khalid Haddi UFLA

Dr. Luis Claudio Paterno Silveira UFLA

Dra. Cristiane Rohde UTFPR

Dr. Luis Francisco Angeli Alves UNIOESTE

Prof. Dr. Alcides Moino Junior  
Orientador

**LAVRAS-MG  
2024**

**À toda família Macedo, em especial a voinha, Maria Tereza de Macedo e a papaivovô,  
Antônio Deocleciano de Macedo (*in memorian*)**

**Eu dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a força, a sabedoria e a perseverança necessárias para concluir esta etapa. Sua presença em minha vida foi fundamental em cada desafio enfrentado, e sou imensamente grata por todas as bênçãos recebidas ao longo deste caminho. Que esta conquista seja para Sua glória.

Aos meus familiares, em especial a minha mãe, Cleilda Macedo (Uá), e a minha avó, Maria Tereza de Macedo (Didiga), às minhas tias Claudete Macedo (Detinha), Cleide Marina de Macedo e Clemilda Macedo (Aia) e aos meus primos Pedro Marcelo e Marcos Paulo, expresse minha profunda gratidão. Agradeço pelo amor incondicional, pelo apoio constante e pelas palavras de encorajamento em cada etapa deste percurso. Vocês foram minha base e inspiração, e esta conquista é tanto minha quanto de vocês. Obrigado por estarem sempre ao meu lado.

A meu avô Antônio Deocleciano de Macedo (Antônio Aurora – *In memoriam*) que partiu antes de ver minha conquista, mas tenho certeza de que está orgulhoso onde quer que esteja. Esta conquista é também sua. Agradeço por todos os momentos compartilhados e pelas lições valiosas que sempre levarei comigo. Saudades eternas.

Ao professor Alcides Moino Junior por todos esses anos de aprendizado. Agradeço a orientação, paciência, disponibilidade e confiança. O senhor foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho e para a minha formação. Agradeço por acreditar em mim e por todos os momentos de aprendizado que tivemos juntos.

A banca examinadora, composta pelos professores Luís Alves, Cristiane Rohde, Luíz Claudio Paterno, Khalid Haddi, Viviane Alves e Bruno Henrique Sardinha por dedicarem seu tempo e atenção à avaliação deste trabalho. Suas críticas construtivas e sugestões enriquecedoras foram fundamentais para o aprimoramento da pesquisa.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) por proporcionar um ambiente acadêmico enriquecedor e recursos indispensáveis para o desenvolvimento desta pesquisa. O apoio da instituição foi fundamental para alcançar esta conquista, e sou grato por todas as oportunidades e experiências que me foram oferecidas durante o percurso acadêmico.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Agradeço pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa de pesquisa. Esse suporte foi vital para a conclusão deste trabalho, permitindo-me focar plenamente nas atividades acadêmicas e na pesquisa.

Aos professores do Departamento de Entomologia da UFLA os quais eu tive a honra de poder compartilhar de seus conhecimentos, seja durante as disciplinas que cursei, os seminários e palestras que assisti ou mesmo nas conversas pelos corredores.

Aos membros do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos pelo apoio constante e pela colaboração durante o desenvolvimento desta pesquisa. O trabalho em equipe e a troca de ideias foram essenciais para superar desafios e alcançar os resultados desejados.

Sou grato por cada contribuição e pela amizade que tornou o ambiente do laboratório tão enriquecedor.

Aos membros do Núcleo de Estudos em Entomologia (NEENTO) pelos conhecimentos e experiências compartilhadas que me ajudarão durante a minha vida profissional.

A Marlon da Silva Martinelli por caminhar junto comigo nessa batalha. Agradeço o amor, apoio e compreensão incondicional ao longo desta jornada. Sua paciência e encorajamento foram essenciais para enfrentar os desafios e manter o foco nos meus objetivos. Sou profundamente grato(a) por ter você ao meu lado, oferecendo sempre suporte e motivação.

Aos meus velhos e novos amigos de Lavras, Assú e Rio. Agradeço por estarem presentes em momentos de celebração e desafio, oferecendo apoio e encorajamento, independentemente da distância. Agradeço pelas palavras de encorajamento, pela compreensão e pelas demonstrações de carinho que me deram força ao longo deste caminho. Cada um de vocês contribuiu de maneira especial para que eu alcançasse esta conquista.

Agradeço a todos que, de diferentes maneiras, contribuíram para a conclusão deste trabalho. Agradeço a todos que compartilharam momentos, ofereceram palavras de incentivo ou prestaram ajuda de qualquer forma. Cada contribuição, seja grande ou pequena, foi crucial para alcançar este objetivo. Agradeço sinceramente a todos que ofereceram apoio, incentivo e sabedoria ao longo desta jornada. Sua presença e colaboração foram fundamentais e serão sempre lembradas com gratidão.

A todos: Muito obrigada

*Permita que eu fale  
Não as minhas cicatrizes  
Elas são coadjuvantes  
Não, melhor, figurantes  
Que nem devia tá aqui*

*Permita que eu fale  
Não as minhas cicatrizes  
Tanta dor rouba nossa voz  
Sabe o que resta de nós?  
Alvos passeando por aí*

*Permita que eu fale  
Não as minhas cicatrizes  
Se isso é sobre vivência  
Me resumir a sobrevivência  
É roubar o pouco de bom que vivi*

*Por fim, permita que eu fale  
Não as minhas cicatrizes  
Achar que essas mazelas me definem  
É o pior dos crimes  
É dar o troféu pro nosso algoz e fazer nós sumir*

(Emicida)

## RESUMO

O controle biológico está sendo cada vez mais utilizado em programas de manejo de moscas-das-frutas, sobretudo com a liberação de parasitoides. Em regiões onde a densidade populacional de tefritídeos é alta, apenas esse agente não é o suficiente para manter a população da mosca abaixo do nível de dano econômico, sendo necessário adotar um método e/ou um agente de controle adicional. Desta maneira, os nematoides entomopatogênicos (NEP) tornam-se uma ótima opção, pois infectam as larvas de moscas-das-frutas quando elas saem do fruto para empupar no solo. No entanto, a compatibilidade desses agentes deve ser previamente determinada para impedir que um afete a eficácia do outro. Em estudos anteriores, foi constatado que os NEP causam maior mortalidade em larvas de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) parasitadas por *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), quando comparado com larvas não parasitadas. Além disso, a infecção dos NEP demonstrou ter efeitos subletais em insetos adultos que sobreviveram, como descoloração e afinamento da cutícula, deformações anatômicas, redução na fertilidade e longevidade. Portanto, o trabalho tem como objetivos: acompanhar o desenvolvimento de *D. longicaudata* em larvas de *C. capitata* expostas ao nematoide *Heterorhabditis amazonensis* GL, verificar o parasitismo em larvas infectadas; bem como avaliar os efeitos subletais no parasitoide. Os bioensaios foram realizados no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, sob condições controladas. O desenvolvimento do parasitoide foi acompanhado dissecando larvas e pupas de *C. capitata* parasitadas expostas ou não aos NEP que apresentaram ou não sintomas de infecção. Já o período de susceptibilidade do parasitoide foi determinado aplicando NEP em *C. capitata* com diferentes dias após o parasitismo. Em seguida, os adultos expostos aos NEP foram mantidos em gaiolas para verificar os efeitos subletais da infecção na fisiologia dos insetos. Por fim, foram ofertadas larvas de *C. capitata* previamente infectadas e larvas sadias em um recipiente contendo uma fêmea de *D. longicaudata*, com e sem chance de escolha. Foi observado que hospedeiros infectados por NEP prejudicaram o desenvolvimento de *D. longicaudata*. No entanto, a susceptibilidade do parasitoide aos entomopatógenos ocorre apenas quando o hospedeiro está no estágio larval, sendo que o pupário atua como barreira natural, sem impacto na emergência de adultos. Além disso, foi constatado que o parasitoide preferiu as larvas sadias em relação às larvas infectadas, não sendo constatada a presença de ovos de *D. longicaudata* em hospedeiros infectados. Em relação aos efeitos subletais, foi observado que os NEP não afetaram a Taxa reprodutiva líquida ( $R_0$ ), a Taxa intrínseca de aumento ( $r$ ) e a Taxa finita de aumento ( $\lambda$ ), além de aumentar o Tempo médio de geração ( $T$ ) e a Taxa específica de fertilidade ( $m_x$ ) da geração subsequente dos parasitoides *D. longicaudata*. Com base nos resultados obtidos, é possível utilizar os dois agentes de biocontrole na regulação de moscas-das-frutas, desde que a liberação do parasitoide e a aplicação de NEP ocorra sequencialmente e com o tempo adequado.

**Palavras-chave:** Moscas-das-frutas; agentes biológicos; interação entomófagos-entomopatógenos; seleção de hospedeiros; efeitos subletal.

## ABSTRACT

Biological control is increasingly used in fruit fly management programs, particularly through parasitoid releases. In regions with high Tephritidae population density, parasitoids alone are insufficient to keep fly populations below economic damage thresholds, necessitating the adoption of additional control methods or agents. Entomopathogenic nematodes (EPNs) are a viable option as they infect fruit fly larvae after they exit the fruit to pupate in the soil. However, compatibility between these agents must be determined beforehand to prevent mutual interference. Previous studies have shown that EPNs cause higher mortality in *Ceratitis capitata* (Wiedemann) larvae parasitized by *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) compared to non-parasitized larvae. Moreover, EPN infection has sublethal effects on surviving adult insects, including cuticle discoloration, thinning, anatomical deformities, reduced fertility, and longevity. Therefore, this study aims to track the development of *D. longicaudata* in *C. capitata* larvae exposed to the nematode *Heterorhabditis amazonensis* GL, assess parasitism in infected larvae, and evaluate sublethal effects on the parasitoid. Bioassays were conducted under controlled conditions at the Insect Pathology and Microbial Control Laboratory. Parasitoid development was monitored by dissecting parasitized *C. capitata* larvae and pupae exposed to EPNs with or without infection symptoms. The parasitoid's susceptibility period to EPNs was determined by applying them to *C. capitata* larvae at different days post-parasitism. Subsequently, adult parasitoids exposed to EPNs were kept in cages to assess sublethal effects of infection on insect physiology. Lastly, choice tests were conducted by offering previously infected and healthy *C. capitata* larvae to individual *D. longicaudata* females to determine host preference. Results showed that EPN-infected hosts impaired *D. longicaudata* development. However, parasitoid susceptibility to entomopathogens occurs only during the larval stage, as the puparium acts as a natural barrier with no impact on adult emergence. Additionally, the parasitoid preferred healthy larvae over infected ones, and no *D. longicaudata* eggs were found in infected hosts. Regarding sublethal effects, EPNs did not affect Net reproductive rate ( $R_0$ ), Intrinsic rate of increase ( $r$ ), Finite rate of increase ( $\lambda$ ), but increased Mean generation time ( $T$ ) and Specific fertility rate ( $m_x$ ) of the subsequent generation of *D. longicaudata* parasitoids. Based on these findings, both biocontrol agents can be used effectively in fruit fly regulation provided that parasitoid release and EPN application occur sequentially and at appropriate times.

**Keywords:** Fruit flies; biological agents; entomophages-entomopathogens interaction; host selection; sublethal effect.

## IMPACTOS SOCIAIS, TECNOLÓGICOS, ECONÔMICOS E CULTURAIS

*Ceratitis capitata* é uma das principais pragas na fruticultura mundial devido à sua habilidade de se adaptar a diferentes condições climáticas e atacar diversas culturas frutíferas. O controle dessa praga é tradicionalmente feito com iscas tóxicas e inseticidas, mas a crescente preocupação ambiental está levando à adoção de métodos alternativos, que não só reduzem o uso de produtos químicos, mas também melhoram a qualidade dos frutos e diminuem os custos de produção. A combinação de parasitoides e nematoides entomopatogênicos (NEP) surge como uma solução inovadora e sustentável para o controle de pragas. No entanto, esses agentes podem competir entre si, levando à morte das larvas parasitadas por infecção de nematoides. A tese teve como objetivo avaliar como a exposição a NEP afeta o desenvolvimento do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* em larvas de *C. capitata*, além de determinar a suscetibilidade das larvas, e analisar os efeitos dos NEP nos adultos e na fecundidade do parasitoide. Os resultados indicaram que o NEP pode interromper o desenvolvimento do parasitoide, mas uma aplicação cuidadosa pode atenuar esses efeitos adversos, pois foi observado que as pupas parasitadas mostraram resistência à infecção por NEP e os parâmetros biológicos dos parasitoides sobreviventes não foram afetados. Assim, estratégias como a alternância de aplicações ou a sincronização das liberações podem aumentar a eficácia do controle. A combinação de parasitoides e nematoides entomopatogênicos para o controle de pragas oferece uma abordagem inovadora e sustentável na agricultura, promovendo uma mudança de paradigma no manejo de pragas, pois eleva a conscientização ambiental e incentiva práticas agrícolas que valorizam a biodiversidade e a conservação dos ecossistemas. Além disso, reduz a dependência de inseticidas e melhora a saúde das comunidades agrícolas, tornando um ambiente mais seguro para os trabalhadores rurais e beneficiando a saúde pública. Em termos ambientais, essa interação diminui a poluição do solo e da água, preservando a biodiversidade e mantendo a saúde do solo, promovendo ecossistemas mais equilibrados e resilientes. A utilização desses agentes biológicos também pode diminuir custos com agrotóxicos e danos às culturas, aumentando a produtividade e a rentabilidade dos agricultores. A longo prazo, o controle biológico pode garantir a sustentabilidade econômica do setor agrícola e adaptar as práticas às mudanças climáticas. As descobertas deste estudo reforçam a necessidade de mais pesquisas e desenvolvimento de técnicas para integrar parasitoides e nematoides, abrindo novas oportunidades para o avanço na biotecnologia e entomologia, além de contribuir para atingir os objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Organização das Nações Unidas (ONU), principalmente aos relacionados à fome zero e agricultura sustentável; saúde e bem-estar; trabalho decente e crescimento econômico; ação contra a mudança global do clima; preservação da vida terrestre e na água, de modo que o Brasil cumpra a Agenda 2030.

## **SOCIAL, TECHNOLOGICAL, ECONOMIC AND CULTURAL IMPACTS**

*Ceratitis capitata* is one of the major pests in global fruit cultivation due to its ability to adapt to varying climatic conditions and attack a wide range of fruits. Traditionally, pest control for this species has relied on toxic baits and insecticides. However, growing environmental concerns are driving the adoption of alternative methods that not only reduce chemical usage but also improve fruit quality and lower production costs. The combination of parasitoids and entomopathogenic nematodes (NEP) presents an innovative and sustainable solution for pest control. Nevertheless, these agents can compete with each other, potentially leading to the death of parasitized larvae through nematode infections. This study aimed to assess how NEP exposure affects the development of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* in *C. capitata* larvae, determine larval susceptibility, and analyze the effects of NEP on adult parasitoids and their fecundity. The results indicated that NEP can disrupt parasitoid development; however, careful application can mitigate these adverse effects, as parasitized pupae exhibited resistance to NEP infection, and the biological parameters of surviving parasitoids remained unaffected. Strategies such as alternating applications or synchronizing releases can enhance control effectiveness. The use of parasitoids and entomopathogenic nematodes offers an innovative and sustainable approach to pest management, fostering a paradigm shift in pest control by increasing environmental awareness and promoting agricultural practices that value biodiversity and ecosystem conservation. Additionally, this approach reduces reliance on insecticides and improves the health of agricultural communities, creating a safer environment for farmworkers and benefiting public health. Environmentally, this interaction reduces soil and water pollution, preserves biodiversity, and maintains soil health, contributing to more balanced and resilient ecosystems. The use of these biological agents can also lower costs associated with pesticides and crop damage, increasing agricultural productivity and profitability. In the long term, biological control can ensure the economic sustainability of the agricultural sector and adapt practices to climate change. The findings of this study underscore the need for further research and development of techniques to integrate parasitoids and nematodes, opening new avenues for advancements in biotechnology and entomology, and contributing to the achievement of the United Nations Sustainable Development Goals (SDGs), particularly those related to zero hunger and sustainable agriculture; health and well-being; decent work and economic growth; climate action; and the preservation of terrestrial and aquatic life, thereby supporting Brazil's fulfillment of the 2030 Agenda.

## SUMARIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	<b>14</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae)</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2</b>	<b>Bioecologia de <i>Ceratitis capitata</i></b> .....	<b>17</b>
<b>2.3</b>	<b>Danos</b> .....	<b>19</b>
<b>2.4</b>	<b>Manejo Integrado de Moscas-das-Frutas</b> .....	<b>20</b>
<b>2.4.1.</b>	<b>Controle Químico</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4.2.</b>	<b>Controle Biológico</b> .....	<b>23</b>
<b>2.4.2.1.</b>	<b>Macrobiológicos: Parasitoides</b> .....	<b>25</b>
<b>2.4.2.2.</b>	<b>Microbiológico: Nematoides Entomopatogênicos</b> .....	<b>27</b>
<b>2.5</b>	<b>Interação Nematoides Entomopatogênicos e Parasitoides</b> .....	<b>30</b>
<b>2.6</b>	<b>Efeitos subletais de nematoides entomopatogênicos no desenvolvimento dos hospedeiros</b> .....	<b>34</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>36</b>
	<b>SEGUNDA PARTE</b> .....	<b>46</b>
	<b>ARTIGO 1 - PARASITISMO DE <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) EM LARVAS DE <i>Ceratitis capitata</i> (DIPTERA: TEPHRITIDAE) INFECTADAS POR NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS</b> .....	<b>478</b>
	<b>RESUMO</b> .....	<b>48</b>
	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>48</b>
	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>48</b>
	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>52</b>
	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>58</b>
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>60</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>61</b>
	<b>ARTIGO 2 - DESENVOLVIMENTO DE <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) EM LARVAS DE <i>Ceratitis capitata</i> (DIPTERA: TEPHRITIDAE) EXPOSTAS A NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS</b> .....	<b>64</b>
	<b>RESUMO</b> .....	<b>65</b>
	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>65</b>
	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>65</b>
	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>70</b>
	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>75</b>
	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>79</b>

**ARTIGO 3 - EXPOSIÇÃO AOS NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS E OS PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE *Diachasmimorpha longicaudata* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) ...83**

**RESUMO .....84**

**INTRODUÇÃO .....84**

**MATERIAIS E MÉTODOS.....86**

**RESULTADOS .....89**

**DISCUSSÃO .....98**

**CONCLUSÃO .....102**

**REFERÊNCIAS .....102**

**3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....108**

## 1 INTRODUÇÃO

A mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) é uma das principais pragas da fruticultura mundial, por ser capaz de se alimentar e se reproduzir em mais de 300 espécies botânicas, aliadas à sua capacidade de se adaptar a diversas condições climáticas, permitiram a expansão dessa praga pelo mundo, sendo encontrada atualmente em 61 países. Modelos estimam que esta espécie apresenta 38% de probabilidade de se estabelecer em novas localidades (HARBI et al., 2019; TROMBIK et al., 2022).

Os prejuízos estão relacionados aos danos diretos causados pela punctura das fêmeas durante a oviposição, facilitando a penetração de microrganismos que aceleram o apodrecimento do fruto, e pela alimentação das larvas na polpa, tornando os frutos impróprios para comercialização e consumo humano (BADII et al., 2015). Os danos indiretos envolvem barreiras comerciais impostas por países importadores, custos de monitoramento e controle da praga (CHRISTENSON; FOOTE, 1960; AZEVEDO et al., 2013).

As constantes aplicações de inseticidas ainda é o método tradicional de controle das moscas-das-fruta (DIAS et al., 2018; SCARRETTA et al., 2018). Contudo, o uso excessivo e incorreto desses produtos provoca efeitos adversos no ecossistema agrícola e na saúde humana. Por isso, é necessário empregar estratégias ambientalmente harmoniosas, no manejo integrado de moscas-das-frutas, como o controle biológico (DOLINSKI; LACEY, 2007; SHAURUB et al., 2015; DIAS et al., 2018; TOLEDO-HERNÁNDEZ et al., 2019).

O controle biológico de moscas-das-frutas é feito basicamente a partir de liberação de parasitoides, como o parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), devido à facilidade de criação desta espécie e à sua boa adaptação ao laboratório e ao ambiente (GARCIA; RICALDE, 2013; HARBI et al., 2019). Esses inimigos naturais são capazes de localizar as larvas no interior dos frutos, parasitando todos os estágios larvais, sendo que o terceiro ínstar é tido como o preferencial e ovipositam (BADII et al., 2015; HARBI et al., 2019; ROHR; JAHNKE; REDAELLI, 2019).

A eficiência de *D. longicaudata* pode atingir 50% de parasitismo das larvas de moscas-das-frutas em condição de campo (HARBI et al., 2016). No entanto, a utilização exclusiva de parasitoides pode não ser suficiente para o controle de *C. capitata*, especialmente em regiões onde essa espécie é predominante (PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019), pois, o nível de dano econômico permitido na fruticultura é muito baixo, o que exige que a infestação nos frutos seja próxima de zero (CARVALHO, 2006).

Um método de controle adicional poderia ser a aplicação de nematoides entomopatogênicos (NEP) pertencentes aos gêneros *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae) e *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae), que podem infectar e matar as larvas de *C. capitata* quando elas deixam os frutos e penetram no solo ou na serapilheira para a formação das pupas (FUGA; FERNANDES; LOPES, 2013; SHAURUB et al., 2015; DIAS et al., 2018; JAMES; MALAN; ADDISON, 2018; KOPPENHÖFER; SHAPIRO-ILAN; HILTPOLD, 2020).

A combinação de NEP com parasitoides pode ser uma estratégia eficaz, desde que os benefícios e aspectos negativos da interação sejam avaliados cuidadosamente (MBATA; SHAPIRO-ILAN, 2010; GONZALEZ et al., 2016b). Há relatos demonstrando efeitos negativos entre os NEP e inimigos naturais (MRÁČEK; SPITZER, 1983; LORDAN et al., 2014).

Recentemente, foi constatado que as larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata*, quando expostas aos juvenis infectantes (JI), apresentaram taxa de mortalidade significativamente mais alta em comparação com as larvas não parasitadas, resultando na interrupção do desenvolvimento do parasitoide. Entretanto, observou-se que algumas larvas do parasitoide ainda conseguiram eclodir dentro das larvas infectadas (SOUZA, 2020).

Estudos indicam que a susceptibilidade dos parasitoides aos NEP varia conforme o estágio de desenvolvimento, sendo os estágios iniciais mais afetados do que os finais (KAYA, 1978). Isso dará a possibilidade de uma aplicação sequencial dos agentes biológicos, com intervalos adequados, pode evitar interferências entre eles (ATWA et al., 2013), aliados com o fato das fêmeas dos parasitoides conseguem distinguir entre os hospedeiros infectados e sadios (ABBAS, 2020).

Além disso, a infecção por NEP pode ter efeitos subletais nos insetos sobreviventes, como descoloração e afinamento da cutícula, deformações anatômicas, redução na fertilidade e longevidade (GIRLING et al., 2010; EBRAHIMI et al., 2014). A aptidão de *D. longicaudata* adultos que sobreviveram à exposição aos NEP como larvas são desconhecidos. O conhecimento sobre as relações entre mosca-das-frutas, seus parasitoides e os NEP, são essenciais para elaborar estratégias de uso que minimizem os efeitos adversos da interação entre parasitoides e NEP no controle de *C. capitata*, promovendo um manejo integrado mais eficaz e sustentável dessa praga (MBATA; SHAPIRO-ILAN, 2010; ATWA et al., 2013).

Com isso, o objetivo geral foi acompanhar o desenvolvimento de *D. longicaudata* em larvas de *C. capitata* expostas aos NEP, verificar se existe diferença do parasitismo sobre larvas de moscas-das-frutas infectadas; bem como avaliar os efeitos não letais no parasitoide e, a fim de fornecer subsídios para elaborar estratégias de uso que minimizem os efeitos adversos

gerados pela interação entre o parasitoide e os NEP no controle de moscas-do-mediterrâneo. Para isso, propõe os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar se o desenvolvimento do parasitoide *D. longicaudata* em larvas e pupas de *C. capitata* é afetado pela exposição/infecção de NEP;
- Investigar se a morte das larvas de *C. capitata* por NEP interrompe o desenvolvimento do parasitoide *D. longicaudata* ou se há penetração de JIs nas larvas do parasitoide;
- Determinar o estágio de desenvolvimento do parasitoide *D. longicaudata* em larvas de *C. capitata* menos susceptíveis aos NEP;
- Determinar se *D. longicaudata* parasita larvas de *C. capitata* infectadas por NEP;
- Verificar os efeitos da exposição de NEP nos adultos de *D. longicaudata*;
- Avaliar se o NEP interfere na fecundidade de adultos de *D. longicaudata* sobreviventes.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae)

Tephritidae é uma família de insetos pertencentes à ordem Diptera conhecida popularmente como moscas-das-frutas. A maioria das espécies são fitófagas, se alimentando de tecidos vegetais vivos, incluindo sementes, flores, frutos e caules, muitas vezes formando galhas ou em minas de folhas. Apenas um terço das espécies são frugívoros, nutrindo-se de uma ampla variedade de frutas silvestres e cultivadas (HERNÁNDEZ-ORTIZ; HERNÁNDEZ-LÓPEZ; TROMBIK et al., 2022).

Embora a maioria das espécies não sejam classificadas como pragas, a família é reconhecida principalmente pelas espécies que representam sérias ameaças à fruticultura mundial. As 180 espécies de moscas-das-frutas listadas entre as pragas de grande importância econômica, encontram-se distribuídas em apenas cinco gêneros: *Anastrepha* Schiner, *Bactrocera* Macquart, *Ceratitis* Macleay, *Dacus* Fabricius e *Rhagoletis* Loew (QIN et al., 2015; SALERNO et al., 2020; TROMBIK et al., 2022).

A distribuição natural dos tefritídeos se estende a praticamente todas as regiões do mundo, com exceção das áreas do grupo climático polar, mas as principais espécies-praga estão restritas a regiões específicas, como as regiões Neotropical (*Anastrepha* e *Rhagoletis*), Indomalaia (*Bactrocera*), Australásia (*Dacus*), Neártica, Paleártica (*Rhagoletis*) e Afrotropical (*Ceratitis*) (QIN et al., 2015; TROMBIK et al., 2022).

Todavia, um total de 44 espécies foram identificadas como introduzidas acidentalmente em outras regiões. A maioria das espécies de moscas-das-frutas invasoras estabeleceram-se em apenas cinco ou menos países, com 13 espécies invadindo apenas um único país e apenas seis espécies estão presentes em mais de 20 países (TROMBIK et al., 2022).

O sucesso no estabelecimento de uma espécie recém-chegada a um ambiente depende de uma combinação de fatores como o clima e, frequentemente, interações bióticas específicas. Além disso, considerando a influência da distribuição e abundância das moscas-das-frutas em variáveis climáticas, há também preocupações quanto à potencial intensificação das mudanças climáticas, o que pode favorecer a ocorrência mais frequente de surtos em regiões hortícolas (QIN et al., 2015; DIAS et al., 2018).

Quando se estabelecem em uma nova região, as moscas da fruta invasoras logo se tornam pragas significativas em plantações de frutas ou vegetais, causando prejuízos persistentes em áreas afetadas, o que pode levar ao abandono de plantações de culturas

susceptíveis (PAPADOPOULOS, 2014). A mosca do Mediterrâneo (*C. capitata*) é um exemplo clássico de espécie invasora que atraiu atenção científica, econômica e política no Brasil e no mundo devido a sua importância quarentenária (GUTIERREZ; PONTI, 2011).

## 2.2 Bioecologia de *Ceratitis capitata*

*Ceratitis capitata* é um inseto polífago, holometábolo e multivoltino, sendo encontrada atualmente em 61 países. Modelos matemáticos estimam que esta espécie tem uma probabilidade estimada de 38% para se estabelecer em novas localidades, devido à sua adaptabilidade para explorar uma ampla variedade de hospedeiros e sua capacidade de responder ao desenvolvimento e às variações ambientais através da plasticidade fenotípica e adaptação genética (GUTIERREZ et al., 2021; TROMBIK et al., 2022).

Esta espécie pode ocorrer durante todo o ano nos pomares comerciais, tendo várias gerações durante o ano. Seus ovos são depositados sob a casca do fruto hospedeiro, e as larvas começam a eclodir após dois dias e se alimentam durante toda sua fase imatura que se estende de 6 a 11 dias, passando por três instares (SHAURUB et al., 2015).

As larvas de terceiro ínstar são do tipo vermiformes, esbranquiçadas, de tamanho médio com dente mandibular sulcado ventralmente, podendo ter um diminuto dente mandibular subapical ou não. Possuem 8-12 cristas orais, ausência de placas acessórias, lóbulos estomais secundários em forma de pétala e ausência de protetores estomais esclerotizados. Espínulos dorsais estão presentes nos segmentos T1-T3. Os espiráculos anteriores apresentam 9-12 túbulos em uma única e sinuosa fileira, com a base cilíndrica, aproximadamente metade da largura apical. Há uma crista caudal, enquanto os lobos anais podem ser inteiros ou estriados, sendo os lobos subiguais (STECK; EKESI, 2015).

As larvas saem do fruto e passam para a fase de pupa no solo sob a planta hospedeira, onde os adultos emergem após seis a treze dias (SHAURUB et al., 2015). Os adultos são facilmente reconhecíveis pela morfologia externa, particularmente pelos padrões torácicos e das asas. As moscas medem de 4 a 5 mm de comprimento por 10 a 12 mm de envergadura. Os machos têm um par de cerdas orbitais inferiores de formato característico, o ápice preto e em forma de diamante (WHITE; ELSON-HARRIS, 1992).

Os adultos machos atingem sua maturidade sexual quatro dias após a emergência, enquanto as fêmeas estão prontas para acasalar somente de seis a oito dias após a emergência (THOMAS et al., 2001). A maturidade sexual e a eficiência reprodutiva dos adultos, dependem

da ingestão de nutrientes essenciais após a emergência. A dieta também tem um efeito na longevidade das moscas-das-frutas, podendo viver até dois meses (WELDON, 2020).

No Brasil, *C. capitata* foi detectada pela primeira vez em 1901, no município de São Paulo/SP, e posteriormente, espalhou-se por todo o território nacional atingindo as regiões Nordeste (1993), Norte (1998) e, mais recentemente, Centro-Oeste (2004). Atualmente, é encontrada em 24 dos 26 Estados brasileiros, sendo o Amapá e Amazonas as únicas unidades federativas sem registro dessa espécie (ZUCCHI; MORAES, 2024).

### 2.3 Danos

A preocupação com a mosca-do-mediterrâneo está relacionada ao seu impacto econômico significativo, que pode resultar em perdas que variam de 40% a 80%, dependendo da região, variedade de cultivo e época do ano (DIAS et al., 2018; FOLLETT; HAYNES; DOMINIAK, 2021).

A infestação por mosca-das-frutas ocasiona grandes perdas na produção e na qualidade das frutas *in natura*, pois o dano já se inicia no momento da oviposição, ocasionando lesões que facilitam a penetração de microrganismos que aceleram o apodrecimento do fruto. Ao eclodir, as larvas se alimentam da polpa, aumentando significativamente o consumo com o avanço de seu desenvolvimento, tornando os frutos impróprios para a comercialização e/ou consumo humano (BADII et al., 2015).

Contudo, o risco efetivo representado pelas moscas-das-frutas é impactado pela aptidão do hospedeiro como fonte de alimento para a mosca, bem como pelo seu hábito polífago, sendo capaz de infestar de 250 a 400 hospedeiros, muitos dos quais são comercialmente importantes (QIN et al., 2015; SCIARRETTA et al., 2018; FOLLETT; HAYNES; DOMINIAK, 2021). Cada espécie hospedeira pode reagir de forma diferente ao ataque de *C. capitata*, em decorrência à suas propriedades físico-químicas (LOUZEIRO et al., 2020).

As lesões causadas pela infestação de moscas-das-frutas podem levar à perda de frutos tanto durante o processo de produção como de venda comercial (LOUZEIRO et al., 2021). A punção e oviposição já são suficientes para prejudicar a qualidade dos frutos, além de facilitar a penetração de microrganismos que aceleram o amadurecimento do fruto. A alimentação das larvas provoca alterações físicas e químicas nas frutas fresca, como modificações na firmeza da casca e da polpa, pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais; aceleraram o processo de perda

de peso do fruto, além de causar limitações no processamento em decorrência à proliferação de microrganismos (LOUZEIRO *et al.*, 2020).

As perdas na comercialização de frutas podem ocorrer quando os frutos, recentemente infestados nas áreas de produção, não exibem sintomas evidentes de infestação por moscas-das-frutas. Esses frutos inicialmente assintomáticos podem passar pelo processo de seleção e serem comercializados. No entanto, durante o transporte ou armazenamento, surgem lesões e deterioração física à medida que as larvas se desenvolvem, resultando na rejeição do fruto antes de atingir o consumidor final (LOUZEIRO *et al.*, 2021).

O comércio de produtos agrícolas contaminados entre países resulta na dispersão de espécies de moscas de importância econômica em áreas livres ou de baixa prevalência. Dessa forma, a presença destas espécies de pragas limita o acesso aos mercados internacionais devido às restrições de quarentena impostas pelos países importadores (LOUZEIRO *et al.*, 2021; TROMBIK *et al.*, 2022).

Devido às graves consequências socioeconômicas das invasões de Tephritidae, muitos países impõem sanções comerciais e exigem tratamentos rigorosos dos produtos antes da exportação para limitar a propagação de novas e potencialmente prejudiciais espécies. Em ambientes que abrigam essas pragas, os custos de produção aumentam, pois são necessários recursos consideráveis anualmente para o controle dessas pragas. Calcula-se que essa espécie causa um prejuízo em torno de US\$ 242 milhões por ano apenas no Brasil (QIN *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2018; TROMBIK *et al.*, 2022).

## **2.4 Manejo Integrado de Moscas-das-Frutas**

O Manejo Integrado de Pragas (MIP) é uma abordagem para controlar *C. capitata*, que se destina a reduzir a população desta praga e mantê-la abaixo de níveis economicamente prejudiciais (ELQDHY *et al.*, 2024). O manejo racional e eficiente das moscas-das-frutas se inicia com o conhecimento dos aspectos bioecológicos e do momento adequado para iniciar as medidas de controle (NASCIMENTO; CARVALHO; MALAVASI, 2000).

O monitoramento populacional pode ser realizado na fase larval por amostragem frutos, e na fase adulta por captura através de armadilhas. A amostragem de frutos fornece uma indicação da infestação de frutos, enquanto a captura fornece informações sobre a presença e densidade populacional e dinâmica dos adultos (GIUNTI *et al.*, 2023).

Os parâmetros utilizados para determinar o nível de prevalência de moscas-das-frutas são definidos pelo *National Plant Protection Organization* (NPPO), com a utilização do índice

MAD (Mosca-Armadilha-Dia), que estima o número relativo de moscas-das-frutas adultas em um determinado tempo e espaço a partir do resultado da divisão do número total de moscas capturadas (M) pelo produto obtido da multiplicação do número total de armadilhas inspecionadas (A) pelo número médio de dias que as armadilhas ficaram expostas em campo (D) (FAO, 2012).

Os limites do índice MAD, as diretrizes para a suspensão de propriedades e os métodos de amostragem de frutos estão em conformidade com os acordos estabelecidos pelos países importadores. Por exemplo, para ocorrer a exportação de manga (*Mangifera indica* L., Anacardiaceae) para os Estados Unidos da América, é necessário que o índice MAD da Propriedade referente à última coleta antes da inspeção realizada pelo MAPA para registro das propriedades seja menor ou igual a 1,0 (BRASIL, 2010).

No entanto, as medidas de controle devem ser aplicadas quando o índice MAD for igual ou superior a 0,25, sendo esse considerado o nível de controle da fruticultura (PARANHOS; LIMA; GAMA, 2013). Esse nível de controle, ou nível de ação, refere-se à densidade mínima da população da praga que requer a aplicação de táticas de controle para evitar perdas de produção economicamente significativas (TORRES; MARQUES, 2000).

No entanto, o manejo de Tefritídeos é bastante desafiador, devido à adaptação a diversas regiões, ampla gama de hospedeiros e principalmente à sua biologia, uma vez que as larvas de terceiro ínstar deixam os frutos em decomposição e caem no solo para formar pupas, ficando protegidos da maioria dos métodos aplicados (HEVE et al., 2017; DIAS et al., 2018).

As Normas Internacionais para Medidas Fitossanitárias (NIMF) nº 26 sugere que a supressão das moscas-das-frutas seja realizada utilizando isca inseticida seletiva, pulverização, técnica de inseto estéril, técnica de aniquilação de machos, controle biológico, controle mecânico, entre outros (FAO, 2006).

Dentre todas as táticas de controle disponíveis para moscas-das-frutas, o controle biológico foi a estratégia de manejo mais investigada, representando 29% dos estudos, seguido pelo controle químico (20%), controle comportamental, incluindo a técnica do inseto estéril (TIE) (18%), e tratamentos de quarentena (17%) (DIAS et al., 2018).

#### **2.4.1. Controle Químico**

Tradicionalmente, inseticidas de amplo espectro, como iscas ou pulverizações de cobertura, têm sido utilizados para controlar populações de moscas-das-frutas (SCIARRETTA

et al., 2018; BALI et al., 2021). Em culturas altamente suscetíveis, têm-se realizado pulverizações utilizando organoclorados, organofosforados e carbamatos como única técnica de controle (RAHMAN; BROUGHTON, 2016; VONTAS *et al.*, 2011).

Inseticidas organofosforados como clorpirifós e malatião causam alta mortalidade em adultos de *C. capitata* (>80%), mas seu uso frequente resulta em resíduos químicos inaceitáveis nas frutas, uma vez que esses inseticidas penetram nelas, matando ovos e larvas. (RAHMAN; BROUGHTON, 2016a).

A proibição de alguns princípios ativos pertencentes aos organofosforados, como o malatião, o fentião e o triclorfom pela directiva 91/414/CEE da União Europeia (UE) e em outras partes do mundo, devido às preocupações ambientais e de saúde pública, ajudou a estimular o desenvolvimento de controles alternativos de moscas-das-frutas (RAHMAN; BROUGHTON, 2016b; SCIARRETTA et al., 2019).

Ainda assim, muitos produtores comerciais consideram as pulverizações essenciais para ações corretivas quando o número de moscas-das-frutas continua a aumentar. Dessa forma, novas moléculas começaram a ser introduzidas para substituir os organofosforados (VONTAS et al., 2011; RAHMAN; BROUGHTON, 2016a).

Dentre os diferentes grupos químicos avaliados por Barônio et al. (2019), espinosina e spinetoram mostraram alta eficácia contra moscas-das-frutas e pode ser utilizada como isca tóxica. Os neonicotinóides como clotianidina e tiaclopride, também foram eficientes contra os adultos de *C. capitata*, além de serem eficazes nos estágios imaturos (ovo e larva) e causarem deformações nos adultos sobreviventes, impedindo-os de voar e infestar novos frutos (RAHMAN; BROUGHTON, 2016b).

Outros inseticidas, como azadiractina, clorantraniliprole e flupiradifurona, apresentaram baixos níveis de toxicidade, mas podem ser utilizados para reduzir a população da praga em pomares, atuando como repelente, reduzindo conseqüentemente a oviposição nos frutos (BARONIO et al., 2019).

O controle químico possui limitações, incluindo variação de eficiência de acordo com o tipo de fruto, atividade residual e penetrativa (RAHMAN; BROUGHTON, 2016b). Além disso, a deriva da pulverização do inseticida pode levar à redução da eficiência do controle e à perda do produto para o meio ambiente, podendo causar desequilíbrio ambiental e prejudicar a saúde humana (MARUBAYASHI et al., 2021).

Novas técnicas de controle, como atrair e matar, captura em massa e uso de sprays de iscas, foram desenvolvidas para reduzir a dependência das pulverizações. Essas técnicas

combinam atrativos e agentes letais, oferecendo benefícios econômicos e ambientais, mas ainda enfrentam desafios como a eficácia e o custo (SCIARRETTA et al., 2019; BALI et al., 2021).

Apesar de sua vantagem ambiental, estudos demonstraram que insetos benéficos que entram em contato com esses dispositivos morrem dentro de 24 horas após a exposição. Os insetos mais comuns e abundantes nas armadilhas foram os crisopídeos marrons, *Micromas tasmaniae* (Walker) (Neuroptera: Henerobiidae) e joaninhas transversais, *Coccinella transversalis* Fabricius (Coleoptera: Coccinellidae). Os Hymenoptera foram representados por micro-himenópteros não identificados e abelhas européias, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) (RAHMAN; BROUGHTON, 2016a).

Em todos estes casos, as técnicas de controle de pragas visam os adultos, uma vez que os ovos e larvas estão alocados dentro dos frutos são difíceis de matar, pois não são atingidos (SCIARRETTA et al., 2018). Outra desvantagem é o surgimento de fenômenos de resistência a diferentes ingredientes ativos usados (GIUNTI et al., 2023).

A resistência aos inseticidas é um problema crescente, motivando a busca por abordagens ambientalmente corretas para reduzir o uso de métodos de controle químico. O conhecimento sobre as consequências danosas do uso indiscriminado de inseticidas sintéticos tem incentivado estudos para desenvolver novas estratégias de controle sustentável (GHABBARI et al., 2018; DIAS; MONTOYA; NAVA, 2022).

#### **2.4.2. Controle Biológico**

O controle biológico de moscas-das-frutas tornou-se um método seguro à saúde humana, ambientalmente benigno e econômico para o manejo de pragas invasoras a longo prazo. Os benefícios do controle biológico se estendem a potenciais insetos-pragas em pomares comerciais, pois a redução do uso de inseticidas leva ao aumento da atividade dos inimigos naturais de pragas secundárias (GIUNTI *et al.*, 2023).

Apesar do aumento das pesquisas sobre controle biológico, em geral, ele ainda representa menos de 1% de todos os métodos de controle utilizados na agricultura (DIAS et al., 2018; PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019). Isto ocorre por diversas razões: baixa relação custo-eficácia, baixa disponibilidade, nível de impacto nas populações de pragas de moscas-das-frutas e pouca assistência por parte do setor público (DIAS; MONTOYA; NAVA, 2022). Mesmo assim, medidas de controle biológico integradas à técnica do inseto estéril (TIE)

têm sido utilizadas em países com programas eficazes de supressão ou erradicação de moscas-das-frutas (PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019).

A TIE consiste em um método de controle autocida baseado na criação massal e radiação ionizante (raios X ou  $\gamma$ ) da população de *C. capitata* VIENNA 8, pois esta linhagem possui genes de pupas brancas (wp) e sensíveis à temperatura letal (tsl), permitindo a liberação apenas de machos irradiados. Esses machos são estéreis e ao copular com fêmeas silvestres, resultam em ovos inviáveis. Ao longo de gerações, isto resulta num declínio das populações selvagens alvo, pois não produzem descendentes, mantendo assim a praga sob controle, ou seja, abaixo de um limiar de danos económicos pré-determinado (PLÁ et al., 2021). Devido a essas características de criação e liberação em massa, a TIE foi reconhecida pela *International Plant Protection Convention* (IPPC) como uma estratégia de controle biológico, sendo incorporada aos programas de MIP em grandes áreas (IMPERATO; RAGA, 2015).

A redução populacional de moscas-das-frutas também se dá por meio da manipulação de inimigos naturais, como parasitoides, predadores, fungos, nematoides, bactérias, vírus, entre outros (DIAS; MONTOYA; NAVA, 2022). Os agentes biológicos utilizados deverão ser escolhidos de acordo com a espécie de mosca-das-frutas, a planta hospedeira e a região do Brasil onde serão aplicados, observando as condições ambientais (PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019).

As abordagens adotadas pelo controle biológico podem ser: conservativo, utilizando a população de inimigos naturais que ocorrem naturalmente; clássico, a partir da introdução de agentes importados para o controle de pragas exóticas; e, o aplicado, realizado por meio de criação e liberação massais de organismos benéficos. As liberações podem ocorrer de forma inoculativa, onde a população deverá atuar ao longo de gerações, ou inundativas, onde são liberados um grande número de organismos que gerem reduções imediatas (BAKER; GREEN; LOKER, 2020). Ressalta-se que são necessários estudos para decidir o tipo de aplicação do controle biológico (PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019).

Os inimigos naturais das moscas-das-frutas mais estudados foram parasitoides (54%), fungos (21%) e nematoides (12%), seguidos por bactérias e predadores, que foram estudados em 8% das publicações, e vírus sendo avaliados em <1% dos estudos (DIAS; MONTOYA; NAVA, 2022; GIUNTI et al., 2023).

### 2.4.2.1. Macrobiológicos: Parasitoides

O controle biológico utilizando parasitoides oferece a vantagem dos agentes apresentarem alta especificidade do hospedeiro, além de atacar as fases imaturas dentro da fruta podendo reduzir a densidade de moscas no nível da paisagem (DIAS; MONTOYA; NAVA, 2022; GIUNTI *et al.*, 2023).

A utilização de parasitoide de moscas-das-frutas iniciou-se no século XX, quando as espécies *C. capitata* e *Bactrocera dorsalis* (Handel) invadiram o Havaí. Desde então, várias espécies de parasitoides vêm sendo introduzidas em diferentes regiões do mundo (CARVALHO; NASCIMENTO; MATRANGOLO, 2000). As famílias taxonômicas e espécies de vespas parasíticas variam de acordo com a mosca-das-frutas e as espécies frutíferas hospedeiras encontradas em uma área (PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019).

A família Braconidae (Opiinae) foi a principal família de parasitoides estudada, seguida por Pteromalidae, Figitidae (Eucoilinae), Chalcididae e Diapriidae, sendo *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead), *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti), *Fopius arisanus* (Sonan), *Utetes anastrephae* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae, Opiinae) e *Ganaspis pelleranoi* (Brèthes) (Hymenoptera: Figitidae, Eucoilinae) as cinco espécies mais estudados (DIAS; MONTOYA; NAVA, 2022).

Atualmente, há registro de 25 espécies no Brasil, porém é provável que esse número seja substancialmente maior, dado que muitas espécies de vespas permanecem não descritas (PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019). Além das espécies nativas, várias espécies exóticas foram introduzidas numa tentativa de melhorar o controle das populações de moscas-das-frutas em pomares e culturas (HARAN *et al.*, 2019).

A maioria dos estudos foi realizada utilizando o parasitoide *D. longicaudata*, pois esta espécie apresentou o maior número de espécies hospedeiras de moscas-das-frutas, facilidade de criação em condição de laboratório e rápida adaptação nos ambientes que são liberadas (GARCIA; RICALDE, 2013; MEIRELLES; REDAELLI; OURIQUE, 2015; CAMARGOS; COSTA; MIRANDA, 2017; DIAS *et al.*, 2018; DIAS; MONTOYA; NAVA, 2022).

Originário do sudeste da Ásia, esse parasitoide foi introduzido com sucesso no Havaí em 1948, e na Florida na década de 1970. No Brasil, *D. longicaudata* foi introduzido em 1994 através da Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária (EMBRAPA) juntamente com o Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura Tropical (CNPMT) e o Centro Nacional de Monitoramento Ambiental (CNPMA), com objetivo de garantir e ampliar a chance

de sucesso no estabelecimento de inimigo natural no Brasil, enviando remessas para diversas localidades do país (CARVALHO; NASCIMENTO; MATRANGOLO, 2000).

Esses agentes de controles são endoparasitoides solitários de larvas, coinobiontes, parasitando *C. capitata*, *Anastrepha ludens* (Loew), *A. fraterculus* (Wiedemann) e *A. obliqua* Macquart (Diptera: Tephritidae) (ROHR; JAHNKE; REDAELLI, 2019; DIAS; MONTOYA; NAVA, 2022). O período médio de desenvolvimento dos estágios imaturos, do ovo à emergência do adulto, foi de  $21,3 \pm 0,1$  dias para machos e  $22,9 \pm 0,1$  dias para fêmeas. A longevidade média das fêmeas foi de  $33,7 \pm 1,8$  dias enquanto a dos machos foi de  $40,1 \pm 2,8$  dias (HARBI et al., 2016).

O adulto de *D. longicaudata* é caracterizado por possuir antenas longas, asas claras, olhos castanhos e corpo marrom-avermelhado. Os machos têm um comprimento de 2,8 a 4,0 mm, enquanto as fêmeas medem de 3,6 a 5,4 mm, excluindo o ovipositor, que normalmente é mais longo que o corpo da fêmea possuindo a ponta preta (THOMPSON, 2001). Os parasitoides exibem variações de tamanho de acordo com o hospedeiro em que se desenvolvem, o que pode afetar a eficácia de busca e a proporção entre os sexos. Entretanto, diferenças no tamanho ou qualidade do hospedeiro podem não necessariamente influenciar os parâmetros reprodutivos (MEIRELLES; REDAELLI; OURIQUE, 2013).

Os compostos voláteis liberados pelas frutas infestadas atraem os parasitoides, que conseguem localizar as larvas no interior dos frutos utilizando as antenas para detectar as vibrações produzidas pela alimentação e movimentação das larvas (GARCIA; RICALDE, 2013). As fêmeas possuem a capacidade de localizar seus hospedeiros, mesmo em baixas densidades, seja nas copas das árvores ou nos frutos caídos no chão (HARBI et al., 2018).

Ao localizar as moscas larvas, *D. longicaudata* insere seu ovipositor e deposita pelo menos um ovo na larva hospedeira (PALADINO; PAPERCHI; CLADERA, 2010). Além do ovo, *D. longicaudata*, assim como outras espécies da superfamília Ichneumonidae, injetam vírus simbióticos e veneno em seus hospedeiros que suprimem suas respostas imunológicas e aumentam a sobrevivência do parasitoide. Esses vírus são chamados polidnavírus (PDVs) e se beneficiam do mutualismo ao se replicar no cálice dos ovários de uma fêmea do parasitoide sem expressar virulência (ZHU et al., 2018; QUICKE; BUTCHER, 2021).

O envenenamento por parasitoides pode ocasionar paralisia temporária do hospedeiro por aproximadamente cinco minutos e efeitos profundos sobre a fisiologia e mudanças na composição química do hospedeiro. Especificamente em *D. longicaudata*, as glândulas de veneno contêm nucleocapsídeos virais em forma de bastonete que são passados para o hospedeiro durante a oviposição e se proliferam nos hemócitos, além de hospedar um vírus

entomopoxvírus (DIEPV) e um rabdovírus, referido como DIRhV. Este último ainda tem o seu papel na relação parasitoide-hospedeiro desconhecido, enquanto o DIEPV induz imunossupressão do hospedeiro, formação de bolhas de hemócitos e apoptose no hospedeiro (QUICKE; BUTCHER, 2021).

No entanto, estes polidnavírus simbióticos podem apresentar uma grande desvantagem para as larvas do parasitoide, facilitando a sua localização para seus inimigos naturais, denominados hiperparasitoides, que depositam seus ovos nas larvas ou pupas dos parasitoides e, como organismos do quarto nível trófico, completam seu desenvolvimento às custas do parasitoide (ZHU et al., 2018). Além do hiperparasitismo, a ação de *D. longicaudata* pode ser afetada por uma variedade de condições ambientais. Isso inclui a disponibilidade e abundância de plantas hospedeiras das pragas, densidade ou dispersão do hospedeiro, competição intraguilda, idade de liberação do parasitoide e fatores abióticos como temperatura, umidade e luz (HARBI et al., 2019; PRESA-PARRA et al., 2021).

#### **2.4.2.2. Microbiológico: Nematoides Entomopatogênicos**

Recentemente, pesquisadores têm investigado a utilização dos Nematoides Entomopatogênicos (NEP) no controle de pragas, uma vez que são capazes de causar a morte de diferentes espécies de insetos consideradas importantes pragas, tornando assim agentes de biocontrole de grande potencial (FUGA; FERNANDES; LOPES, 2013; ELQDHY et al., 2024).

Os NEP, classificados na ordem Rhabditida, estão subdivididos nas famílias Heterorhabditidae e Steinernematidae, embora também existam outros organismos em diferentes famílias com potencial patogênico. Atualmente, são identificados quatro gêneros: *Heterorhabditis* Poinar, *Steinernema* Travassos, e *Neosteinernema* Nguyen e Smart, *Oscheius* Andrassy (BURNELL; STOCK, 2000; TORRES-BARRAGAN et al., 2011). No entanto, apenas os dois primeiros, *Heterorhabditis* e *Steinernema*, que recebem maior ênfase em pesquisas e já são produzidos comercialmente para o controle de pragas agrícolas, veterinárias e urbanas (FERRAZ et al., 2008). Atualmente, mais de 106 espécies de *Steinernema*, 21 espécies de *Heterorhabditis* e 17 espécies de *Oscheius* foram identificadas em todo o mundo (ELQDHY et al., 2024).

Esses organismos representam uma guilda de nematoides que habitam o solo, sendo encontrados em todos os continentes, com exceção da Antártida, ocupando diversos ambientes, como áreas agrícolas, florestas, gramados, desertos e praias (GREWAL, 2000). Assim, os NEP

infectam e matam rapidamente insetos que vivem dentro, sobre ou perto da superfície do solo, como as moscas-das-frutas, que se tornam alvo para esses agentes no último instar larval e a pupa, as quais encontram-se livres no solo (ROHDE et al., 2013; SHAURUB et al., 2015; CHERGUI et al., 2019; PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019; ELQDHY et al., 2024).

O terceiro estágio do ciclo de vida dos NEP, conhecido como Juvenil Infectante (JI), é o único estágio de vida livre dos nematoides, apresentando tolerância à estresses abióticos, enquanto todos os outros estágios de desenvolvimento são encontrados apenas dentro de hospedeiros infectados. Os JIs são vetores de bactérias simbióticas dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* (em espécies da família Steinernematidae e Heterorhabditidae, respectivamente), que produzem um coquetel tóxico de metabólitos secundários, rico em nutrientes, essenciais para o desenvolvimento e reprodução dos nematoides, além de evitar a proliferação de microrganismos oportunistas (ALMENARA et al., 2011; DILLMAN et al., 2012; DILLMAN; STERNBERG, 2012).

Ao encontrar o hospedeiro, os juvenis infectivos (JIs) penetram em seu interior através de orifícios naturais, como boca, ânus e espiráculos, ou através da cutícula do inseto, causando sua morte em um período de 24 a 48 horas. Quando os recursos do hospedeiro se esgotam, os JIs sequestram as bactérias simbióticas e se dispersam no solo em busca de novos hospedeiros (DOLINSKI; LACEY, 2007; ALMENARA et al., 2011; DILLMAN et al., 2012; DILLMAN; STERNBERG, 2012; LABAUDE; GRIFFIN, 2018).

O comportamento de localização de hospedeiros pelos NEP depende da espécie e da estratégia de forrageamento, que pode ser do tipo Emboscador, que geralmente ficam à espera do hospedeiro; e os Cruzadores, que buscam ativamente os hospedeiros (SHAPIRO-ILAN et al., 2012; RUAN et al., 2018; MBATA et al., 2019). Independentemente da estratégia de forrageamento, todos os NEP respondem as pistas sensoriais, que podem ser quimiossensoriais, termossensoriais, higosensorial ou mecanossensorial (DILLMAN et al., 2012; FUGA; FERNANDES; LOPES, 2013; MBATA et al., 2019).

As pistas quimiossensoriais estão relacionadas aos voláteis emitidos pelos hospedeiros ou pelo habitat do hospedeiro, como por exemplo CO<sub>2</sub>, os voláteis orgânicos dos hospedeiros e os caimônios liberados por hospedeiros potenciais ou como resultado de danos causados por insetos às plantas hospedeiras, que são percebidas pelos sistemas olfativos especializados dos NEP (DILLMAN; STERNBERG, 2012; MBATA et al., 2019).

O uso de NEP no controle biológico de mosca do mediterrâneo tem sido explorado já na década de 1980 (GIUNTI *et al.*, 2023). Diversos estudos foram desenvolvidos em condição de laboratório e campo para determinar a susceptibilidade de moscas-das-frutas a diversas

espécies de NEP, sendo as espécies *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Rhabditida: Heterorhabditidae) e *Steinernema carpocapsae* (Weiser) (Rhabditida: Steinernematidae) as mais estudadas (ROHDE et al., 2012; DIAS et al., 2018; JAMES; MALAN; ADDISON, 2018; ROHDE; MERTZ; JUNIOR, 2020; JEAN-BAPTISTE et al., 2021; DIAS; MONTOYA; NAVA, 2022; SHAURUB, 2023; ELQDHY et al., 2024).

A patogenicidade dos NEP contra *C. capitata* foi influenciada por fatores físico-químicos e antropogênicos naturais (ELQDHY et al., 2024), incluindo temperatura, umidade, tipos de vegetação, propriedades do solo, resposta imune do hospedeiro, efeitos populacionais e interações com outros organismos (SHAPIRO-ILAN; HILTPOLD; LEWIS, 2017; LABAUDE; GRIFFIN, 2018). A coinfeção por outros entomopatógenos e/ou ação de parasitoides no mesmo hospedeiro, também podem aumentar ou impedir a infecção por NEP (MBATA et al., 2019).

As características do solo também desempenham um papel significativo na eficácia dos NEP. A textura do solo, incluindo sua composição de areia, silte e argila, influencia a movimentação desses nematoides, sendo solos arenosos mais propícios à sua dispersão. A umidade do solo é crucial para sua sobrevivência, enquanto o pH do solo pode afetar sua atividade, pois alguns nematoides têm preferência por faixas específicas de acidez. A presença de matéria orgânica favorece a nutrição desses nematoides, e a temperatura do solo influencia diretamente sua atividade metabólica, sendo esses fatores essenciais para otimizar a ocorrência e eficácia dos nematoides no controle biológico de pragas (ACEVEDO et al., 2005; FUGA; FERNANDES; LOPES, 2013; LABAUDE; GRIFFIN, 2018).

A extensa distribuição geográfica desses organismos sugere habilidades genéticas para se adaptarem e sobreviverem em condições ambientais adversas, como variações na tensão osmótica, mudanças de temperatura e dessecação do solo (WOODRING; KAYA, 1988; FINNEGAN et al., 1999; GLAZER; SALAME, 2000).

Apesar dessa limitação, a utilização dos NEP oferece diversos benefícios, como a redução dos impactos sobre organismos não-alvo, o potencial como ferramenta para o manejo da resistência, maior segurança para os aplicadores e a ausência de intervalo de reentrada para colheita (FUGA; FERNANDES; LOPES, 2013). As espécies mais eficazes de NEP são compatíveis com certos produtos minerais, químicos e biológicos com atividade inseticida, sugerindo que esses produtos podem ser combinados com as NEP como parte de um controle integrado (ELQDHY et al., 2024).

## 2.5 Interação Nematoides Entomopatogênicos e Parasitoides

No manejo da mosca-das-frutas, frequentemente é necessária mais de uma tática. Cada uma dessas táticas apresenta diferentes vantagens e desvantagens, e sua adoção pode ou não estar disponível para todos os casos (SUCKLING et al., 2016).

Apenas um agente de biocontrole não é o suficiente para manter a população de moscas-das-frutas no nível desejado, devido à tolerância extremamente baixa para frutas danificadas para uma colheita comercializável ou frutas exportadas (GIUNTI *et al.*, 2023). Dessa forma, é recomendável utilizar pelo menos um agente para cada fase do ciclo de vida da mosca-das-frutas, para evitar, tanto quanto possível, o surgimento de moscas-das-frutas adultas (PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019).

Nos últimos anos, os pesquisadores têm se dedicado a estudos relacionados ao controle associado, especialmente devido às suas múltiplas vantagens a longo prazo. Isso inclui o eficaz controle da praga, a redução do uso de agrotóxicos e a busca pelo equilíbrio no agroecossistema (ROSSI-ZALAF et al., 2008; POTRICH et al., 2009; LACEY et al., 2015b; SIMIL et al., 2018).

As múltiplas espécies de controle biológico podem atuar de forma sinérgica, aditiva ou antagônica. As interações sinérgicas resultam em uma mortalidade maior do que as mortalidades individuais combinadas da população de pragas, enquanto a mortalidade aditiva ocorre quando os inimigos naturais não interagem, resultando em um nível total de mortalidade equivalente à soma das mortalidades individuais causadas por cada agente (ROY; PELL, 2000).

Uma opção de controle é a combinação de NEP e parasitoides, que pode resultar na coexistência simultânea desses dois agentes no mesmo habitat (CHERGUI et al., 2019). Por isso, torna-se indispensável a avaliação dos prováveis efeitos desses agentes sobre os inimigos naturais (MAGALHÃES; MINNERAT; ALVES, 1998; LABBÉ et al., 2009). Estudos relacionados a casos de interação de entomopatógenos com outros métodos de controle de pragas ainda são pouco conhecidos.

A utilização combinada de parasitoides e NEP para o controle de insetos-praga tem demonstrado ser mais eficaz do que o uso isolado de cada agente. Isso se deve à complementaridade entre os dois métodos de controle biológico, que possibilita a cobertura mais ampla dos estágios de desenvolvimento das pragas. Enquanto os parasitoides podem atuar principalmente nos estágios imaturos das pragas, como ovos e larvas, os NEP podem ser eficazes contra larvas mais maduras ou pupas (POTRICH et al., 2009; LACEY et al., 2015b; SIMIL et al., 2018).

Nesse sentido, a combinação de *Habrobracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) e o nematoide *H. indica* no controle de *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera: Pyralidae) resultou em maior percentual de mortalidade (98,0-99,25%) quando comparado à aplicação isolada de parasitoides ou nematoides, com mortalidade de 62,25% e 71,25%, respectivamente (MBATA; SHAPIRO-ILAN, 2010).

No entanto, os efeitos benéficos dos inimigos naturais nem sempre são aditivos, o que em muitos casos pode ser atribuído a interações interespecíficas, como a competição intraguildd (DE PEDRO; BEITIA; TORMOS, 2022). A competição intraguildd ocorre quando uma espécie predadora consome outra espécie predadora com a qual também compete por presas compartilhadas (VANCE-CHALCRAFT et al., 2007).

Vários ensaios demonstraram que as espécies NEP não exercem efeitos secundários significativos na maioria dos parasitoides de pragas de insetos (ABBAS, 2020). Como é o caso dos nematoide *H. indica* e *H. bacteriophora* que não afetaram a emergência de *Trichogramma chilonis* Ishii e *T. japonicum* Ashmead (Hymenoptera: Trichogrammatidae) em ovos tratados de *Corcyra cephalonica* Stainton (Lepidoptera: Pyralidae) (MOHAN; SABIR, 2005; LALITHA; MANDADI; JALALI, 2012).

Especificamente em relação a moscas-das-frutas, estudos realizados por Heve et al. (2018) demonstraram que a aplicação de *H. bacteriophora*, *S. feltiae* e *H. indica* em frutos de goiaba (*Psidium guajava* L., Myrtaceae) infestados por *Anastrepha suspensa* (Loew) na superfície do solo não impediu o surgimento do parasitoides *D. longicaudata*. Supostamente, os rbdovírus endossimbióticos associados a *D. longicaudata* podem impedir as espécies de NEP de infectarem o parasitoide ou que, talvez a vespa seja naturalmente resistente a infecções por NEP (SIMMONDS; CARRILLO; BURKE, 2016).

No entanto, outros estudos deixam claro o impacto de NEP em larvas de *C. capitata* parasitada por *D. longicaudata*, onde os JIs conseguiram penetrar no hospedeiro mesmo com a presença dos ovos e/ou vírus do parasitoide, resultando em mortalidade superior a 90%, independentemente dos NEP terem ou não a opção de escolha entre larvas saudáveis e parasitadas (SOUZA, 2020).

Souza (2020) demonstrou que a interação entre o parasitoide *D. longicaudata* e os NEP foi prejudicial para o parasitoide, pois a infecção impediu o seu desenvolvimento. Dentre as espécies testadas, o isolado *H. amazonensis* GL (Alho) foi o menos danoso ao parasitoide, causando a menor mortalidade das larvas parasitadas, onde algumas larvas de primeiro ínstar do parasitoide foram encontradas mortas.

Os prejuízos causados pelos NEP em insetos benéficos normalmente estão relacionados a vários fatores: infecção direta da vespa pelo patógeno; competição por recursos reprodutivos, uma vez que o hospedeiro compartilhado não sustenta a prole da vespa enquanto está infectado com o patógeno; transmissão do patógeno pelo parasitoide; incapacidade do parasitoide em reconhecer um hospedeiro infectado; atraso no ciclo biológico e supressão do hospedeiro (MAGALHÃES; MINNERAT; ALVES, 1998; SHANNAG; CAPINERA, 2000; ROSSI-ZALAF et al., 2008; HARVEY; GRIFFIN, 2012).

Larvas do parasitoide *Myxecoristops* sp. (Diptera: Trachinidae) não completaram seu desenvolvimento em larvas de *Cephaleia abietis* (L.) (Hymenoptera: Pamphilidae), a mosca-serra, quando parasitadas, e tratadas com *S. kraussi* (MRÁČEK; SPITZER, 1983). Esses resultados comprovam que os JIs preferem infectar larvas parasitadas em comparação com as não parasitadas (ABBAS, 2020).

Mbata et al. (2019) sugerem que as larvas parasitadas sejam mais infectadas devido à emissão elevada de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e compostos químicos voláteis emitidos por hospedeiros parasitados, que atraem os nematoides e aumentam a infecção. Além disso, a paralisia impede que os hospedeiros escapem dos NEP, enquanto as defesas imunológicas reduzidas em hospedeiros parasitados aumentam a sobrevivência do nematoide.

Outra circunstância ocorre quando o parasitoide perfura um hospedeiro com seu ovipositor para ovipositar, criando uma ferida através da qual o hospedeiro pode ser infectado pelos NEP (QUICKE; BUTCHER, 2021). Todavia, as alterações nas defesas imunes causadas pelos vírus mutualísticos podem apresentar desvantagens para o desenvolvimento do parasitoide, pois conduzem uma cadeia de interações com potenciais consequências para a infecção por nematoides (ZHU et al., 2018; MBATA et al., 2019).

Essas interações ocorrem durante o desenvolvimento larval do parasitoide, interna ou externamente ao hospedeiro, ou quando um hospedeiro já parasitado é infectado pelo patógeno (MAGALHÃES; MINNERAT; ALVES, 1998). Quando ambos agentes ocorrem simultaneamente dentro do hospedeiro em um estágio inicial, os NEP reduzem as chances dos parasitoides completarem seu desenvolvimento, pois produzem metabólitos secundários que alteram drasticamente a qualidade do hospedeiro para o outro organismo, além de serem mais agressivos e gerar uma progênie muito maior, que se espalha rapidamente pela região próxima, ou simplesmente ocorre a morte do parasitoide devido a morte prematura do hospedeiro (MRÁČEK; SPITZER, 1983; EVERARD; GRIFFIN; DILLON, 2009; ATWA et al., 2013; LORDAN et al., 2014).

Dependendo do estágio de desenvolvimento que o parasitoide se encontra no momento da infecção, ocorre variabilidade em sua susceptibilidade aos NEP, devido a uma combinação de fatores imunológicos, adaptativos e físicos, que desempenham um papel importante na proteção desses organismos contra a infecção por patógenos entomopatogênicos (MBATA; SHAPIRO-ILAN, 2010; ATWA et al., 2013).

Nos estudos realizados por Atwa et al. (2013), a interação entre os nematoides *H. bacteriophora* e *S. carpocapsae* com o parasitoide *Microplitis rufiventris* Kokujev (Hymenoptera: Braconidae) em *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) ocorreu quando a inoculação de nematoides foi realizada durante os estágios iniciais, resultando na morte das larvas do parasitoide. No entanto, quando os nematoides foram inoculados durante o desenvolvimento larval tardio do parasitoide, as vespas tiveram chances de completar seu ciclo de vida, evidenciando a multiplicação de ambos parasitoides no mesmo hospedeiro.

É plausível que os parasitoides nos estágios finais de desenvolvimento tenham adquirido uma imunidade mais eficaz contra a infecção pelo NEP em decorrência de adaptações específicas do sistema imunológico do parasitoide (MBATA; SHAPIRO-ILAN, 2010). Normalmente, os JI são mais virulentos para as larvas dos parasitoides, mas não para as pupas ou adultos (ABBAS, 2020).

O nematoide *S. carpocapsae* causou alta mortalidade em larvas de *Cardiochelis diaphaniae* (Marsh) (Hymenoptera: Braconidae), um parasitoide de *Diaphania hyalinata* L. (Lepidoptera, Pyralidae), mas as pupas nos casulos demonstraram resistência à infecção (SHANNAG; CAPINERA, 2000). O mesmo aconteceu para o ectoparasitoide *Bracon hylobii* Ratzeburg (Hymenoptera: Braconidae), onde a aplicação de *H. downesi* ocorreu em seu estágio larval reduziu a formação de casulos e mortalidade de adultos, mas quando suas pupas foram tratadas, a maioria dos adultos emergentes foram mortos pela infecção do nematoide presente no meio (EVERARD; GRIFFIN; DILLON, 2009).

Adicionalmente, a presença de barreiras físicas, como a superfície resistente do casulo pupal do hospedeiro, pode atuar como uma defesa contra a infecção para os parasitoides coinobiontes, como *D. longicaudata* (SHAURUB, 2023). Os adultos de *Necremnus artynes* (Walker) (Hymenoptera: Eulophidae), *Diglyphus isaea* (Walker) (Hymenoptera: Eulophidae), *Dacnusa sibirica* (Telenga) (Hymenoptera: Braconidae), *Trichopria cf. drosophilae* (Perkins) (Hymenoptera: Diapriidae) apresentaram taxas de sobrevivência superiores a 85% quando expostas diretamente a *H. bacteriophora* e *S. feltiae* (GARRIGA et al., 2019).

Nesse sentido, uma boa estratégia a ser utilizada no manejo de insetos-pragas é realizar a aplicação dos agentes biológicos de forma sequencial, como sugerido por Atwa et al. (2013),

de modo que o primeiro agente biológico aplicado tenha tempo suficiente para agir antes da introdução do segundo agente, evitando possíveis interações adversas entre eles. A escolha do intervalo entre as aplicações deve levar em consideração o ciclo de vida das pragas, bem como dos inimigos naturais, a persistência dos agentes biológicos no ambiente e as condições climáticas que podem afetar sua eficácia.

A inoculação tardia dos NEP pode favorecer a capacidade dos parasitoides de detectar e evitar hospedeiros infectados por nematoides ajudaria a reduzir uma interação negativa (LACEY; UNRUH; HEADRICK, 2003). Diversos estudos já comprovaram que algumas fêmeas de parasitoides evitam ovipositar em hospedeiros inadequados, enquanto outras ou não conseguem discriminar entre hospedeiros saudáveis e infectados (ABBAS, 2020).

## **2.6 Efeitos subletais de nematoides entomopatogênicos no desenvolvimento dos hospedeiros**

Efeitos subletais são observados em indivíduos que sobrevivem à exposição a uma substância química ou biológica usada para matar insetos pragas, em doses ou concentrações que não causam mortalidade aparente na população experimental, afetando aspectos fisiológicos ou comportamentais (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007).

A exposição aos produtos químicos afeta negativamente todas as características de tabelas de vida das moscas-das-frutas, incluindo sobrevivência, tempo de desenvolvimento e aptidão reprodutiva, o que também pode ocorrer em outros organismos, como também pode interferir nas funções fisiológicas (EL KHOLY; GIESY; AL NAGGAR, 2021).

Para além dos impactos imediatos observados nos indivíduos diretamente expostos (efeitos de curto prazo), substâncias tóxicas podem também afetar as gerações subsequentes (efeitos de longo prazo). Esses efeitos podem ser amplificados ao longo das cadeias alimentares, resultando em consequências significativas nas interações entre espécies, na dinâmica populacional e nos ecossistemas como um todo (MÜLLER, 2018).

Os efeitos de baixas doses residuais destes produtos químicos em organismos que afetam tanto as espécies-alvo, mas também os insetos benéficos, tornaram-se uma grande preocupação (LALOUETTE et al., 2016). Do ponto de vista humano, os insetos-praga que levam a perdas na produção agrícola são os insetos-alvo, enquanto os organismos benéficos são considerados não-alvos (MÜLLER, 2018).

Estudos de efeitos subletais em insetos-praga são importantes, porque efeitos semelhantes também podem ser observados em organismos benéficos (MÜLLER, 2018).

Entretanto, não se pode prever os efeitos que os insumos toxicológicos podem ter sobre uma espécie com base nos resultados de outra, mesmo quando essas espécies pertencem à mesma família (BANKS et al., 2017).

No entanto, novos parâmetros devem ser considerados, como taxas de malformação ao emergir de pupas, desempenho na aprendizagem, comportamento, neurofisiologia e perturbações no padrão de forrageamento em parasitoides, afetando significativamente sua aptidão e comprometendo o sucesso do controle biológico. (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007; PINHEIRO et al., 2020).

É necessário um avanço adicional no desenvolvimento de métodos padronizados para avaliar esses efeitos nos principais componentes da eficácia dos inimigos naturais antes de incorporá-los aos manejo (DESNEUX; DECOURTYE; DELPUECH, 2007). Diversos estudos registraram efeitos subletais adversos no desenvolvimento larval e pupal, fecundidade, proporção sexual ou oviposição nas famílias Aphelinidae, Encyrtidae, Braconidae, Mymaridae, Trichogrammatidae e Scelionidae (PINHEIRO et al., 2020).

A maioria dos estudos relacionados a efeitos subletais foram realizados com inseticidas. Em relação à exposição de insetos a baixas concentrações de NEP, muitos insetos sobreviveram mesmo quando são invadidos por JIs, porém pouco se sabe sobre o destino e aptidão desses insetos sobreviventes. Ebrahimi et al. (2011) acredita que ao penetrar no hospedeiro, ocorre o encapsulamento celular e a melanização de NEP, o que implica um custo fisiológico para o inseto.

As consequências na fisiologia podem comprometer a saúde e o desempenho reprodutivo dos insetos. A infecção com NEP em estágios adultos e larvais de insetos ocasiona descoloração e afinamento da cutícula, deformações nas asas, antenas e pernas, diminuição dos ovos fertilizados, atraso na eclosão das larvas e implicação na longevidade dos insetos sobreviventes (GIRLING et al., 2010; EBRAHIMI et al., 2014).

Apesar da maioria dos relatos indicarem que as doses e/ou concentrações subletais podem impedir o desenvolvimento dos insetos, reduzindo o crescimento e a sobrevivência, em algumas ocasiões, melhoram o desempenho reprodutivo, pois baixas doses podem induzir efeitos positivos inesperados (horméticos), levando a surtos no crescimento da população de pragas. No entanto, os efeitos são específicos da espécie, mas a sensibilidade também difere de acordo com o estágio de desenvolvimento, do sexo e da população (LALOUETTE et al., 2016; MÜLLER, 2018).

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. S. T. Interactions between Entomopathogenic Nematodes and Entomophagous Insects. **Advances in Entomology**, v. 08, n. 04, p. 147–157, 2020. doi: 10.4236/ae.2020.84011.
- ACEVEDO, J. P. M.; MOINO JR, A.; CAVALCANTI, R. S.; DOLINSKI, C.; CARVALHO, F. A. Amostragem e Avaliação de Técnicas para Isolamento de Nematóides Entomopatogênicos Nativos Obtidos em Lavras, Minas Gerais. **Nematologia Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 17–23, 2005.
- ALMENARA, D. P.; NEVES, M. R. de C.; KAMITANI, F. L.; WINTER, C. E. Nematoides entomopatogênicos: as duas faces de uma simbiose. **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 1–6, 2011. doi: 10.7594/revbio.06b.01.
- ATWA, A. A.; HEGAZI, E. M.; KHAFAGI, W. E.; EL-AZIZ, G. M. A. Interaction of the koinobiont parasitoid *Microplitis rufiventris* of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*, with two entomopathogenic Rhabditids, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. **Journal of insect science (Online)**, v. 13, p. 84, 2013. doi: 10.1673/031.013.8401.
- BADII, K. B.; BILLAH, M. K.; AFREH NUAMAH, K.; OBENG OFORI, D.; NYARKO, G. Review of the pest status, economic impact and management of fruit-infesting flies (Diptera: Tephritidae) in Africa. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 12, p. 1488–1498, 2015. doi: 10.5897/ajar2014.9278.
- BAKER, B. P.; GREEN, T. A.; LOKER, A. J. Biological control and integrated pest management in organic and conventional systems. **Biological Control**, v. 140, p. 104095, 2020. doi: 10.1016/J.BIOCONTROL.2019.104095.
- BALI, E.-M. D.; MORAITI, C. A.; IOANNOU, C. S.; MAVRAGANIS, V.; PAPADOPOULOS, N. T. Evaluation of Mass Trapping Devices for Early Seasonal Management of *Ceratitis Capitata* (Diptera: Tephritidae) Populations. **Agronomy**, v. 11, n. 6, p. 1101, 2021. doi: 10.3390/agronomy11061101.
- BANKS, J.; VARGAS, R.; ACKLEH, A.; STARK, J. Sublethal Effects in Pest Management: A Surrogate Species Perspective on Fruit Fly Control. **Insects**, v. 8, n. 3, p. 78, 2017. doi: 10.3390/insects8030078.
- BARONIO, C. A.; BERNARDI, D.; SCHUTZE, I. X.; BALDIN, M. M.; MACHOTA, R.; GARCIA, F. R. M.; BOTTON, M. Toxicities of Insecticidal Toxic Baits to Control *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): Implications for Field Management. **Journal of Economic Entomology**, 2019. doi: 10.1093/jee/toz194.
- BRASIL. **Instrução Normativa MAPA nº 20 de 13/07/2010.**
- BURNELL, A.; STOCK, S. P. *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts — lethal pathogens of insects. **Nematology**, v. 2, n. 1, p. 31–42, 2000. doi: 10.1163/156854100508872.

CAMARGOS, M. G.; COSTA, M. de L. Z.; MIRANDA, E. D. S. Custos variáveis de produção de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) para controle de moscas-das-frutas. **Revista iPecege**, v. 3, n. 2, p. 9, 2017. doi: 10.22167/r.ipecege.2017.2.9.

CARVALHO, S. C.; NASCIMENTO, A. S.; MATRANGOLO, W. J. R. Controle biológico. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Holos ed. [s.l: s.n.] p. 113–117. 2000.

CHERGUI, S.; BENZEHRA, A.; BOUDJEMAA, K.; BARKOU, H.; KARACA, I. Efficacy of Turkish isolate of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) in controlling the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), under laboratory conditions. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 29, n. 60, 2019. doi: 10.1186/s41938-019-0162-4.

DE PEDRO, L.; BEITIA, F.; TORMOS, J. Two Better Than One? Potential Effects of Intraguild Predation on the Biological Control of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) by the Parasitoid *Aganaspis daci* (Hymenoptera: Figitidae) and the Predator *Pseudoophonus rufipes* (Co. **Agronomy**, v. 13, n. 1, p. 87, 2022. doi: 10.3390/agronomy13010087.

DESNEUX, N.; DECOURTYE, A.; DELPUECH, J.-M. The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 52, n. 1, p. 81–106, 2007. doi: 10.1146/annurev.ento.52.110405.091440.

DIAS, N. P.; MONTOYA, P.; NAVA, D. E. A 30-year systematic review reveals success in tephritid fruit fly biological control research. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 170, n. 5, p. 370–384, 2022. doi: 10.1111/EEA.13157.

DIAS, N. P.; ZOTTI, M. J.; MONTOYA, P.; CARVALHO, I. R.; NAVA, D. E. Fruit fly management research: A systematic review of monitoring and control tactics in the world. **Crop Protection**, v. 112, p. 187–200, 2018. doi: 10.1016/J.CROPRO.2018.05.019.

DILLMAN, A. R.; GUILLERMIN, M. L.; LEE, J. H.; KIM, B.; STERNBERG, P. W.; HALLEM, E. A. Olfaction shapes host-parasite interactions in parasitic nematodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 35, p. E2324–E2333, 2012. doi: 10.1073/pnas.1211436109.

DILLMAN, A. R.; STERNBERG, P. W. Entomopathogenic nematodes. **Current Biology**, v. 22, n. 11, p. R430–R431, 2012. doi: 10.1016/j.cub.2012.03.047.

DOLINSKI, C.; LACEY, L. A. Microbial control of arthropod pests of tropical tree fruits. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 2, p. 161–179, 2007. doi: 10.1590/S1519-566X2007000200001.

EBRAHIMI, L.; NIKNAM, G.; DUNPHY, G. B.; TOORCHI, M. Side effects of immune response of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* against the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* infection Abstract Entomopathogenic nematodes (EPNs) are lethal pathogens of agricultural. **Invertebrate survival journal**, v. 11, n. 1, p. 132–142, 2014.

EBRAHIMI, L.; NIKNAM, G.; LEWIS, E. E. Lethal and sublethal effects of Iranian isolates of *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora* on the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. **BioControl**, v. 56, n. 5, p. 781–788, 2011. doi: 10.1007/s10526-011-9343-0.

EL KHOLY, S.; GIESY, J. P.; AL NAGGAR, Y. Consequences of a short-term exposure to a sub lethal concentration of CdO nanoparticles on key life history traits in the fruit fly (*Drosophila melanogaster*). **Journal of Hazardous Materials**, v. 410, p. 124671, 2021. doi: 10.1016/j.jhazmat.2020.124671.

ELQDHY, M.; AIT HAMZA, M.; ASKARNE, L.; FOSSATI-GASCHIGNARD, O.; LAKHTAR, H.; EL MOUSADIK, A.; AIT BENOUMAR, A.; MSANDA, F.; BOUBAKER, H. Biology, ecology and control of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae), with special reference to biological control using entomopathogenic nematode (EPN): a review. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 131, n. 2, p. 365–402, 2024. doi: 10.1007/s41348-023-00855-0.

EVERARD, A.; GRIFFIN, C. T.; DILLON, A. B. Competition and intraguild predation between the braconid parasitoid *Bracon hylobii* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis downesi*, natural enemies of the large pine weevil, *Hylobius abietis*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 99, n. 02, p. 151, 2009. doi: 10.1017/S0007485308006287.

FAO, F. and A. O. **NIMF N° 26 Establecimiento de áreas libres de pragas para moscas-das-frutas (Tephritidae)**. [s.l: s.n.]

FAO, F. and A. O. **ISPM 35 - Systems approach for pest risk management of fruit flies (Tephritidae)**. [s.l: s.n.]

FERRAZ, L. C. C. B.; LEITE, L. G.; LOPES, R. B.; MOINO JR, A.; DOLINSKI, C. Utilização de nematóides para o controle de pragas agrícolas e urbanas. In: **Controle Microbiano de pragas na América Latina**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 171–202. 2008.

FINNEGAN, M. M.; DOWNES, M. J.; O'REGAN, M.; GRIFFIN, C. T. Effect of salt and temperature stresses on survival and infectivity of *Heterorhabditis* spp. IJs. **Nematology**, v. 1, n. 1, p. 69–78, 1999.

FOLLETT, P. A.; HAYNES, F. E. M.; DOMINIAK, B. C. Host Suitability Index for Polyphagous Tephritid Fruit Flies. **Journal of Economic Entomology**, v. 114, n. 3, p. 1021–1034, 2021. doi: 10.1093/jee/toab035.

FUGA, C. A. G.; FERNANDES, R. H.; LOPES, E. A. Nematoides entomopatogênicos. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 6, n. 3, 2013. doi: 10.0000/RTCAB.V6I3.900.

GARCIA, F. R. M.; RICALDE, M. P. Augmentative biological control using parasitoids for fruit fly management in Brazil. **Insects**, v. 4, n. 1, p. 55–70, 2013. doi: 10.3390/insects4010055.

- GARRIGA, A.; MORTON, A.; GARCÍA-LÓPEZ, D.; GARCÍA-DEL-PINO, F. Compatibility of entomopathogenic nematodes with natural enemies for horticultural pest control. **Biological Control**, v. 138, p. 104050, 2019. doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.104050.
- GHABBARI, M.; GUARINO, S.; CALECA, V.; SAIANO, F.; SINACORI, M.; BASER, N.; MADIOUNI-BEN JEMÂA, J.; LO VERDE, G. Behavior-modifying and insecticidal effects of plant extracts on adults of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae). **Journal of Pest Science**, v. 91, n. 2, 2018. doi: 10.1007/s10340-018-0952-6.
- GIRLING, R. D.; ENNIS, D.; DILLON, A. B.; GRIFFIN, C. T. The lethal and sub-lethal consequences of entomopathogenic nematode infestation and exposure for adult pine weevils, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, n. 3, p. 195–202, 2010. doi: 10.1016/j.jip.2010.04.003.
- GIUNTI, G.; BENELLI, G.; CAMPOLO, O.; CANALE, A.; KAPRANAS, A.; LIEDO, P.; DE MEYER, M.; NESTEL, D.; RUIU, L.; SCOLARI, F.; WANG, X.; PAPADOPOULOS, N. T. Management of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*: past, present, and future. **Entomologia Generalis**, v. 43, n. 6, p. 1241–1263, 2023. doi: 10.1127/entomologia/2023/2136.
- GLAZER, I.; SALAME, L. Osmotic survival of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. **Biological control**, v. 18, n. 3, p. 251–257, 2000.
- GREWAL, P. S. Anhydrobiotic potential and long-term storage of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 9, p. 995–1000, ago. 2000. doi: 10.1016/S0020-7519(00)00080-1.
- GUTIERREZ, A. P.; PONTI, L. Assessing the invasive potential of the Mediterranean fruit fly in California and Italy. **Biological Invasions**, v. 13, n. 12, p. 2661–2676, 29 dez. 2011. doi: 10.1007/s10530-011-9937-6.
- GUTIERREZ, A. P.; PONTI, L.; NETELER, M.; SUCKLING, D. M.; CURE, J. R. Invasive potential of tropical fruit flies in temperate regions under climate change. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 1141, 30 set. 2021. doi: 10.1038/s42003-021-02599-9.
- HARAN, J.; GROVE, T.; VAN NOORT, S.; BENOIT, L.; ADDISON, P. Natural biocontrol of fruit flies in indigenous hosts: A perspective for population control in the agroecosystem. **Biological Control**, v. 137, p. 104022, 2019. doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.104022.
- HARBI, A.; BEITIA, F.; FERRARA, F.; CHERMITI, B.; SABATER-MUÑOZ, B. Functional response of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) over *Ceratitis capitata* (Wiedemann): Influence of temperature, fruit location and host density. **Crop Protection**, v. 109, p. 115–122, 2018. doi: 10.1016/j.cropro.2018.03.010.
- HARBI, A.; CHERMITI, K. A. B.; MARTINS, D.; HAFSI, A.; SABATER-MOÑOZ, B. Life History Parameters of *Diachasmimorpha longicaudata* on *Ceratitis capitata* Under Laboratory Conditions: Implications for Mass Rearing and Biological Control. **Tunisian Journal of Plant Protection**, v. 11, n. 2, p. 207–217, 2016.
- HARBI, A.; DE PEDRO, L.; FERRARA, F. A. A.; TORMOS, J.; CHERMITI, B.; BEITIA,

- F.; SABATER-MUNOZ, B. *Diachasmimorpha longicaudata* Parasitism Response to Medfly Host Fruit and Fruit Infestation Age. **Insects**, v. 10, n. 7, p. 211, 2019. doi: 10.3390/insects10070211.
- HARVEY, C. D.; GRIFFIN, C. T. Host activity and wasp experience affect parasitoid wasp foraging behaviour and oviposition on nematode-infected larvae of the forestry pest *Hylobius abietis*. **Ecological Entomology**, v. 37, n. 4, p. 269–282, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2311.2012.01362.x.
- HERNÁNDEZ-ORTIZ, V.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; DZUL-CAUICH, J. F. Sampling Methods of True Fruit Flies (Tephritidae). In: **Measuring Arthropod Biodiversity**. [s.l.: s.n.] p. 205–222. 2021.
- HEVE, W. K.; EL-BORAI, F. E.; CARRILLO, D.; DUNCAN, L. W. Biological control potential of entomopathogenic nematodes for management of Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* Loew (Tephritidae). **Pest Management Science**, v. 73, n. 6, p. 1220–1228, 2017. doi: 10.1002/ps.4447.
- HEVE, W. K.; EL-BORAI, F. E.; JOHNSON, E. G.; CARRILLO, D.; CROW, W. T.; DUNCAN, L. W. Responses of *Anastrepha suspensa*, *Diachasmimorpha longicaudata*, and Sensitivity of Guava Production to *Heterorhabditis bacteriophora* in Fruit Fly Integrated Pest Management. **Journal of Nematology**, v. 50, n. 3, p. 261–272, 2018. doi: 10.21307/jofnem-2018-039.
- IMPERATO, R.; RAGA, A. **Técnica do Inseto Estéril**. 2015
- JAMES, M.; MALAN, A. P.; ADDISON, P. Surveying and screening South African entomopathogenic nematodes for the control of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann). **Crop Protection**, v. 105, p. 41–48, 2018. doi: 10.1016/J.CROPRO.2017.11.008.
- JEAN-BAPTISTE, M. C.; DE BRIDA, A. L.; BERNARDI, D.; DA COSTA DIAS, S.; DE BASTOS PAZINI, J.; LEITE, L. G.; WILCKEN, S. R. S.; GARCIA, F. R. M. Effectiveness of Entomopathogenic Nematodes Against *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) Pupae and Nematode Compatibility with Chemical Insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 114, n. 1, p. 248–256, 2021. doi: 10.1093/jee/toaa301.
- LABAUDE, S.; GRIFFIN, C. T. Transmission Success of Entomopathogenic Nematodes Used in Pest Control. **Insects**, v. 9, n. 2, p. 72, 2018. doi: 10.3390/insects9020072.
- LABBÉ, R. M.; GILLESPIE, D. R.; CLOUTIER, C.; BRODEUR, J. Compatibility of an entomopathogenic fungus with a predator and a parasitoid in the biological control of greenhouse whitefly. **Biocontrol Science and Technology**, v. 19, n. 4, p. 429–446, 2009. doi: 10.1080/09583150902803229.
- LACEY, L. A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M. S. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1–41, nov. 2015. doi: 10.1016/j.jip.2015.07.009.

LACEY, L. A.; UNRUH, T. R.; HEADRICK, H. L. Interactions of two idiobiont parasitoids (Hymenoptera: Ichneumonidae) of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) with the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 83, n. 3, p. 230–239, 2003. doi: 10.1016/S0022-2011(03)00102-2.

LALITHA, Y.; MANDADI, N.; JALALI, S. K. Intraguild predation and biosafety of entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar et al. and its bacterial symbionts, *Photorhabdus luminescens*, to parasitoid, *Trichogramma chilonis* Ishii and predator, *Chrysoperla*. **Journal of Biological Control**, v. 26, n. 4, p. 334–340, 2012.

LALOUETTE, L.; POTTIER, M. A.; WYCKE, M. A.; BOITARD, C.; BOZZOLAN, F.; MARIA, A.; DEMONDION, E.; CHERTEMPS, T.; LUCAS, P.; RENAULT, D.; MAIBECHÉ, M.; SIAUSSAT, D. Unexpected effects of sublethal doses of insecticide on the peripheral olfactory response and sexual behavior in a pest insect. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 4, p. 3073–3085, 2016. doi: 10.1007/S11356-015-5923-3/METRICS.

LORDAN, J.; ALEGRE, S.; ALINS, G.; SARASÚA, M. J.; MORTON, A.; GARCÍA DEL PINO, F. Compatibility between *Forficula auricularia* and entomopathogenic nematodes to be used in pome fruit pest management. **Journal of Applied Entomology**, v. 138, n. 9, p. 635–643, 2014. doi: 10.1111/jen.12118.

LOUZEIRO, L. R. F.; SOUZA-FILHO, M. F. de; RAGA, A.; GISLOTI, L. J. Incidence of frugivorous flies (Tephritidae and Lonchaeidae), fruit losses and the dispersal of flies through the transportation of fresh fruit. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 24, n. 1, p. 50–60, 2021. doi: 10.1016/j.aspen.2020.11.006.

LOUZEIRO, L. R. F.; SOUZA-FILHO, M. F. de; RAGA, A.; SCHMIDT, F. L. Relationship between fruit fly (Diptera: Tephritidae) infestation and the physicochemical changes in fresh fruits. **African Journal of Agricultural Research**, v. 15, n. 1, p. 122–133, 2020. doi: 10.5897/AJAR2019.14533.

MAGALHÃES, B. P.; MINNERAT, R.; ALVES, S. B. Interações entre entomopatogénos, parasitoides e predadores. In: ALVES, S. B. (Ed.). **Controle Microbiano de Insetos**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 195–216. 1998.

MARUBAYASHI, R. Y. P.; OLIVEIRA, R. B. de; FERREIRA, M. da C.; ROGGIA, S.; MORAES, E. D. de; SAAB, O. J. G. A. Insecticide spray drift reduction with different adjuvants and spray nozzles. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 25, n. 4, p. 282–287, 2021. doi: 10.1590/1807-1929/agriambi.v25n4p282-287.

MBATA, G. N.; SHAPIRO-ILAN, D. I. Compatibility of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Biological Control**, v. 54, n. 2, p. 75–82, 2010. doi: 10.1016/J.BIOCONTROL.2010.04.009.

MBATA, G. N.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; ALBORN, H. T.; STRAND, M. R. Preferential infectivity of entomopathogenic nematodes in an envenomed host. **International Journal for Parasitology**, v. 49, n. 9, p. 737–745, 2019. doi: 10.1016/j.ijpara.2019.05.002.

MEIRELLES, R. N.; REDAELLI, L. R.; OURIQUE, C. B. Comparative Biology of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) Reared on *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, v. 96, n. 2, p. 412–418, 2013. doi: 10.1653/024.096.0204.

MEIRELLES, R. N.; REDAELLI, L. R.; OURIQUE, C. B. Thermal Requirements and Annual Number of Generations of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) Reared in the South American Fruit Fly and the Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, v. 98, n. 4, p. 1223–1226, 2015. doi: 10.1653/024.098.0432.

MOHAN, S.; SABIR, N. Biosafety concerns on the use of *Photorhabdus luminescens* as biopesticide: experimental evidence of mortality in egg parasitoid *Trichogramma* spp. **Current Science**, v. 89, n. 7, p. 1268–1272, 2005.

MRÁČEK, Z.; SPITZER, K. Interaction of the predators and parasitoids of the sawfly, *Cephalcia abietis* (Pamphilidae: Hymenoptera) with its nematode *Steinernema kraussei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 42, n. 3, p. 397–399, 1983. doi: 10.1016/0022-2011(83)90181-7.

MÜLLER, C. Impacts of sublethal insecticide exposure on insects — Facts and knowledge gaps. **Basic and Applied Ecology**, v. 30, p. 1–10, 2018. doi: 10.1016/j.baae.2018.05.001.

NASCIMENTO, A. S. do; CARVALHO, R. da S.; MALAVASI, A. Monitoramento populacional. 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. 109–112. 2000.

PALADINO, L. Z. C.; PAPESCHI, A. G.; CLADERA, J. L. Immature Stages of Development in the Parasitoid Wasp, *Diachasmimorpha longicaudata*. **Journal of Insect Science**, v. 10, n. 56, p. 1–13, 2010. doi: 10.1673/031.010.5601.

PAPADOPOULOS, N. T. Fruit Fly Invasion: Historical, Biological, Economic Aspects and Management. In: **Trapping and the Detection, Control, and Regulation of Tephritid Fruit Flies**. [s.l: s.n.] p. 219–252. 2014.

PARANHOS, B. A. J.; LIMA, T. C. da C.; GAMA, F. de C. Controle de Moscas-das-Frutas no Vale do São Francisco. In: **Instruções Técnicas da Embrapa Semiárido**. Petrolina: Embrapa, 2013. 2013.

PARANHOS, B. J.; NAVA, D. E.; MALAVASI, A. **Biological control of fruit flies in Brazil**. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2019. . doi: 10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.26037.

PINHEIRO, L. A.; DÁDER, B.; WANUMEN, A. C.; PEREIRA, J. A.; SANTOS, S. A. P.; MEDINA, P. Side Effects of Pesticides on the Olive Fruit Fly Parasitoid *Psytalia concolor* (Szépligeti): A Review. **Agronomy**, v. 10, n. 11, p. 1755, 2020. doi: 10.3390/agronomy10111755.

PLÁ, I.; GARCÍA DE OTEYZA, J.; TUR, C.; MARTÍNEZ, M. Á.; LAURÍN, M. C.; ALONSO, E.; MARTÍNEZ, M.; MARTÍN, Á.; SANCHIS, R.; NAVARRO, M. C.; NAVARRO, M. T.; ARGILÉS, R.; BRIASCO, M.; DEMBILIO, Ó.; DALMAU, V. Sterile Insect Technique Programme against Mediterranean Fruit Fly in the Valencian Community (Spain). *Insects*, v. 12, n. 5, p. 415, 2021. doi: 10.3390/INSECTS12050415.

POTRICH, M.; CAPPELLARI, C.; COSTA, J. H. B. da; ROMAN, J.; BONINI, A. K.; SILVA, E. R. L. Ação de Fungos Entomopatogênicos sobre o Parasitismo de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Revista Brasileira de Agroecologia*, v. 4, n. 2, p. 1995–1998, 2009.

PRESA-PARRA, E.; HERNÁNDEZ-ROSAS, F.; BERNAL, J. S.; VALENZUELA-GONZÁLEZ, J. E.; MARTÍNEZ-TLAPA, J.; BIRKE, A. Impact of *Metarhizium robertsii* on Adults of the Parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* and Parasitized *Anastrepha ludens* Larvae. *Insects*, v. 12, n. 2, p. 125, 2021. doi: 10.3390/insects12020125.

QIN, Y.; PAINI, D. R.; WANG, C.; FANG, Y.; LI, Z. Global Establishment Risk of Economically Important Fruit Fly Species (Tephritidae). *PLOS ONE*, v. 10, n. 1, p. e0116424, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0116424.

QUICKE, D. L. J.; BUTCHER, B. A. Review of Venoms of Non-Polydnavirus Carrying Ichneumonoid Wasps. *Biology*, v. 10, n. 1, p. 50, 2021. doi: 10.3390/biology10010050.

RAHMAN, T.; BROUGHTON, S. Evaluation of thiacloprid and clothianidin (neonicotinoids) as alternative to fenthion (organophosphate) for control of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) in deciduous fruit orchards. *Crop Protection*, v. 90, p. 170–176, 2016a. doi: 10.1016/j.cropro.2016.09.001.

RAHMAN, T.; BROUGHTON, S. Suppressing Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) with an attract-and-kill device in pome and stone fruit orchards in Western Australia. *Crop Protection*, v. 80, p. 108–117, 2016b. doi: 10.1016/j.cropro.2015.11.005.

ROHDE, C.; MERTZ, N. R.; JUNIOR, A. M. Entomothogenic Nematodes on control of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Revista Caatinga*, v. 33, n. 4, p. 974–984, 2020. doi: 10.1590/1983-21252020v33n412rc.

ROHDE, C.; MOINO JUNIOR, A.; CARVALHO, F. D.; SILVA, M. A. T. Selection of entomopathogenic nematodes for the control of the fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v. 7, n. suppl., p. 797–802, 2012. doi: 10.5039/agraria.v7isa2217.

ROHDE, C.; MOINO JUNIOR, A.; KRUPA, P.; RAMALHO, K. R. de O. Compatibilidade de nematóides entomopatogênicos e extratos vegetais aquosos visando o controle da mosca-das-frutas *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Semina: Ciências Agrárias*, v. 34, n. 3, 2013. doi: 10.5433/1679-0359.2013v34n3p1033.

ROHR, R. A.; JAHNKE, S. M.; REDAELLI, L. R. Does *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) have a preferential instar to parasitize Tephritidae (Diptera)? *Iheringia - Serie Zoologia*, v. 109, p. e2019014, 2019. doi: 10.1590/1678-4766e2019014.

- ROSSI-ZALAF, L. S.; ALVES, S. B.; LOPRS, R. B.; SILVEIRA NETO, S.; TANZINI, M. R. Interação de microrganismos com outros agentes de controle de pragas e doenças. In: **Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios**. [s.l: s.n.] p. 279–302. 2008.
- ROY, H. E.; PELL, J. K. Interactions Between Entomopathogenic Fungi and Other Natural Enemies: Implications for Biological Control. **Biocontrol Science and Technology**, v. 10, n. 6, p. 737–752, 2000. doi: 10.1080/09583150020011708.
- RUAN, W.; SHAPIRO-ILAN, D.; LEWIS, E. E.; KAPLAN, F.; ALBORN, H.; GU, X.; SCHLIEKELMAN, P. Movement patterns in Entomopathogenic nematodes: Continuous vs. temporal. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 151, p. 137–143, 2018. doi: 10.1016/j.jip.2017.11.010.
- SALERNO, G.; REBORA, M.; PIERSANTI, S.; GORB, E.; GORB, S. Mechanical ecology of fruit-insect interaction in the adult Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Zoology**, v. 139, p. 125748, 2020. doi: 10.1016/j.zool.2020.125748.
- SCIARRETTA, A.; TABILIO, M. R.; AMORE, A.; COLACCI, M.; MIRANDA, M. Á.; NESTEL, D.; PAPADOPOULOS, N. T.; TREMATERRA, P. Defining and Evaluating a Decision Support System (DSS) for the Precise Pest Management of the Mediterranean Fruit Fly, *Ceratitidis capitata*, at the Farm Level. **Agronomy**, v. 9, n. 10, p. 608, 2019. doi: 10.3390/agronomy9100608.
- SCIARRETTA, A.; TABILIO, M. R.; LAMPAZZI, E.; CECCAROLI, C.; COLACCI, M.; TREMATERRA, P. Analysis of the Mediterranean fruit fly [*Ceratitidis capitata* (Wiedemann)] spatio-temporal distribution in relation to sex and female mating status for precision IPM. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0195097, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0195097.
- SHANNAG, H. K.; CAPINERA, J. L. Interference of *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) with *Cardiochiles diaphaniae* (Hymenoptera: Braconidae), a Parasitoid of Melonworm and Pickleworm (Lepidoptera: Pyralidae). **Environmental Entomology**, v. 29, n. 3, p. 612–617, 2000. doi: 10.1603/0046-225X-29.3.612.
- SHAPIRO-ILAN, D. I.; LEWIS, E. E.; CAMPBELL, J. F.; KIM-SHAPIRO, D. B. Directional movement of entomopathogenic nematodes in response to electrical field: effects of species, magnitude of voltage, and infective juvenile age. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 109, n. 1, p. 34–40, 2012. doi: 10.1016/j.jip.2011.09.004.
- SHAPIRO-ILAN, D. I.; HILTPOLD, I.; LEWIS, E. E. Nematodes. In: **Ecology of Invertebrate Diseases**. [s.l: s.n.] p. 415–440. 2017.
- SHAURUB, E. H. Review of entomopathogenic fungi and nematodes as biological control agents of tephritid fruit flies: current status and a future vision. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 171, n. 1, p. 17–34, 2023. doi: 10.1111/eea.13244.
- SHAURUB, E. H.; SOLIMAN, N. A.; HASHEM, A. G.; ABDEL-RAHMAN, A. M. Infectivity of four entomopathogenic nematodes in relation to environmental factors and their effects on the biochemistry of the Medfly *Ceratitidis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**, v. 44, n. 6, p. 610–618, 2015. doi: 10.1007/s13744-015-0332-3.

SIMIL, L. D.; LEITE, L. G.; TREVISAN, O.; COSTA, J. N. M.; OLIVEIRA, L. E.; SCHMIDT, F. S.; BUENO, R. N. da S.; BATISTA FILHO, A. Mortality of *Conotrachelus humeropictus* in response to combined application of the nematode *Steinernema brazilense* and the fungus *Beauveria bassiana*. **Arq. Inst. Biol.**, v. 85, n. 1, p. 1–9, 2018. doi: 10.1590/1808-1657000092016.

SIMMONDS, T. J.; CARRILLO, D.; BURKE, G. R. Characterization of a venom gland-associated rhabdovirus in the parasitoid wasp *Diachasmimorpha longicaudata*. **Journal of Insect Physiology**, v. 91–92, p. 48–55, 2016. doi: 10.1016/j.jinsphys.2016.06.009.

SOUZA, M. M. **Interação de nematoides entomopatogênicos com o parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) para o controle de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)**. 2020. UFLA, 2020.

STECK, G. J.; EKESI, S. Description of third instar larvae of *Ceratitis fasciventris*, *C. anonae*, *C. rosa* (FAR complex) and *C. capitata* (Diptera, Tephritidae). **ZooKeys**, v. 540, p. 443–466, 2015. doi: 10.3897/zookeys.540.10061.

SUCKLING, D. M.; KEAN, J. M.; STRINGER, L. D.; CÁCERES-BARRIOS, C.; HENDRICH, J.; REYES-FLORES, J.; DOMINIÁK, B. C. Eradication of tephritid fruit fly pest populations: outcomes and prospects. **Pest Management Science**, v. 72, n. 3, p. 456–465, mar. 2016. doi: 10.1002/ps.3905.

THOMAS, M. C.; HEPPNER, J. B.; WOODRUFF, R. E.; WEEMS, H. V.; STECK, G. J. **Mediterranean fruit fly - *Ceratitis capitata* (Wiedemann)**.

THOMPSON, C. R. **A parasitoid wasp - *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead)**. . Acesso em: 29 jan. 2024.

TORRES-BARRAGAN, A.; SUAZO, A.; BUHLER, W. G.; CARDOZA, Y. J. Studies on the entomopathogenicity and bacterial associates of the nematode *Oscheius carolinensis*. **Biological Control**, v. 59, n. 2, p. 123–129, 2011. doi: 10.1016/j.biocontrol.2011.05.020.

TORRES, J. B.; MARQUES, E. J. Tomada de decisão: um desafio para o manejo integrado de pragas. In: TORRES, J.B.; MICHEREFF, S. J. (Ed.). **Desafios do manejo integrado de pragas e doenças**. Recife: UFRPE, 2000. p. 152–173. 2000.

TROMBIK, J.; WARD, S. F.; NORRBOM, A. L.; LIEBHOLD, A. M. Global drivers of historical true fruit fly (Diptera: Tephritidae) invasions. **Journal of Pest Science**, v. 96, n. 1, p. 345–357, 2022. doi: 10.1007/S10340-022-01498-0/TABLES/5.

VANCE-CHALCRAFT, H. D.; ROSENHEIM, J. A.; VONESH, J. R.; OSENBERG, C. W.; SIH, A. The influence of intraguild predation on prey suppression and prey release: a meta-analysis. **Ecology**, v. 88, n. 11, p. 2689–2696, 2007. doi: 10.1890/06-1869.1.

VONTAS, J.; HERNÁNDEZ-CRESPO, P.; MARGARITOPOULOS, J. T.; ORTEGO, F.; FENG, H.-T.; MATHIOPOULOS, K. D.; HSU, J.-C. Insecticide resistance in Tephritid flies. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 100, n. 3, p. 199–205, 2011. doi: 10.1016/j.pestbp.2011.04.004.

WELDON, C. *Ceratitis capitata* (Mediterranean fruit fly). **CABI Compendium**, 2020.

WHITE, I. M.; ELSON-HARRIS, M. M. **Fruit Flies of Economic Significance: Their Identification and Bionomics**. [s.l: s.n.]

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. Steinernematidae and Heterorhabditidae nematodes: a handbook of techniques southern cooperative. In: **Series Bulletin**. [s.l: s.n.]1988.

ZHU, F.; CUSUMANO, A.; BLOEM, J.; WELDEGERGIS, B. T.; VILLELA, A.; FATOUROS, N. E.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M.; HARVEY, J. A.; VOGEL, H.; POELMAN, E. H. Symbiotic polydnavirus and venom reveal parasitoid to its hyperparasitoids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 20, p. 5205–5210, 2018. doi: 10.1073/pnas.1717904115.

ZUCCHI, R. A.; MORAES, R. C. . **Fruit flies in Brazil - Hosts and parasitoids of the Mediterranean fruit fly**.2024 . Acesso em: 5 dez. 2023.

**ARTIGO 1**

**PARASITISMO DE *Diachasmimorpha longicaudata* (HYMENOPTERA:  
BRACONIDAE) EM LARVAS DE *Ceratitis capitata* (DIPTERA: TEPHRITIDAE)  
INFECTADAS POR NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS**

## RESUMO

*Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) são pragas significativas na fruticultura, sendo controladas atualmente com o parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). Estudos recentes mostraram o uso de nematoides entomopatogênicos (NEP) no controle de moscas-das-frutas. No entanto, larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata* possuem susceptibilidade aos NEP maior que as larvas não parasitadas, indicando a necessidade de estratégias de liberação que avaliem a sequência ideal para maximizar a eficácia do controle biológico integrado. Assim, objetivou-se avaliar a capacidade do parasitoide *D. longicaudata* em distinguir larvas de *C. capitata* sadias e infectadas por NEP. Para isso, foram ofertadas larvas de *C. capitata* previamente infectadas por *Heterorhabditis amazonensis* GL e larvas sadias em um recipiente contendo uma fêmea de *D. longicaudata*, com e sem chance de escolha. Após 24 horas, foram observadas cicatrizes de oviposição, a presença dos ovos do parasitoide e dos juvenis infectates (JI) nas larvas mortas, e as sadias foram deixadas para a emergência do parasitoide e/ou mosca. Não foi observada diferença na frequência de visitas do parasitoide entre larvas sadias e larvas infectadas. No entanto, o parasitoide preferiu as larvas sadias quando tinha ou não chance de escolha, não sendo constatada a presença de ovos de *D. longicaudata* em larvas infectadas, o que indica que as marcas eram picadas de prova, para verificar se o hospedeiro era adequado para o desenvolvimento da prole. Como as condições eram inóspitas, eles não depositaram seus ovos. Com isso, conclui-se que o parasitoide *D. longicaudata* consegue perceber quando seus hospedeiros se encontram infectados por NEP, permitindo o uso destes agentes NEP juntamente com parasitoide para o controle da mosca-das-frutas *C. capitata*, desde que a liberação do parasitoide ocorra depois da inoculação dos NEP.

**Palavras-chave:** agentes biológicos; interação entomófagos-entomopatógenos; teste de preferência.

## INTRODUÇÃO

As moscas-das-frutas pertencentes à família Tephritidae, são consideradas pragas-chaves de diversas culturas, sendo a espécie *Ceratitis capitata* (Wiedemman) considerada de importância econômica e quarentenária (ZUCCHI, 2000). Seus danos estão relacionados à oviposição pelas fêmeas na casca do fruto e ao consumo da polpa pelas larvas, reduzindo a qualidade e o valor comercial. Além de elevar os custos de produção devido às constantes aplicações de inseticidas (ARAUJO et al., 2013).

Visando estratégias ecologicamente sustentáveis, rentáveis e seguras para o ser humano, o controle biológico se torna uma ferramenta promissora no manejo integrado das moscas-das-frutas. Atualmente, os programas de controle biológico de tefritídeos-pragas são feitos a partir da liberação do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) (CARVALHO; NASCIMENTO; MATRANGOLO, 2000; BADIO et al., 2015; CAMARGOS; COSTA; MIRANDA, 2017).

No entanto, sua eficiência pode ser afetada por diversos fatores bióticos e abióticos, sendo necessário adicionar outras estratégias para um controle mais efetivo de moscas-das-frutas (CARVALHO, 2006; GARCIA; RICALDE, 2013; HARBI et al., 2019; PRESA-PARRA et al., 2021b). Dessa forma, o controle microbiano é uma opção viável a ser incorporada no manejo das moscas-das-frutas, como a aplicação de nematoides entomopatogênicos (NEP) pertencentes aos gêneros *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae) e *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae).

Os NEP são facilmente encontrados no solo no terceiro estágio de seu ciclo de vida, conhecido como Juvenis Infectantes (JIs), os quais podem infectar as larvas de *C. capitata* quando elas deixam os frutos e penetram no solo para a formação dos pupários (SHAURUB et al., 2015; GONZALEZ et al., 2016a; CHERGUI et al., 2019; PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019). Apesar da alta especificidade, observou-se o risco das aplicações de NEP em alta densidade na liberação inundativa impactarem negativamente os parasitoides, produzindo uma interação antagônica entre os dois grupos, resultando em competição intraguilda (EVERARD; GRIFFIN; DILLON, 2009; MBATA; SHAPIRO-ILAN, 2010).

A aplicação combinada de nematoides e parasitoides pode ser uma estratégia de controle de pragas, desde que os benefícios e aspectos negativos da combinação sejam avaliados cuidadosamente antes da adoção, para que ambos os agentes sejam compatíveis a fim de conservar suas populações, e assim, aumentar a resiliência dos sistemas de cultivo (MBATA; SHAPIRO-ILAN, 2010; GONZALEZ et al., 2016a). Desta forma, torna-se necessário elaborar estratégias que minimizem os efeitos adversos gerados pela interação entre os agentes de biocontrole.

Já foi comprovado que os nematoides não distinguem entre larvas de *C. capitata* parasitadas e não parasitadas por *D. longicaudata*, ocasionando maior mortalidade das larvas parasitadas (SOUZA, 2020). No entanto, invertendo-se a ordem de utilização dos agentes de biocontrole, a partir de uma liberação inicial de nematoides, seguida da liberação do parasitoide, pode-se favorecer a eficácia do controle associado. Isso porque, Algumas espécies de parasitoides têm a capacidade de distinguir entre seus hospedeiros infectados e sadios, selecionando larvas onde sua prole possa se desenvolver adequadamente para realizar a oviposição (ABBAS, 2020). Ainda não há relatos desse comportamento em *D. longicaudata*, desta forma, é indispensável verificar sua preferência entres as larvas de *C. capitata* sadias e infectadas por NEP, sua capacidade de distinguir entre a qualidade dos hospedeiros, e se eles conseguem parasitar mesmo em larvas infectadas, visando determinar a sequência de liberação dos agentes, sendo este os objetivos do estudo.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Criação de insetos

Os insetos foram provenientes de populações de *C. capitata* e *D. longicaudata* criadas no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras (ESAL/DEN/UFLA), em condições controladas ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  umidade relativa, fotofase de 12 horas).

Os adultos de *C. capitata* foram criadas em gaiolas de acrílico (60 x 31 x 30 cm) com uma das faces revestida com tecido de *voil*, nas quais as moscas realizam a postura. No interior das gaiolas foram colocadas duas garrafas plásticas de água de 250 ml com fita absorvente (Spontex®) e placas de Petri contendo uma mistura 1: 4 de levedura de cerveja e açúcar. Fora da gaiola, na parte frontal, logo abaixo do tecido *voil*, foram colocadas bandejas de isopor (20 x 5 x 3,5 cm), mantidas com água para retenção dos ovos. A coleta de ovos foi realizada a cada 24 horas e transferidos para uma dieta artificial para o desenvolvimento larval e a posterior formação de pupárias, que eram então utilizadas para estabelecer novas gaiolas de criação. A dieta artificial utilizada foi descrita por Albajes e Santiago-Álvarez (1980).

Já os adultos de *D. longicaudata* foram mantidos em gaiolas de madeira (30 x 30 x 30 cm), forradas com papel Sulfite Branco, com as faces laterais e a frente revestidas com tecido *voil*. Foi disponibilizado dentro da gaiola uma garrafa plástica de 250 mL com fita absorvente (Spontex®) contendo água e uma placa de Petri com açúcar cristal. Além disso, foi pincelado mel, em uma das faces da gaiola. As larvas de terceiro instar de *C. capitata* foram ofertadas aos parasitoides, na parte superior da gaiola de criação por 24 horas, sendo estas recolhidas no dia seguinte e colocadas em recipientes plásticos até a emergência dos adultos.

### Multiplicação de nematoides entomopatogênicos

O isolado *Heterorhabditis amazonensis* GL foi selecionado devido à sua capacidade de aumentar a sobrevivência de larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata* (SOUZA, 2020). O isolado foi obtido do Banco de Patógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da UFLA e multiplicado através do método *in vivo*, adaptado de Woodring e Kaya (1988) utilizando lagartas de sexto instar de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), provenientes da criação estabelecida no mesmo laboratório.

As lagartas de *G. mellonella* foram acondicionadas em uma placa de Petri (9 x 1,5 cm) contendo dois papéis filtro (90 mm), sendo aplicados 1,8 mL de suspensão aquosa de nematoides com concentração aproximada de 200 JI/lagarta. As lagartas mortas e com sintomas de infecção por NEP foram transferidas para armadilha de White modificada (placa de Petri de plástico com um pedaço de acrílico fixado no centro) forrada com uma folha de papel filtro (90 mm) e adicionada água destilada, na qual os JIs deixaram o cadáver do hospedeiro e migraram para a água destilada no fundo da armadilha. O conteúdo das armadilhas White foi vertido em uma proveta de 1000 mL e seu volume foi completado com água destilada. A suspensão de NEP foi armazenada em frascos para cultura de tecido com capacidade de 250mL acondicionados em câmara climatizada ( $16 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR  $70 \pm 10\%$ , no escuro) por um prazo máximo de uma semana, até a montagem dos bioensaios.

### **Bioensaios**

As larvas de terceiro instar de *C. capitata* foram mantidas em placas de Petri (5 x 1 cm) forradas com três folhas de papel filtro de 50 mm de diâmetro umedecido com 1mL de suspensão de nematoides na concentração de 80 JIs/larva, durante 24 horas, período necessário para que os NEP infectem as larvas de moscas-das-frutas (SOUZA, 2020). Após a inoculação, as larvas foram lavadas com água destilada para remover os JIs aderentes. A testemunha foi composta pelas larvas sadias mantidas em placas de Petri contendo 1 mL de água destilada durante o mesmo período.

As fêmeas de *D. longicaudata* sem experiência prévia de oviposição, foram mantidas com machos durante cinco dias, pois a cópula pode ocorrer logo após a emergência dos adultos e é mais frequente entre o terceiro e o quinto dia (DOUTT, 1964). Os casais colocados em potes plásticos contendo mel e água e um orifício na tampa do pote continha um furo, por onde eram ofertadas larvas e divididos em dois bioensaios.

No primeiro bioensaio, testou a habilidade de *D. longicaudata* em distinguir entre larvas infectadas e sadias. Os potes foram cobertos com tampas contendo dois furos, através dos quais foram oferecidas larvas sadias e infectadas, permitindo ao parasitoide escolher seu hospedeiro.

O segundo bioensaio avaliou se *D. longicaudata* parasita as larvas de *C. capitata* infectadas com nematoides entomopatogênicos quando não fosse oferecido um hospedeiro saudável como uma alternativa. Nesse caso, os potes foram vedados com tampas contendo apenas um furo onde foi ofertado larvas infectadas com NEP, ou larvas saudáveis.

Após 24 horas, foi verificada a presença de oviposição em todas as larvas de *C. capitata*, com auxílio de um microscópio estereoscópico, conforme a metodologia proposta por Montoya et al. (2003). As larvas e/ou as pupas infectadas foram dissecadas e examinadas para verificar a presença de ovos de parasitoides e a presença de nematoides. Já as pupas que não apresentaram sintomas foram mantidas em câmaras climatizadas até a emergência dos adultos, visando identificar o parasitismo e determinada a razão sexual dos parasitoides.

### **Análise Estatística**

Os bioensaios foram executados adotando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com 15 repetições, cada uma constituída de um recipiente plástico contendo um casal de *D. longicaudata*. Para avaliar as diferenças nas taxas de parasitismo entre larvas saudáveis e expostas aos NEP, bem como a emergência dos adultos e a proporção sexual, foram aplicados Modelos Lineares Generalizados (GLM) com distribuição quasibinomial. Já para o número de cicatrizes de oviposição dos parasitoides, utilizou-se um GLM com distribuição de Poisson. Os GLM foram ajustados considerando dois fatores: o tipo de larva e a probabilidade de escolha do parasitoide, além da interação entre esses fatores, fazendo um desdobramento dos tipos de larvas dentro de cada bioensaio. Ambos os GLM foram seguidos por comparações de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). A qualidade do ajuste foi avaliada por meio de um gráfico semi-normal com envelope de simulação. Para investigar a relação entre a emergência de parasitoides e a emergência de moscas em diferentes condições experimentais, os dados foram submetidos à análise de correlação de classificação Kendall. Todas as análises foram feitas utilizando-se o software R 3.6 (R CORE TEAM, 2023).

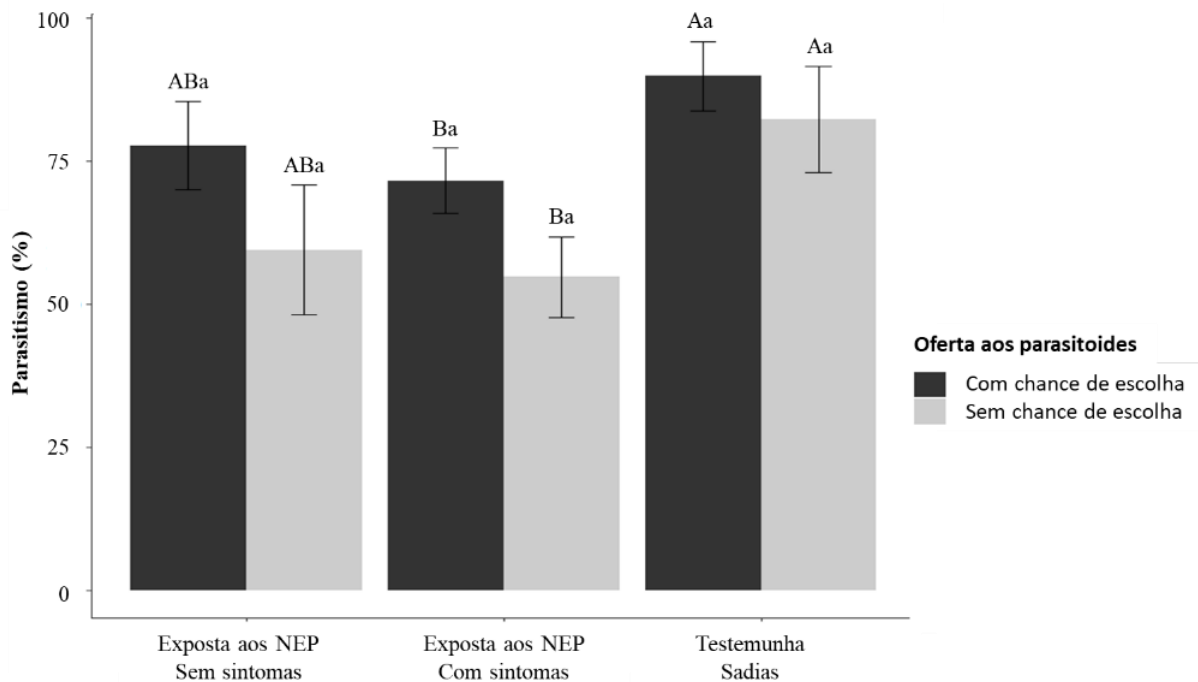
## **RESULTADOS**

O parasitoide *D. longicaudata* visitou as larvas sadias e as larvas expostas aos NEP independentemente de ter ou não chance de escolha. As larvas expostas aos NEP foram oferecidas aos parasitoides antes de morrerem. Consequentemente, não havia certeza sobre quais larvas apresentariam sintomas de infecção, dessa forma, foram considerado dois subgrupos: expostas aos NEP sem sintoma de infecção e expostas aos NEP com sintomas de infecção.

No bioensaio que *D. longicaudata* teve opção de escolha, as larvas sadias apresentaram as maiores taxa de visitação do parasitoide (89,8%) diferenciando das larvas expostas aos NEP com sintoma de infecção (71,5%). As larvas expostas aos NEP sem sintoma de infecção, tiveram 77,7% de visitação, não diferenciando dos demais tratamentos ( $\chi^2=45,03$ ,  $df=28$ ,  $p=0,007$ ) (Figura 1). Essas visitas resultaram em diferenças significativas no número de cicatrizes de oviposição entre os tipos de larvas ( $\chi^2=582,46$ ,  $df=270$ ,  $p<0,001$ ) (Figura 2).

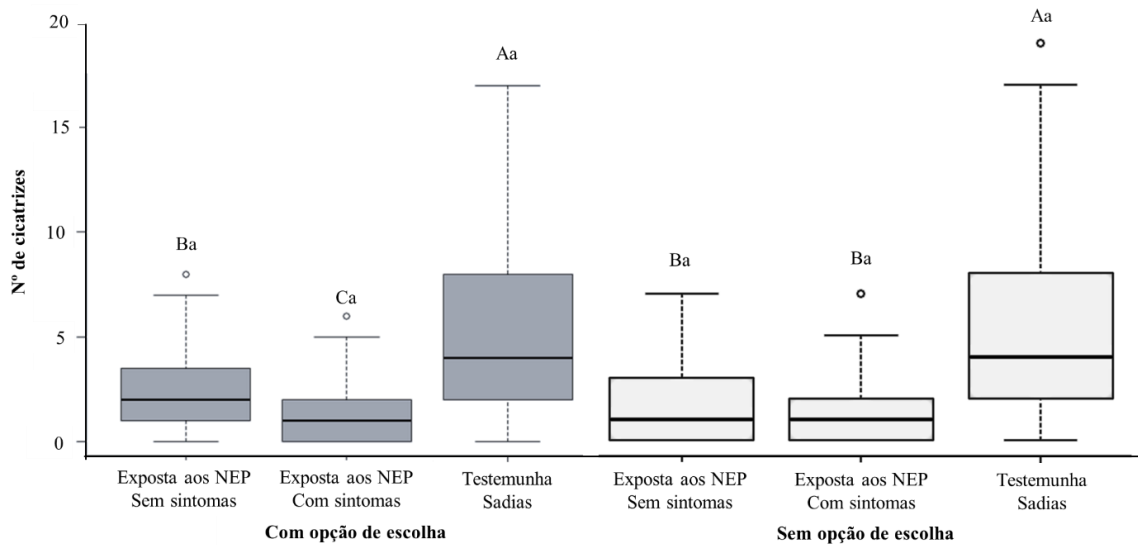
A visitação do parasitoide nas larvas sadias (82,2%) também apresentou diferenças significativas em comparação com as larvas expostas aos NEP no bioensaio onde o parasitoide não teve escolha. No entanto, não houve diferenças na visitação entre as larvas expostas aos NEP com sintomas (54,7%) e sem sintomas (59,4%) ( $\chi^2=123,90$ ,  $df=28$ ,  $p=0,026$ ) (Figura 1). Esse mesmo padrão foi observado para o número de cicatrizes de oviposição ( $\chi^2=722,09$ ,  $df=269$ ,  $p<0,001$ ) (Figura 2).

**Figura 1** – Percentual de parasitismo de *Diachasmimorpha longicaudata* em larvas de *Ceratitis capitata* sadias e expostas aos Nematoides Entomopatogênicos com e sem chance de escolha.



\*Barras seguidas por letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas no parasitismo de *D. longicaudata* em larvas sadias ou expostas aos NEP e barras seguidas por letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as larvas com e sem chance de escolha pelo teste de Tukey ( $p\leq 0,05$ ).

**Figura 2** – Número de marcas de oviposição do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* em larvas de *Ceratitis capitata* sadias e infectadas por Nematoides Entomopatogênicos com e sem chance de escolha.



\*Barras seguidas por letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas no parasitismo de *D. longicaudata* em larvas sadias ou expostas aos NEP e barras seguidas por letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as larvas com e sem chance de escolha pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Não houve diferenças significativas para a visitação e o número de cicatrizes de oviposição das larvas sadias e expostas aos NEP (com e sem sintomas), independentemente de o parasitoide ter ou não a chance de escolha ( $\chi^2=185,11$ ,  $df=70$ ,  $p=0.654$ ;  $\chi^2=1304,6$ ,  $df=539$ ,  $p=0.280$ , respectivamente). Esses dados demonstram que o parasitoide *D. longicaudata* visitam igualmente quando tem e quando não tem chance de escolha, havendo preferência por larvas sadias em vez de larvas expostas aos NEP.

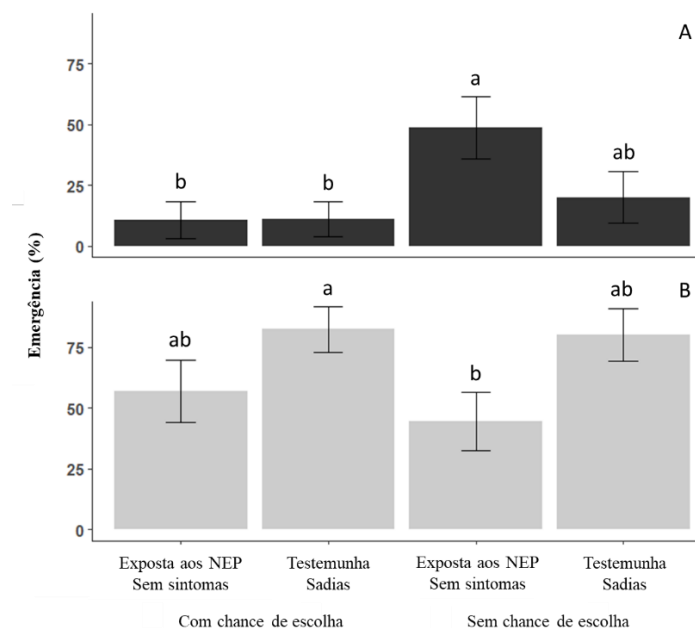
Nas larvas expostas aos NEP com sintomas de infecção com marcas de oviposição, não foi constatada a presença de ovos de *D. longicaudata*. O parasitismo das larvas foi confirmado pela emergência dos adultos. No caso das larvas expostas aos NEP sem sintomas de infecção, observou-se uma emergência de 45% das pupas quando não tiveram chance de escolha e 66,3% quando tiveram chance de escolha, sem diferenças significativas entre os dois grupos ( $\chi^2=28,510$ ,  $df=14$ ,  $p=0,092$ ). Por outro lado, as larvas sadias apresentaram uma emergência de 55,1% quando não tiveram chance de escolha e 65,4% quando tiveram chance de escolha, também sem diferenças significativas entre si ( $\chi^2=60,311$ ,  $df=14$ ,  $p=0,355$ ). Entre os bioensaios, não foram observadas diferenças na emergência entre os diferentes tipos de larvas ( $\chi^2=141,73$ ,  $df=56$ ,  $p=0,188$ ).

Foi constatada emergência de moscas e de parasitoides provenientes de larvas sadias e expostas aos NEP sem sintomas de infecção. A maior quantidade de moscas foi obtida das larvas expostas aos NEP quando o parasitoide não tinha chance de escolha (48,7%), sendo semelhante a emergência das larvas sadias sem chance de escolha (20,0%) e apresentando diferenças das larvas expostas aos NEP e larvas sadias com chance de escolha (10,7 e 11,1%, respectivamente) ( $\chi^2=145,04$ ,  $df=53$ ,  $p=0,0229$ ) (Figura 3a).

Já para o parasitoide, a emergência proveniente das larvas sadias com opção de escolha (82,2%) apresentou diferenças significativa das larvas expostas aos NEP sem sintomas de infecção (51,3%). Não houve diferenças na emergência de parasitoides entre larvas sadias e expostas aos NEP com e sem chance de escolha ( $\chi^2=115,83$ ,  $df=39$ ,  $p=0,005197$ ) (Figura 3b).

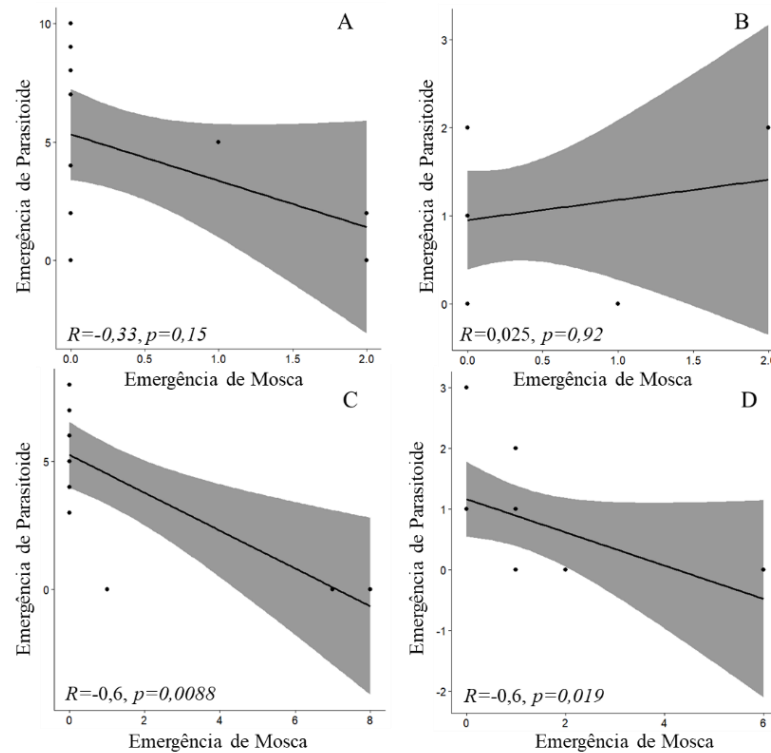
A análise de correlação entre a emergência de parasitoides e moscas revelou que apenas as larvas expostas aos NEP apresentaram uma correlação positiva, embora fraca ( $R=0,33$ ). Por outro lado, as larvas sadias e as expostas aos NEP sem opção de escolha mostraram uma correlação significativa ( $p<0,05$ ) e moderada ( $R=0,6$ ), indicando que a emergência dos parasitoides aumentava conforme a emergência das moscas diminuía. Nos tratamentos com opção de escolha, não houve correlação significativa entre a emergência de moscas e parasitoides ( $p>0,05$ ) (Figura 4).

**Figura 3** – Emergência de adultos provenientes de larvas expostas aos NEP e larvas sadias, com e sem chance de escolha. A) *Ceratitits capitata*; B) *Diachasmimorpha longicaudata*.



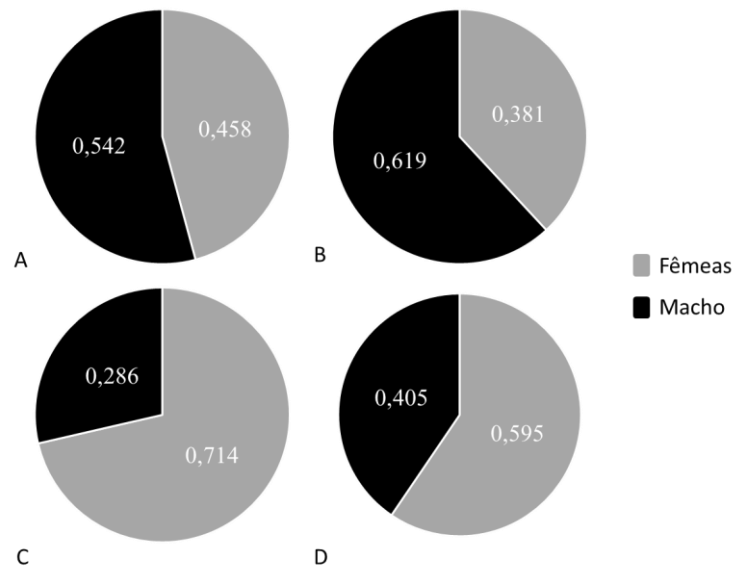
\*Barras acompanhadas por letras diferentes indicam diferenças significativas na emergência de adultos (moscas e parasitoides) em diferentes situações (com e sem chance de escolha) pelo teste de Tukey ( $p\leq 0,05$ ).

**Figura 4** – Correlação entre a emergência de *Ceratitis capitata* e *Diachasmimorpha longicaudata* provenientes de larvas sadias (A, C) e expostas aos Nematoides entomopatogênicos (B, D), com (A, B) e sem (C, D) chance de escolha

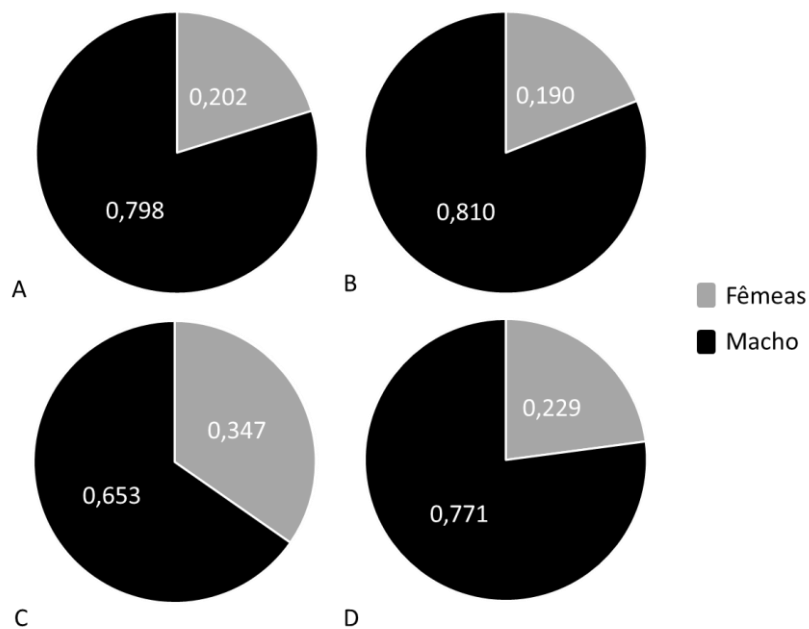


A proporção sexual das moscas oriundas das larvas sadias mostrou um maior surgimento de fêmeas, independentemente da condição (com e sem chance de escolha). Em contrapartida, as moscas provenientes das larvas expostas aos NEP apresentaram uma predominância de machos, também sem depender da condição. No entanto, não houve diferença significativa na emergência de moscas entre as larvas sadias e as expostas aos NEP ( $\chi^2=10,920$ ,  $df=10$ ,  $p<0,05$ ) (Figura 4). A razão sexual dos parasitoides apresentou uma maior quantidade de macho em todas as situações, não havendo diferenças significativas entre os tratamentos ( $X^2=43,174$ ,  $df=21$ ,  $p>0,05$ ) (Figura 5).

**Figura 5** – Razão sexual de *Ceratitis capitata* proveniente de: A) larvas expostas aos NEP com chance de escolha; B) larvas expostas aos NEP sem chance de escolha; C) larvas sadias com chance de escolha; e D) larvas sadias sem chance de escolha.



**Figura 6** – Razão sexual de *Diachasmimorpha longicaudata* proveniente de: A) larvas expostas aos NEP com chance de escolha; B) larvas expostas aos NEP sem chance de escolha; C) larvas sadias com chance de escolha; e D) larvas sadias sem chance de escolha.



## DISCUSSÃO

As fêmeas de *D. longicaudata* conseguiram localizar tanto as larvas sadias quanto as expostas aos NEP, com e sem sintomas de infecção. Os resultados demonstram que os parasitoides também foram capazes de reconhecer a qualidade do hospedeiro antes de depositar seus ovos, sendo capaz de diferenciar os tipos de larvas para pôr seus ovos. Ao dissecar as larvas expostas aos NEP com sintomas de infecção, constatou-se que as larvas com cicatrizes de oviposição não possuía ovos dos parasitoides, enquanto nas larvas expostas aos NEP sem sintomas e as larvas sadias houve a emergência dos parasitoides normalmente, tanto quando o parasitoide tinha ou não chance de escolha do hospedeiro.

Segundo Giunti et al. (2015), o comportamento de busca de hospedeiro pelos parasitoides possui quatro fases distintas: localização do habitat, localização, reconhecimento e aceitação do hospedeiro. Assim, os resultados deste estudo mostraram que as fêmeas de *D. longicaudata* foram capazes de completar todas essas fases de busca aceitando as larvas sadias e expostas aos NEP sem sintomas e rejeitando as larvas infectadas.

Sinais químicos (voláteis) e físicos (de contato) são responsáveis pelo reconhecimento e discriminação do hospedeiro pelos parasitoides (MCDONALD et al., 2015). Eles usam sentidos mecânicos e táteis para coordenar os movimentos complexos durante a postura dos ovos. Além disso, possuem órgãos sensoriais junto ao ovipositor que auxiliam na seleção dos hospedeiros adequados para oviposição (AHMED et al., 2013).

É provável que, ao inserir o ovipositor nas larvas de *C. capitata* sadias ou infectadas por NEP, *D. longicaudata* detectou que o hospedeiro era ou não adequado para o desenvolvimento de sua prole, evidenciado pelas cicatrizes de oviposição encontradas em ambos os tipos de larvas. Abbas (2020) relata que em algumas espécies de parasitoides, as fêmeas conseguem discriminar entre hospedeiros saudáveis e infectados e evitam de ovipositar em hospedeiros inadequados.

Testes realizados por Everard; Griffin e Dillon (2009) e por Lacey, Unruh e Headrick (2003) mostraram que os parasitoides *Bracon hylobii* Ratz. (Hymenoptera: Braconidae), *Mastrus ridibundus* (Hymenoptera: Ichneumonidae) e *Liotryphon caudatus* (Hymenoptera: Ichneumonidae) evitaram pôr ovos em gorgulho do pinheiro (*Hylobius abietis* L. (Coleoptera: Curculionidae)) e traça da maçã (*Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae)) infectadas por NEP, respectivamente. Enquanto testes realizados por Mbata e Shapiro-Ilan (2010) e por Sher; Parrella e Kaya (2000), as fêmeas de *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) e *Diglyphus begini* (Ashmead) (Hymenoptera: Eulophidae). não conseguiram discriminar seus

hospedeiros (*Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) e *Liriomyza trifolii* (Burgess) (Diptera: Agromyzidae), respectivamente) infectados e sadios.

No entanto, resultados obtidos por Mohamed; Ekesi e Hanna (2008) mostraram que a de preferência/aceitabilidade do hospedeiro não apoiam o argumento de que as fêmeas de parasitoides aceitam hospedeiros de acordo com sua lucratividade para o desenvolvimento de sua prole, uma vez que as espécies hospedeiras testadas foram igualmente aceitas independentemente do destino da progênie parasitoide nesses hospedeiros. O mesmo estudo demonstra que o parasitoide *D. longicaudata* apresentaram falhas em discriminar entre várias espécies hospedeiras, o que pode ter ocasionado baixa proporção hospedeiro-parasitoide, fazendo com que as fêmeas depositem seus ovos em hospedeiros de má qualidade.

Esse comportamento pode ser observado neste estudo, pois foram detectadas cicatrizes de oviposição tanto em larvas sadias quanto em larvas expostas aos NEP, independentemente de apresentarem sintomas de infecção. No entanto, o número de cicatrizes nas larvas sadias foi significativamente maior em comparação com as larvas expostas aos NEP, demonstrando que, quando o hospedeiro é inadequado devido à presença de um patógeno, ocorre uma seleção na escolha do hospedeiro.

Os parasitoides dependem de seus hospedeiros, que fornecem todos os recursos para o desenvolvimento larval. Portanto, sua aptidão está diretamente relacionada à qualidade do hospedeiro, conforme determinado pelo tamanho, idade e saúde do hospedeiro, e isso só pode ser avaliado pela fêmea do parasitoide durante a inspeção do hospedeiro (CARON; MYERS; GILLESPIE, 2010). Como as larvas infectadas não se configuram como um ambiente adequado, as fêmeas de *D. longicaudata* procuram as larvas sadias para depositarem seus ovos. Larvas infectadas por NEP não apresentam fisiologia adequada para o desenvolvimento da praga, pois ao serem infectadas, os metabólitos secundários produzidos pelas bactérias simbiotes dos JIs alteram drasticamente sua qualidade para o desenvolvimento de outros organismos (MRÁČEK; SPITZER, 1983; ALMENARA et al., 2011; ATWA et al., 2013).

A ausência de oportunidade para os parasitoides escolherem hospedeiros mais adequados pode criar uma falsa impressão de seleção ou preferência por hospedeiros, pois ao se oferecer a escolha para o parasitoide, revela-se a preferência de hospedeiros pelos parasitoides (SAIT et al., 1997). Para isso, dois tipos de testes comuns, testes sem escolha e testes de escolha, são realizados para determinar se um ou outro fornece uma estimativa mais precisa na preferência de hospedeiros do parasitoides. Porém, ambos os tipos de teste têm limitações, pois podem superestimar gravemente a gama de hospedeiros e rejeitar agentes adequados devido a resultados falsos positivos (MURRAY; WITHERS; MANSFIELD, 2010).

Na natureza, os parasitoides, privados de seus hospedeiros preferenciais, podem optar por se dispersar em vez de aceitar hospedeiros de menor qualidade, mas ainda fisiologicamente adequados, que seriam aceitos em testes laboratoriais sem escolha. Nesse caso, os testes de escolha podem oferecer informações mais úteis para prever as gamas de hospedeiros, indicando quais hospedeiros não alvo, embora fisiologicamente adequados, são aceitos quando há a oportunidade de inicialmente rejeitar esse hospedeiro e, posteriormente, encontrar o hospedeiro preferido (MURRAY; WITHERS; MANSFIELD, 2010).

No tratamento sem escolha com larvas infectadas, houve a maior emergência de *C. capitata* das larvas que não morreram devido a infecção, diferenciando dos demais. Isso sugere que, embora os hospedeiros teoricamente apresentem fisiologia adequada para o desenvolvimento do parasitoide, algum fator impediu que os parasitoides parasitassem esses hospedeiros. Nos demais tratamentos, houve maior surgimento de parasitoides, mesmo nas larvas sobreviventes à exposição aos NEP com chance de escolha por larvas sadias.

A razão sexual dos parasitoides também é afetada pela espécie hospedeira (MOHAMED; EKESI; HANNA, 2008). A exposição ou não das larvas de *C. capitata* aos NEP não impactaram no surgimento de parasitoides fêmeas. No então, houve uma alteração na razão sexual das moscas, quando as larvas foram expostas aos NEP. Esses efeitos subletais das moscas, e principalmente dos parasitoides sobreviventes precisam ser investigados para determinar se os NEP impactam na geração subsequente.

A partir dos resultados apresentados, o parasitoide pode ser incorporado ao manejo de *C. capitata* juntamente com os NEP desde que liberação do parasitoide ocorra depois da inoculação dos JIs, para que eles parasitem as larvas que escaparem da ação dos NEP. Estudos em condições de campo devem ser realizados para comprovar esses resultados sob influência de outros fatores bióticos e abióticos.

## CONCLUSÕES

As fêmeas de *D. longicaudata* pode detectar a qualidade do hospedeiro antes de ovipositar, preferindo larvas de *C. capitata* sadias. A capacidade de discriminar entre larvas sadias e larvas expostas aos NEP, com e sem sintomas de infecção, é evidenciada pelas diferenças nas taxas de visitação e no número de cicatrizes de oviposição. Não houve parasitismo nas larvas infectadas. As cicatrizes de oviposição presentes nessas larvas, na verdade eram picadas de prova, pois não foi constatado a presença de ovos de parasitoides nas larvas infectadas.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. S. T. Interactions between Entomopathogenic Nematodes and Entomophagous Insects. **Advances in Entomology**, v. 08, n. 04, p. 147–157, 2020. doi: 10.4236/ae.2020.84011.
- AHMED, T.; ZHANG, T.; HE, K.; BAI, S.; WANG, Z. Sense organs on the ovipositor of *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hymenoptera: Braconidae): their probable role in stinging, oviposition and host selection process. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 16, n. 3, p. 343–348, 2013. doi: 10.1016/j.aspen.2013.04.015.
- ALBAJES, R.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Efectos de la densidad larvaria y de la alimentación en la proporción de sexos de *Ceratitis capitata* (Diptera; trypetidae). **INIA/Ser. Agric**, v. 13, p. 175–182, 1980.
- ALMENARA, D. P.; NEVES, M. R. de C.; KAMITANI, F. L.; WINTER, C. E. Nematoides entomopatogênicos: as duas faces de uma simbiose. **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 1–6, 2011. doi: 10.7594/revbio.06b.01.
- ARAUJO, E. L.; RIBEIRO, J. da C.; CHAGAS, M. C. M.; DUTRA, V. S.; SILVA, J. G. Moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) em um pomar de goiabeira, no semiárido brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 471–476, 2013. doi: 10.1590/S0100-29452013000200016.
- ATWA, A. A.; HEGAZI, E. M.; KHAFAGI, W. E.; EL-AZIZ, G. M. A. Interaction of the koinobiont parasitoid *Microplitis rufiventris* of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*, with two entomopathogenic Rhabditids, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. **Journal of insect science (Online)**, v. 13, p. 84, 2013. doi: 10.1673/031.013.8401.
- BADII, K. B.; BILLAH, M. K.; AFREH NUAMAH, K.; OBENG OFORI, D.; NYARKO, G. Review of the pest status, economic impact and management of fruit-infesting flies (Diptera: Tephritidae) in Africa. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 12, p. 1488–1498, 2015. doi: 10.5897/ajar2014.9278.
- CAMARGOS, M. G.; COSTA, M. de L. Z.; MIRANDA, E. D. S. Custos variáveis de produção de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) para controle de moscas-das-frutas. **Revista iPecege**, v. 3, n. 2, p. 9, 2017. doi: 10.22167/r.ipecege.2017.2.9.
- CARON, V.; MYERS, J. H.; GILLESPIE, D. R. The failure to discriminate: superparasitism of *Trichoplusia ni* Hübner by a generalist tachinid parasitoid. **Bulletin of Entomological Research**, v. 100, n. 3, p. 255–261, 2010. doi: 10.1017/S0007485309990198.
- CARVALHO, R. S. Biocontrole de moscas-das-frutas: histórico, conceitos e estratégias. **Bahia Agrícola**, v. 7, n. 3, p. 14–17, 2006.
- CARVALHO, S. C.; NASCIMENTO, A. S.; MATRANGOLO, W. J. R. Controle biológico. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Holos ed. [s.l: s.n.] p. 113–117. 2000.

- CHERGUI, S.; BENZEHRA, A.; BOUDJEMAA, K.; BARKOU, H.; KARACA, I. Efficacy of Turkish isolate of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) in controlling the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), under laboratory conditions. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 29, n. 60, 2019. doi: 10.1186/s41938-019-0162-4.
- DOUTT, R. I. Características biológicas de los adultos entomófagos. In: **Control biológico de las plagas de insectos y malas hierbas**. Mexico: P. de Beach, 1964. p. 179–204. 1964.
- EVERARD, A.; GRIFFIN, C. T.; DILLON, A. B. Competition and intraguild predation between the braconid parasitoid *Bracon hylobii* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis downesi*, natural enemies of the large pine weevil, *Hylobius abietis*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 99, n. 02, p. 151, 2009. doi: 10.1017/S0007485308006287.
- GARCIA, F. R. M.; RICALDE, M. P. Augmentative biological control using parasitoids for fruit fly management in Brazil. **Insects**, v. 4, n. 1, p. 55–70, 2013. doi: 10.3390/insects4010055.
- GIUNTI, G.; CANALE, A.; MESSING, R. H.; DONATI, E.; STEFANINI, C.; MICHAUD, J. P.; BENELLI, G. Parasitoid learning: Current knowledge and implications for biological control. **Biological Control**, v. 90, p. 208–219, 2015. doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.06.007.
- GONZALEZ, F.; TKACZUK, C.; DINU, M. M.; FIEDLER, Z.; VIDAL, S.; ZCHORI-FEIN, E.; MESSELINK, G. J. New opportunities for the integration of microorganisms into biological pest control systems in greenhouse crops. **Journal of Pest Science**, v. 89, p. 295–311, 2016. doi: 10.1007/s10340-016-0751-x.
- HARBI, A.; DE PEDRO, L.; FERRARA, F. A. A.; TORMOS, J.; CHERMITI, B.; BEITIA, F.; SABATER-MUNOZ, B. *Diachasmimorpha longicaudata* Parasitism Response to Medfly Host Fruit and Fruit Infestation Age. **Insects**, v. 10, n. 7, p. 211, 2019. doi: 10.3390/insects10070211.
- LACEY, L. A.; UNRUH, T. R.; HEADRICK, H. L. Interactions of two idiobiont parasitoids (Hymenoptera: Ichneumonidae) of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) with the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 83, n. 3, p. 230–239, 2003. doi: 10.1016/S0022-2011(03)00102-2.
- MBATA, G. N.; SHAPIRO-ILAN, D. I. Compatibility of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Biological Control**, v. 54, n. 2, p. 75–82, 2010. doi: 10.1016/J.BIOCONTROL.2010.04.009.
- MCDONALD, H.; REED, D. A.; AHMADIAN, S.; PAINE, T. D. Parasitoid Discrimination between Suitable and Unsuitable Congener Hosts. **Journal of Insect Behavior**, v. 28, n. 4, p. 417–425, 2015. doi: 10.1007/s10905-015-9512-6.
- MOHAMED, S. A.; EKESI, S.; HANNA, R. Evaluation of the impact of *Diachasmimorpha longicaudata* on *Bactrocera invadens* and five African fruit fly species. **Journal of Applied Entomology**, v. 132, n. 9–10, p. 789–797, 2008. doi: 10.1111/j.1439-0418.2008.01350.x.

MONTOYA, P.; BENREY, B.; BARRERA, J. F.; ZENIL, M.; RUIZ, L.; LIEDO, P. Oviposition Behavior and Conspecific Host Discrimination in *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a Fruit Fly Parasitoid. **Biocontrol Science and Technology**, v. 13, n. 7, p. 683–690, 2003. doi: 10.1080/09583150310001606273.

MRÁČEK, Z.; SPITZER, K. Interaction of the predators and parasitoids of the sawfly, *Cephalcia abietis* (Pamphilidae: Hymenoptera) with its nematode *Steinernema kraussei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 42, n. 3, p. 397–399, 1983. doi: 10.1016/0022-2011(83)90181-7.

MURRAY, T. J.; WITHERS, T. M.; MANSFIELD, S. Choice versus no-choice test interpretation and the role of biology and behavior in parasitoid host specificity tests. **Biological Control**, v. 52, n. 2, p. 153–159, 2010. doi: 10.1016/j.biocontrol.2009.10.003.

PARANHOS, B. J.; NAVA, D. E.; MALAVASI, A. **Biological control of fruit flies in Brazil** *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 2019. . doi: 10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.26037.

PRESA-PARRA, E.; HERNÁNDEZ-ROSAS, F.; BERNAL, J. S.; VALENZUELA-GONZÁLEZ, J. E.; MARTÍNEZ-TLAPA, J.; BIRKE, A. Impact of *Metarhizium robertsii* on Adults of the Parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* and Parasitized *Anastrepha ludens* Larvae. **Insects**, v. 12, n. 2, p. 125, 2021. doi: 10.3390/insects12020125.

SAIT, S. M.; BEGON, M.; THOMPSON, D. J.; HARVEY, J. A.; HAILS, R. S. Factors affecting host selection in an insect host–parasitoid interaction. **Ecological Entomology**, v. 22, n. 2, p. 225–230, 1997. doi: 10.1046/j.1365-2311.1997.t01-1-00051.x.

SHAURUB, E. H.; SOLIMAN, N. A.; HASHEM, A. G.; ABDEL-RAHMAN, A. M. Infectivity of four entomopathogenic nematodes in relation to environmental factors and their effects on the biochemistry of the Medfly *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**, v. 44, n. 6, p. 610–618, 2015. doi: 10.1007/s13744-015-0332-3.

SHER, R. B. S.; PARRELLA, M. P.; KAYA, H. K. Biological Control of the Leafminer *Liriomyza trifolii* (Burgess): Implications for Intraguild Predation between *Diglyphus begini* Ashmead and *Steinernema carpocapsae* (Weiser). **Biological Control**, v. 17, p. 155–163, 2000.

SOUZA, M. M. **Interação de nematoides entomopatogênicos com o parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) para o controle de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)**. 2020. UFLA, 2020.

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. Steinernematidae and Heterorhabditidae nematodes: a handbook of techniques southern cooperative. In: **Series Bulletin**. [s.l.: s.n.]1988.

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

**ARTIGO 2**

**DESENVOLVIMENTO DE *Diachasmimorpha longicaudata* (HYMENOPTERA:  
BRACONIDAE) EM LARVAS DE *Ceratitis capitata* (DIPTERA: TEPHRITIDAE)  
EXPOSTAS A NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS**

## RESUMO

Programas de controle biológico de *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) utilizam o parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). Porém, em áreas com altos índices de infestação é necessário adotar um método de controle adicional. Assim os nematoides entomopatogênicos (NEP) tornam-se uma ótima opção a ser incorporada no manejo de tefritídeos. Em estudos mostraram que os NEP causaram maiores mortalidade em larvas parasitadas. Com isso, o trabalho teve como objetivo avaliar o desenvolvimento do parasitoide *D. longicaudata* em larvas de *C. capitata* após a exposição aos NEP, bem como determinar o estágio de desenvolvimento do parasitoide menos susceptível aos NEP. Para isso, o desenvolvimento do parasitoide foi acompanhado dissecando larvas e pupas de *C. capitata* parasitadas expostas ou não aos NEP que apresentaram ou não sintomas de infecção. Já o período de susceptibilidade do parasitoide foi determinado aplicando NEP em *C. capitata* com diferentes dias após o parasitismo. Foi observado que as larvas e pupas de *C. capitata* infectadas por NEP prejudicam o desenvolvimento de *D. longicaudata*. As infecções tardias permitem a eclosão, mas o desenvolvimento é interrompido pela morte do hospedeiro. A susceptibilidade do parasitoide aos NEP ocorre apenas quando o hospedeiro está no estágio larval, sendo que o pupário atua como barreira natural, sem impacto na emergência de adultos. Com base nos resultados obtidos, é possível utilizar os dois agentes de biocontrole no controle de moscas-das-frutas, desde que a liberação do parasitoide e aplicação de NEP ocorra sequencialmente.

**Palavras-chaves:** Moscas-das-frutas. Parasitoides. *Heterorhabditis*. Estágios do ciclo de vida. Período de susceptibilidade.

## INTRODUÇÃO

O Manejo Integrado de Praga (MIP) combina uma variedade de táticas para gerenciar a população de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae), de modo que essas práticas sejam ecologicamente sustentáveis, rentáveis e seguras para o agricultor e consumidor. O controle biológico, químico e comportamental são as táticas mais estudadas (DIAS et al., 2018).

Os programas de controle biológico de *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera: Tephritidae) são baseados em liberação do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead, 1905) (Hymenoptera: Braconidae). No entanto, em regiões onde há altas infestações de moscas-das-frutas, apenas a utilização do parasitoide não será o suficiente para reduzir a população abaixo do nível de dano econômico (PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019).

Assim, os nematoides entomopatogênicos (NEP) pertencentes aos gêneros *Steinernema* (Rhabditida: Steinernematidae) e *Heterorhabditis* (Rhabditida: Heterorhabditidae), podem ser incorporados no manejo integrado de tefritídeos-pragas, pois podem infectar as larvas de *C. capitata* quando elas deixam os frutos e penetram no solo para a formação dos pupários (GONZALEZ et al., 2016a; CHERGUI et al., 2019; PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019).

O terceiro estágio do ciclo de vida dos NEP, conhecido como Juvenil Infectante (JI), é o único estágio de vida livre dos nematoides, apresentando tolerância à estresses abióticos, enquanto todos os outros estágios de desenvolvimento são encontrados apenas dentro de hospedeiros infectados. Esses JIs atuam como vetores de bactérias simbióticas; *Xenorhabdus* e *Photorhabdus*, em espécies da família Steinernematidae e Heterorhabditidae, respectivamente; produzindo metabólitos tóxicos essenciais para o desenvolvimento e reprodução de nematoides em hospedeiros, além de prevenir a alimentação de microrganismos oportunistas (ALMENARA et al., 2011; DILLMAN; STERNBERG, 2012; LACEY et al., 2015b).

Existe o risco das aplicações em altas densidades de NEP impactarem negativamente nos parasitoides, produzindo uma interação antagônica entre os dois grupos, resultando em competição intraguilda (EVERARD; GRIFFIN; DILLON, 2009; MBATA; SHAPIRO-ILAN, 2010). Os estudos evidenciam a infecção direta dos insetos benéficos pelos patógenos e a competição por recursos reprodutivos, já que o hospedeiro compartilhado não sustenta a prole dos parasitoides enquanto está infectado com o patógeno (SHANNAG; CAPINERA, 2000; HARVEY; GRIFFIN, 2012).

Estudos recentes demonstraram que as larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata* quando expostas aos JIs, apresentaram mortalidade superior em relação às larvas não parasitadas. Apesar desses resultados, durante a dissecação de *C. capitata* para confirmar a infecção por NEP, observou-se que algumas larvas do parasitoides conseguiram eclodir, mas não conseguiram completar o seu desenvolvimento (SOUZA, 2020).

Os parasitoides são susceptíveis aos NEP, variando de acordo com o estágio de desenvolvimento que se encontra no momento da infecção, sendo os estágios finais menos afetados que os estágios iniciais (KAYA, 1978). É provável que os estágios finais do parasitoide possam ter desenvolvido uma imunidade eficaz contra a infecção pelo NEP, além disso, a superfície cuticular e o casulo pupal podem fornecer uma barreira que reduz a infecção (MBATA; SHAPIRO-ILAN, 2010).

Pouco se sabe sobre o desenvolvimento do parasitoide em hospedeiros infectados, ou se a exposição do hospedeiro aos NEP sem que haja mortalidade causa algum prejuízo para a vespa. Com isso, o trabalho objetivou (1) avaliar o desenvolvimento do parasitoide *D. longicaudata* em larvas e pupas de *C. capitata* infectadas, bem como em pupas sadias; (2) investigar se a morte do hospedeiro *C. capitata* por NEP interrompe o desenvolvimento do parasitoide *D. longicaudata* ou se há penetração de JIs nas larvas do parasitoide; e, (3) determinar o estágio de desenvolvimento do parasitoide *D. longicaudata* em larvas de *C. capitata* menos susceptíveis aos NEP.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Criação dos insetos

As criações foram estabelecidas no Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos, do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras (ESAL/DEN/UFLA), em condições controladas de temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 12 horas.

As moscas foram mantidas em gaiolas de acrílico (60x31x30cm) tendo uma face revestida com tecido *voil*, onde ocorreu a oviposição. Dentro da gaiola, foram disponibilizados água e alimento (mistura 1:4 de levedura de cerveja e açúcar) *ad libitum*. Os ovos foram coletados de bandejas plásticas com água colocadas abaixo do tecido *voil*, e colocados em dieta artificial adaptada de Albajes e Santiago-Álvarez (1980), à base de levedura de cerveja, açúcar, farelo de trigo, benzoato de sódio, metilparabeno (nipagin), propilparabeno sódico (nipazol) e água.

Os parasitoides adultos foram mantidos em gaiolas cúbicas de madeira (30x30x30cm) com as faces revestidas com tecido *voil*. Larvas de terceiro ínstar de *C. capitata* foram oferecidas para parasitismo na parte superior da gaiola, que continha um revestimento duplo de *voil* fixado com velcro, servindo como um dispositivo de parasitismo. Foram fornecidos água e açúcar no interior da gaiola, além de pincelar mel em suas laterais. Após 24 horas, as larvas foram recolhidas e colocadas em recipientes plásticos até a emergência dos adultos.

### Multiplicação de Nematoides Entomopatogênicos

Para a realização dos bioensaios, foi utilizado o isolado de nematoide *Heterorhabditis amazonensis* GL, armazenado no Banco de Patógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da Universidade Federal de Lavras - UFLA. Esse isolado foi escolhido pois apresentou a menor mortalidade das larvas parasitadas (79%) e resultados promissores para as larvas não parasitadas (73%) (SOUZA, 2020).

A multiplicação dos nematoides foi realizada através do método *in vivo*, adaptado de Woodring; Kaya (1988), onde lagartas de sexto ínstar de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae), provenientes de criação estabelecida no mesmo laboratório, foram colocadas em placas de Petri (9 cm) contendo dois papeis filtro (90 mm), e aplicado 2 mL de suspensão aquosa de nematoides com concentração de aproximadamente 200 JI/lagarta. As lagartas que

apresentaram sintomas de infecção por NEP foram transferidas para armadilha de White modificada (placa de Petri de plástico com um pedaço de acrílico fixado no centro) forrada com uma folha de papel filtro (90 mm), onde os JI deixaram o cadáver e migraram para a água deionizada no fundo da armadilha.

O conteúdo das armadilhas White foi vertido em uma proveta de 1000 mL que teve seu volume completado com água deionizada. A suspensão de NEP foi armazenada em frascos para cultura de tecido com capacidade de 250mL e acondicionados em câmara climatizada ( $16 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR  $70 \pm 10\%$ , no escuro) por um prazo máximo de uma semana, até a montagem dos bioensaios.

### **Bioensaio 1: Desenvolvimento do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* em larvas de *Ceratitis capitata* expostas aos nematoides entomopatogênicos**

Cerca de 200 larvas de terceiro ínstar de *C. capitata* foram expostas a fêmeas de *D. longicaudata* por aproximadamente três horas. O parasitismo foi confirmado a partir da observação de pelo menos três cicatrizes de oviposição, conforme proposto por Montoya et al. (2003), que resulta em pelo menos um ovo do parasitoide.

Dez larvas parasitadas foram transferidas para placas de Petri (5 cm) forradas com três papéis filtro e, em seguida adicionado 1 mL de suspensão de *H. amazonensis* GL na concentração de 80 JIs/larva (SOUZA, 2020). Para testemunha, foi adicionado 1 mL de água deionizada. Todas as placas de Petri foram mantidas em câmara climatizada ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , UR  $70 \pm 10\%$ , 12h de fotofase) até serem analisadas.

Foram avaliadas pupas parasitadas que foram expostas aos NEP, mas que não apresentaram sintomas de infecção; pupas parasitadas que foram expostas aos NEP, e que apresentaram sintomas e larvas parasitadas mortas com sintomas de infecção. Ressalta-se que indivíduos que apresentam sintomas de infecção pelos nematoides *Heterorhabditis* desenvolvem uma coloração avermelhada/arroxeadada, devido aos pigmentos gerados pelas bactérias mutualísticas que se proliferam no interior dos insetos hospedeiros (MRÁČEK; SPITZER, 1983).

Diariamente foram dissecados 40 indivíduos de cada grupo mencionados anteriormente e 40 pupas do tratamento controle para verificar a presença de JIs nas larvas e/ou pupas de *C. capitata*, bem como nos ovos e larvas do parasitoide (Figura 1); além de registrar o estágio de desenvolvimento de *D. longicaudata*, com base nos resultados de Paladino, Papeschi e Cladera (2010). A avaliação ocorreu até o início da emergência dos parasitoides.

**Figura 1:** Ovos de *Diachasmimorpha longicaudata* e juvenis infectantes presentes no interior de larvas parasitadas de *Ceratitis capitata* infectadas por *Heterorhabditis amazonensis* GL



Fotos: SOUZA, M.M. Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Inseto, UFLA, Lavras, MG, Brasil.

Para comprovar o efeito do hospedeiro infectado no desenvolvimento de *D. longicaudata*, outras 100 larvas de *C. capitata* foram expostas aos parasitoides por aproximadamente 3 horas. Dez ovos dos parasitoides foram removidos com o auxílio de uma pipeta (50  $\mu$ L) e individualizados em blocos de cera de abelha, separados por canudos plásticos. Lagartas de *G. mellonella* infectadas por *H. amazonensis* GL foram maceradas com 1 mL de água deionizada, e aplicado 0,1 mL dessa solução em cada compartimento contendo o ovo do parasitoide, a fim de verificar o comportamento do parasitoide no interior do hospedeiro infectado, composto por bactérias simbiotes e/ou seus metabólitos secundários (ALMENARA et al., 2011). Para o controle, o mesmo volume de água deionizada foi aplicado nos compartimentos. Após 48 horas, os ovos foram retirados dos compartimentos e observados quanto a sua coloração, com auxílio de um microscópio estereoscópico.

### **Bioensaio 2: Período de susceptibilidade do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* em *Ceratitis capitata* a nematoides entomopatogênicos**

Larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata* conforme descrito no bioensaio anterior foram individualizadas em copos plásticos (25 mL) forrados com três discos de papeis filtro (2,5 mm) e vedados com filme plástico. Em cada recipiente foi adicionado 0,3 mL de suspensão de *H. amazonensis* GL com a concentração de 80JIs/larva e para a testemunha foi aplicado 0,3 mL de água destilada.

A aplicação ocorreu no dia do parasitismo (dia 0) e nos dias 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 após o parasitismo. Para cada idade de pupa, foi registrada a mortalidade confirmada através da dissecação dos cadáveres, a presença de nematoides nas larvas do parasitoide e a emergência dos adultos até que não fosse mais observada por sete dias consecutivos. Em cada dia foram aplicados a solução de NEP em 50 copos e dissecadas 50 pupas extras para determinar em qual estágio de desenvolvimento o parasitoide se torna resistente aos NEP, conforme os parâmetros definidos por Paladino, Papeschi e Cladera (2010).

### **Análise estatística**

Todos os bioensaios foram executados segundo o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com 50 repetições, sendo cada repetição composta por uma larva ou pupa de *C. capitata* parasitada por *D. longicaudata*. Para comparar a quantidade de dias e a frequência de indivíduos por dia em cada fase de desenvolvimento de *D. longicaudata* em larvas e pupas de *C. capitata* sem sintomas de infecção de NEP, foram utilizados Modelos Lineares Generalizados (GLM) com distribuição Poisson. Já a mortalidade dos diferentes estágios do parasitoide e dos diferentes dias de aplicação de nematoide, assim como a emergência dos adultos nos dois bioensaios, foram analisadas utilizando GLM com distribuição quasibinomial. Testes de qui-quadrado da razão de verossimilhança (*log-likelihood ratio*) foram utilizados para comparar o efeito dos nematoides nas larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata*, seguida por comparações de Tukey  $p=0,05$ . Todas as análises foram realizadas no software R 3.6 (R CORE TEAM, 2023).

## **RESULTADOS**

### **Bioensaio 1: Desenvolvimento do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* em larvas de *Ceratitis capitata* expostas aos nematoides entomopatogênicos**

O parasitoide conseguiu se desenvolver apenas nas pupas sadias e nas pupas expostas aos NEP sem sintomas de infecção, não sendo constatada a presença de JIs nesse caso. Assim, a infecção ocorreu exclusivamente nos hospedeiros com sintomas, onde foi verificado JIs em seu interior. O tempo de desenvolvimento ovo-pupa do parasitoide foi de aproximadamente 16 dias, independente da condição da pupa. A duração de cada estágio de desenvolvimento nas larvas expostas aos NEP não diferiu em relação ao controle ( $\chi^2=295,25$ ,  $df=624$ ,  $p=0,07187$ ),

exceto para o estágio pré-pupa, ainda assim, não houve interferência no desenvolvimento total (Tabela 1).

**Tabela 1** – Duração (em dias) de cada estágio de desenvolvimento de *Diachasmimorpha longicaudata* em larvas de *Ceratitis capitata* expostas ao isolado *Heterorhabditis amazonensis* GL.

<b>Estágio</b>	<b>Controle</b>	<b>Larvas expostas aos NEP</b>	<b>p-valor</b>
Ovos	1.75 ± 0.05 a	1.75 ± 0.08 a	1.000
Primeiro ínstar larval	1.90 ± 0.08 a	1.82 ± 0.10 a	0.378
Segundo ínstar larval	1.29 ± 0.09 a	1.22 ± 0.12 a	0.372
Terceiro ínstar larval	2.91 ± 0.12 a	3.07 ± 0.19 a	0.123
Pré-pupa	1.21 ± 0.09 a	1.05 ± 0.11 b	0.017*
Pupa	2.95 ± 0.12 a	3.15 ± 0.16 a	0.059
Farato adulto	1.56 ± 0.09 a	1.45±0,12 a	0.145
<b>TOTAL</b>	<b>16.35 ± 0.11 a</b>	<b>16.47 ± 0.17 a</b>	<b>0.438</b>

\*Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha, indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

No primeiro dia, foram encontrados apenas ovos, sendo possível observar larvas de primeiro ínstar no segundo dia. Todos os indivíduos encontrados no dia 3 estavam no primeiro ínstar larval. O segundo ínstar ocorreu entre os dias 3 e 8, havendo maior número de parasitoides nos dias 4 e 5. A partir do dia 7 foi possível encontrar parasitoides no terceiro ínstar, pré-pupa e pupa. A fase de farato começou por volta do dia 11 e foi encontrada até próximo à emergência. Na fase de pupa, *D. longicaudata* apresenta dimorfismo sexual, conforme observado por Paladino et al. (2009), onde foi possível observar que as primeiras pupas (dia 8) foram todas do sexo masculino. A partir do dia 9, foi observada maior proporção de fêmeas no tratamento controle. A frequência de parasitoides vivos nas diferentes fases em relação aos dias após o parasitismo nas larvas expostas aos NEP não diferiu estatisticamente do tratamento controle (Tabela 2).

Para os indivíduos que apresentaram sintomas de infecção por NEP, os parasitoides não se desenvolveram, exceto nas pupas, onde os sintomas foram detectados a partir do segundo dia após a aplicação. De todos os indivíduos analisados, foram encontradas larvas do parasitoide de primeiro ínstar em apenas uma larva infectada e em 10,65% das pupas infectadas.

**Tabela 2** – Porcentagem de indivíduos em cada estágio de desenvolvimento de *Diachasmimorpha longicaudata* em larva/pupa de *Ceratitis capitata* exposta ao isolado *Heterorhabditis amazonensis* GL dissecadas diariamente.

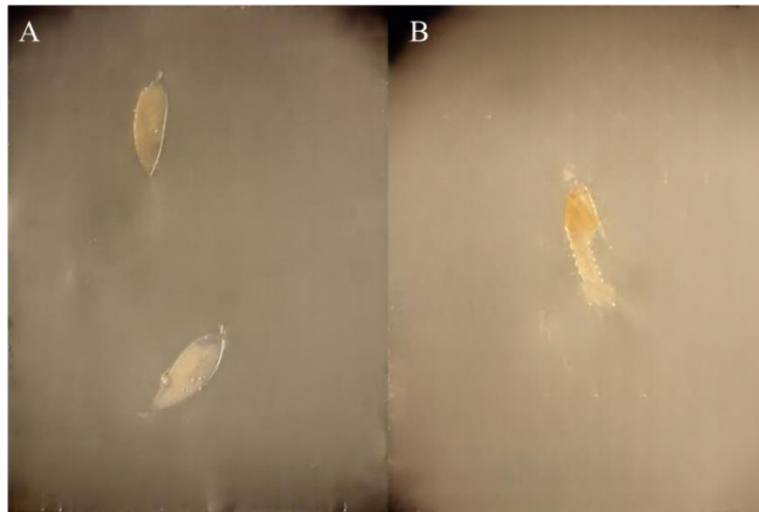
Estágio do Parasitoide	Tipo de larvas	Dias após o parasitismo													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Ovos $\chi^2=9.32$ , df=112, p=1.000	Controle	100.0a	75.0a		0.0a										
	Expostas	100.0a	72.5a		2.5a										
Primero ínstar larval $\chi^2=30.35$ , df=112, p=0.322	Controle		25.0a	100.0a	45.0a	22.5a	7.5a	0.0a	2.5a						
	Expostas		27.5a	100.0a	52.5a	0.0a	0.0a	2.5a	5.0a						
Segundo ínstar larval $\chi^2=53.73$ , df=112, p=0.280	Controle				55.0a	42.5a	20.0a	5.0a	7.5a						
	Expostas				42.5a	52.5a	12.5a	7.5a	2.5a						
Terceiro ínstar larval $\chi^2=101.17$ , df=112, p=0.284	Controle					35.0a	70.0a	77.5a	42.5a	12.5a	15.0a	12.5	2.5a	0.0a	7.5a
	Expostas					47.5a	85.0a	80.0a	42.5a	20.0a	10.0a	5.0	10.0a	2.5a	5.0a
Pré-pupa $\chi^2=55.33$ , df=112, p=0.042	Controle							15.0a	42.5a	37.5a	12.5a	5.0a	17.5a	5.0a	2.5a
	Expostas							10.0a	42.5a	30.0a	12.5a	7.5a	2.5b	0.0a	0.0a
Pupa $\chi^2=50.20$ , df=112, p=0.093	Controle								5.0a	45.0a	72.5a	72.5a	40.0a	30.0a	10.0a
	Expostas								5.0a	45.0a	65.0a	77.5a	57.5b	42.5a	20.0a
Farato adulto $\chi^2=24.64$ , df=112, p=0.064	Controle											0.0a	30.0a	57.5a	80.0a
	Expostas											2.5a	20.0b	47.5a	75.0a
Mortos $\chi^2=56.04$ , df=112, p=0.311	Controle				0.0a		2.5a	2.5a		5.0a	0.0a	10.0a	10.0a	7.5a	
	Expostas				2.5a		2.5a	0.0a		5.0a	12.5a	7.5a	10.0a	7.5a	
Pupas Fêmeas $\chi^2=52.06$ , df=103, p=0.227	Controle								0.0a	69.3a	70.3a	75.3a	55.3a	60.7a	80.0a
	Expostas								0.0a	44.7b	65.0a	55.4a	56.0a	63.0a	100.0a
Pupas Machos $\chi^2=52,06$ , df=103, p=0.054	Controle								100.0a	30.7a	29.7a	24.7a	44.7a	39.3a	20.0a
	Expostas								100.0a	55,3b	35.0a	44.6a	44.0a	37.0a	0.0a

\*Médias seguidas por letras diferentes indicam diferenças significativas no desenvolvimento de *D. longicaudata* em *C. capitata* sadias e expostas aos NEP (na coluna) para cada estágio de desenvolvimento pelo teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

As pupas de moscas que apresentaram sintomas de infecção com 3 e 4 dias após o parasitismo, tiveram as maiores porcentagens de eclosão do parasitoide, pois permitiu que o parasitoide se desenvolvesse antes da penetração dos JIs, sendo observado o parasitoide em 59,26 e 100% das pupas, respectivamente. Já as pupas com sintomas de infecção no segundo dia, tiveram a menor porcentagem de eclosão do parasitoide (2,88%). No entanto, houve a interrupção do desenvolvimento ainda no primeiro ínstar larval.

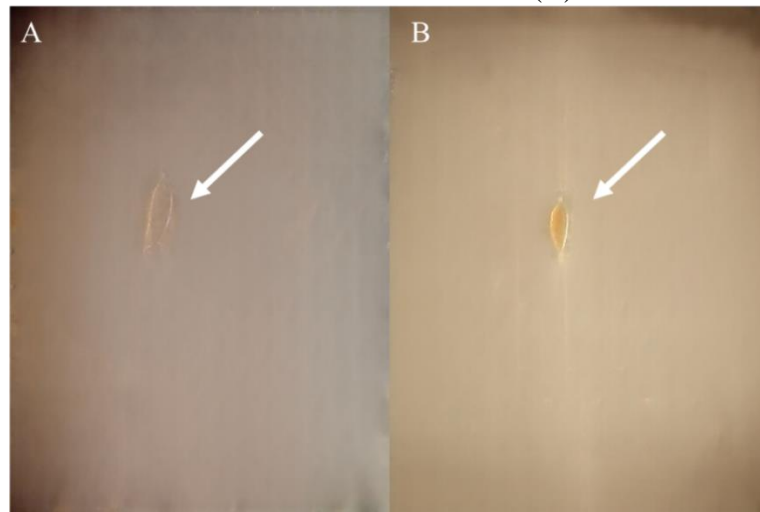
Não foi comprovada a penetração de JIs no parasitoide, em nenhum estágio do seu desenvolvimento. Porém, houve escurecimento dos ovos e larvas do primeiro ínstar do parasitoide, nos hospedeiros infectados (Figura 3). O mesmo resultado foi observado quando ovos de *D. longicaudata* tiveram contato com o conteúdo corporal de *G. mellonella* infectada por *H. amazonensis* GL (Figura 4).

**Figura 2** – Ovos (A) e larvas de primeiro ínstar (B) de *Diachasmimorpha longicaudata* encontrados em larvas e pupas de *Ceratitis capitata* infectadas por *Heterorhabditis amazonensis* GL.



Fotos: SOUZA, M.M. Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Inseto, UFLA, Lavras, MG, Brasil.

**Figura 3 –7** Coloração dos ovos do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* quando aplicados água deionizada (A) e solução de *Galleria mellonella* macerada infectada pelo isolado *Heterorhabditis amazonensis* GL (B)

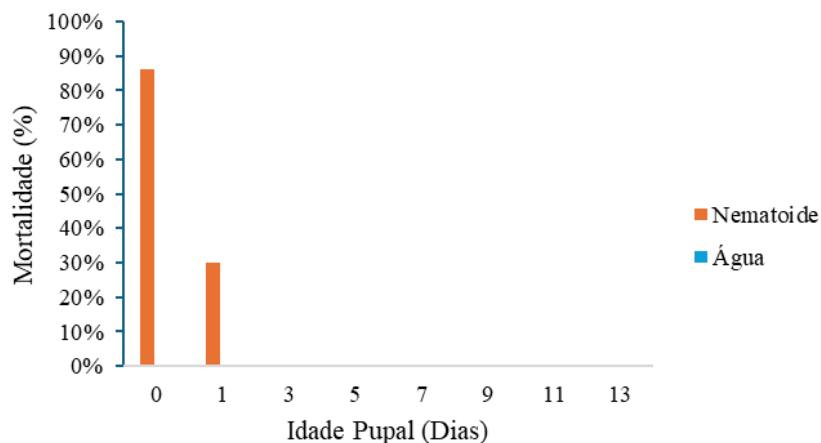


Seta indica a cicatriz de oviposição de *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). Fotos: SOUZA, M.M. Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Inseto, UFLA, Lavras, MG, Brasil.

### **Bioensaio 2: Período de susceptibilidade do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* em *Ceratitis capitata* a nematoides entomopatogênicos**

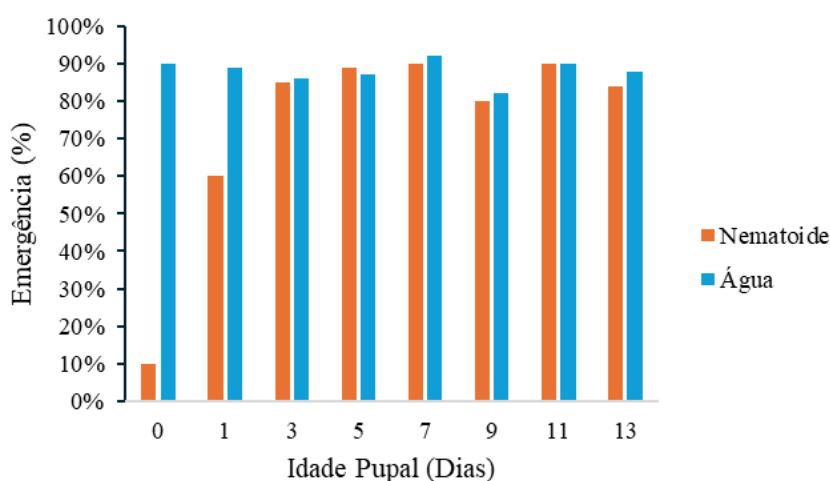
Houve mortalidade de larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata* no dia do parasitismo (Dia 0) (86%) e em larvas com 24h após o parasitismo e no dia seguinte (Dia 1) (30%), quando o parasitoide ainda se encontrava na fase de ovo. A mortalidade do hospedeiro parasitado ocorreu ainda na fase larval. Nos demais dias, os indivíduos já estavam na fase de pupa, e não foi constatada mortalidade causada pelos NEP (Figura 5).

**Figura 5 –** Mortalidade de *Ceratitis capitata* parasitada por *Diachasmimorpha longicaudata* por *Heterorhabditis amazonensis* GL aplicados em diferentes dias.



A emergência do parasitoide se iniciou a partir do 13º dia, sem variação entre os indivíduos em que foram aplicados os nematoides nos dias 3, 5, 7, 9, 11, 13, bem como do tratamento controle (Figura 6). Assim como no bioensaio anterior, houve apenas escurecimento do parasitoide, sem a constatação de nematoide em seu interior.

**Figura 6** – Emergência do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* em *Ceratitis capitata* exposta a nematoides entomopatogênicos aplicados em diferentes dias.



## DISCUSSÃO

A infecção por NEP interrompeu o desenvolvimento do parasitoide *D. longicaudata* nas larvas de *C. capitata*, corroborando com os estudos realizados por Mráček e Spitzer (1983), Everard, Griffin e Dillon (2009), Atwa et al. (2013) e Lordan et al. (2014). Assim, a coexistência de ambos os agentes de biocontrole no mesmo hospedeiro diminui a probabilidade de o parasitoide se desenvolver na presença dos NEP.

O presente estudo demonstra que a morte do parasitoide dentro das larvas infectadas por NEP é causada pelas bactérias simbiotas e seus metabólitos secundários, que são absorvidos pelas fases imaturas do parasitoide, interrompendo seu desenvolvimento. Rosenheim et al. (1995) afirmam que o impacto do patógeno sobre o parasitoide pode ser indireto, através da morte do hospedeiro, ou direto, pela infecção do próprio parasitoide. Não há relatos sobre os efeitos das bactérias simbiotas no desenvolvimento de parasitoides.

Os NEP e suas bactérias simbióticas ocupam rapidamente o corpo do hospedeiro, produzindo metabólitos secundários que alteram drasticamente a qualidade do hospedeiro para o outro organismo. Além disso, os NEP são mais agressivos e geram uma progênie muito maior, que se espalha rapidamente pelo corpo do hospedeiro, impedindo que os parasitoides

completem seu desenvolvimento (MRÁČEK; SPITZER, 1983; EVERARD; GRIFFIN; DILLON, 2009; ATWA et al., 2013; LORDAN et al., 2014).

Os metabólitos secundários derivados da bactéria *Photorhabdus* sp., presente nos nematoides do gênero *Heterorhabditis* são responsáveis por uma ampla gama de bioatividades, destacando-se as atividades antibacterianas, antifúngicas, nematicidas e inseticidas. Entre os fatores de virulência estão complexos de toxinas, enzimas hidrolíticas, hemolisinas e compostos antimicrobianos, que resultam na morte dos insetos hospedeiros em um curto período, normalmente dentro de 48 horas (ELBRENSE et al., 2021; KUSAKABE et al., 2022; TOMAR; THAKUR; YADAV, 2022). A ação das enzimas hidrolíticas provoca a degradação dos tecidos e uma alteração visual, resultando na produção de pigmentos que conferem ao corpo do hospedeiro uma coloração marrom-avermelhada (MRÁČEK; SPITZER, 1983).

A alteração da coloração dos ovos e larvas de *D. longicaudata*, tanto proveniente da dissecação das larvas e pupas de *C. capitata* infectadas, como os expostos ao macerado de *G. mellonella* infectada, comprova a absorção dos metabólitos secundários provenientes das bactérias simbiotes e/ou das próprias bactérias.

Dado que são endoparasitoides coinobiontes de larva-pupa de várias espécies de moscas-das-frutas (ROHR; JAHNKE; REDAELLI, 2019), *D. longicaudata* produz ovos "hidrópicos", que não têm gema suficiente e têm um córion permeável, permitindo que o embrião do parasitoide absorva recursos de desenvolvimento diretamente do hemocele do hospedeiro por meio de uma membrana extraembrionária, substituindo o córion normal do ovo. Essa adaptação elimina a necessidade de proteção contra a dessecação e a exigência de uma nutrição pré-embalada (GRBIC; STRAND, 1998; HARVEY, 2005).

Assim, a causa mais provável da mortalidade do parasitoide *D. longicaudata* é ocasionada pela absorção dos metabólitos secundários pelos ovos e larvas do parasitoide, visto que não foi encontrado nenhum JI dentro dos ovos e larvas do parasitoide, o ovo que sugere que a morte não se deve à infecção direta do patógeno.

O tamanho médio dos ovos de *D. longicaudata* alimentados com mel e criados em hospedeiros provenientes de uma dieta artificial foi de 44.694  $\mu\text{m}^2$  (0,044694  $\text{mm}^2$ ) (CICERO; SIVINSKI; ALUJA, 2013), enquanto o tamanho dos JIs de *H. amazonensis* GL mede cerca 598  $\mu\text{m}$  de comprimento por 23  $\mu\text{m}$  de largura (13.754  $\mu\text{m}^2$ ) (ANDALÓ; MOREIRA; MOINO JR, 2009). No entanto, o tamanho do ovo do parasitoide pode variar conforme a disponibilidade de recursos. A fêmea de *D. longicaudata* consegue discriminar as larvas de *C. capitata* com base no tamanho, e durante o parasitismo, pode ajustar-se à escassez de recursos para sua prole, depositando ovos menores ou selecionando hospedeiros maiores para ovipositar (GODFRAY,

1994; OLIVEIRA et al., 2014; CRUZ et al., 2015; SOUZA et al., 2017). No presente estudo, observou-se visualmente, os JIs são maiores que os ovos e larvas de primeiro ínstar do parasitoide (Figura 1), dificultando a penetração e reprodução dos NEP no interior do parasitoide.

A infecção tardia de *C. capitata* permitiu que houvesse a eclosão das larvas de *D. longicaudata*. Isso aconteceu, provavelmente por que a duração do estágio de ovo é de 1,5 dias {Formatting Citation}(PALADINO et al. 2010), e qualquer infecção que ocorra após esse período possibilita a eclosão do parasitoide antes da morte do hospedeiro. Contudo, não foram observados estágios avançados do parasitoide nas pupas dissecadas após cinco dias do parasitismo. Isso implica que, a eclosão do parasitoide esteja relacionada com o dia do aparecimento do sintoma de infecção e não com os dias corridos após o parasitismo. Contudo, não foram observados estágios avançados do parasitoide nas pupas dissecadas, pois a infecção torna o ambiente do hospedeiro inadequado para a sobrevivência dos parasitoides.

Desta forma, a exposição aos NEP de larvas de *C. capitata* parasitada por *D. longicaudata* só causa prejuízos às fases imaturas do parasitoides quando ocorre a morte do hospedeiro. Os parasitoides provenientes de larvas e pupas que sobreviveram a infecção por NEP não tiveram seu desenvolvimento, emergência e razão sexual afetados.

O parasitoide *D. longicaudata* apresentou desenvolvimento similar tanto em pupas de *C. capitata* expostas ou não aos NEP, divergindo dos resultados obtidos por Atwa et al. (2013), em que houve atraso de dois dias na emergência dos parasitoides expostos aos NEP. Isso pode ter sido em decorrência dos NEP não terem conseguido penetrar nesses indivíduos, ou o sistema imunológico das larvas conseguiram evitar a morte e/ou efeitos subletais no desenvolvimento dos parasitoides. A infectividade de NEP é afetada por fatores biológicos intrínsecos e extrínsecos, e por condições ambientais, como, por exemplo, temperatura, umidade, densidade do hospedeiro, duração da exposição, idade dos JI, sinais químicos, entre outros (SHAPIRO; LEWIS, 1999).

A idade do parasitoide também pode ter influenciado na virulência dos NEP. Atwa et al. (2013) observaram que quando a exposição aos NEP ocorria no período em que as larvas do parasitoide já estavam em estágios mais avançados (aproximadamente sete dias após o parasitismo), os JIs não conseguiram penetrar no hospedeiro. Isso ocorre porque a susceptibilidade dos parasitoides aos NEP varia conforme o estágio de desenvolvimento, sendo os estágios finais menos afetados que os iniciais, possivelmente devido ao desenvolvimento de uma imunidade contra a infecção pelos NEP (KAYA, 1978; MBATA; SHAPIRO-ILAN, 2010).

No caso da aplicação de NEP em diferentes períodos após o parasitismo, foi evidenciado que não houve penetração de JI a partir do dia 1 pós-parasitismo, quando o hospedeiro já tinha se transformado em pupa, e o desenvolvimento do parasitoide iniciado, mas houve mortalidade dos indivíduos que foram expostos aos NEP no dia do parasitismo e no dia seguinte, quando o hospedeiro ainda estava no estágio larval e o parasitoide na fase de ovo. O mesmo aconteceu no estudo realizados por Atwa et al. (2013), onde os ovos do parasitoide *Microplitis rufiventris* Kokujev (Hymenoptera: Braconidae) foram adversamente afetados pelos tratamentos de nematoides, que foram iniciados concomitantemente ao parasitismo.

Porém no presente estudo, a resistência do parasitoide não está relacionada ao ciclo de vida do parasitoide, e sim à superfície cuticular e o pupário do hospedeiro, que podem ter fornecido uma barreira física contra a infecção (MBATA; SHAPIRO-ILAN, 2010). Como no trabalho realizado por Shannag e Capinera (2000), onde as pupas de *Cardiochiles diaphaniae* Marsh (Hymenoptera: Braconidae) com casulos completamente formados eram resistentes à infecção de *Steinernema carpocapsae*.

No caso de *C. capitata*, Rohde et al. (2012) constataram que as pupas são menos susceptíveis que as larvas, obtendo mortalidade máxima de 43,8 e 87,5%, respectivamente, para diferentes isolados de NEP. O isolado *H. amazonensis* GL ocasionou mortalidade em 8,3% das pupas com idade variando entre um e cinco dias (SOUZA et al., 2023). Por outro lado, a suscetibilidade de larvas aos NEP pode estar relacionada à capacidade de locomoção, maior liberação de CO<sub>2</sub> e composto químico que são atrativos aos JIs, maior número de aberturas naturais do corpo da larva, e o tegumento pouco esclerotizado, facilitando a penetração dos isolados de *Heterorhabditis*. Já as pupas possuem aberturas dos espiráculos muito pequenas e um revestimento quitinoso, que dificultam a penetração dos NEP (ROHDE et al., 2012).

Esses resultados evidenciam que a utilização concomitante do parasitoide *D. longicaudata* e o isolado *H. amazonensis* GL no controle de *C. capitata* ocasiona uma competição intraguilda. No entanto, quando a morte do hospedeiro/parasitoide é superada, não foi detectado prejuízo para as fases imaturas do parasitoide. Além disso, a exposição das pupas de *C. capitata* parasitadas com diferentes idades e parasitoides em diferentes estágios de desenvolvimento não foi capaz de impedir a emergência dos adultos, permitindo a utilização associada dos agentes de biocontrole sequencialmente e com o tempo adequado, para que um não interfira na ação do outro. No entanto, são necessários estudos complementares para determinar a melhor sequência e o intervalo adequado de aplicação dos agentes, como também, verificar os efeitos não letal dos NEP na fase adulta, onde as alterações são mais evidentes.

## CONCLUSÕES

O parasitoide *D. longicaudata* conseguiu se desenvolver apenas nas pupas de *C. capitata* que não foram infectadas por *H. amazonensis* GL, onde o tempo de desenvolvimento ovo-pupa do parasitoide não foi afetado pela exposição aos NEP.

A presença de NEP e suas bactérias simbiontes, juntamente com seus metabólitos secundários, interfere no desenvolvimento do parasitoide *D. longicaudata* dentro das larvas e pupas de *C. capitata*.

A susceptibilidade de *D. longicaudata* aos NEP ocorre apenas no dia do parasitismo e no dia seguinte, durante a fase de ovo do parasitoide, quando seu hospedeiro se encontra no estágio larval.

## REFERÊNCIAS

ALBAJES, R.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Efectos de la densidad larvaria y de la alimentación en la proporción de sexos de *Ceratitis capitata* (Diptera; trypetidae). **INIA/Ser. Agric**, v. 13, p. 175–182, 1980.

ALMENARA, D. P.; NEVES, M. R. de C.; KAMITANI, F. L.; WINTER, C. E. Nematoides entomopatogênicos: as duas faces de uma simbiose. **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 1–6, 2011. doi: 10.7594/revbio.06b.01.

ANDALÓ, V.; MOREIRA, G. F.; MOINO JR, A. Studies of two new populations of *Heterorhabditis amazonensis* (Rhabditidae: Heterorhabditidae). **Nematropica**, v. 39, n. 2, p. 199–211, 2009.

ATWA, A. A.; HEGAZI, E. M.; KHAFAGI, W. E.; EL-AZIZ, G. M. A. Interaction of the koinobiont parasitoid *Microplitis rufiventris* of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*, with two entomopathogenic Rhabditids, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. **Journal of insect science (Online)**, v. 13, p. 84, 2013. doi: 10.1673/031.013.8401.

CHERGUI, S.; BENZEHRA, A.; BOUDJEMAA, K.; BARKOU, H.; KARACA, I. Efficacy of Turkish isolate of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) in controlling the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), under laboratory conditions. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 29, n. 60, 2019. doi: 10.1186/s41938-019-0162-4.

CICERO, L.; SIVINSKI, J.; ALUJA, M. Effect of host diet and adult parasitoid diet on egg load dynamics and egg size of braconid parasitoids attacking *Anastrepha ludens*. **Physiological Entomology**, v. 37, n. 2, p. 177–184, 29 jun. 2013. doi: 10.1111/j.1365-3032.2012.00833.x.

CRUZ, C. G.; OLIVEIRA, P. C. do C.; NOGUEIRA, M. V. A.; NASCIMENTO, A. B. do; SANTOS, Z. C. dos; ALVARENGA, C. D.; GIUSTOLIN, T. A. Diachasmimorpha longicaudata discrimina o tamanho da larva hospedeira no momento do parasitismo? In: 9º Fórum de Ensino, Pesquisa, Extensão e Gestão, **Anais...**2015.

DIAS, N. P.; ZOTTI, M. J.; MONTOYA, P.; CARVALHO, I. R.; NAVA, D. E. Fruit fly management research: A systematic review of monitoring and control tactics in the world. **Crop Protection**, v. 112, p. 187–200, 2018. doi: 10.1016/J.CROPRO.2018.05.019.

DILLMAN, A. R.; STERNBERG, P. W. Entomopathogenic nematodes. **Current Biology**, v. 22, n. 11, p. R430–R431, 2012. doi: 10.1016/j.cub.2012.03.047.

ELBREENSE, H.; ELMASRY, A. M. A.; SELEIMAN, M. F.; AL-HARBI, M. S.; ABD EL-RAHEEM, A. M. Can Symbiotic Bacteria (*Xenorhabdus* and *Photorhabdus*) Be More Efficient than Their Entomopathogenic Nematodes against *Pieris rapae* and *Pentodon algerinus* Larvae? **Biology**, v. 10, n. 10, p. 999, 4 out. 2021. doi: 10.3390/biology10100999.

EVERARD, A.; GRIFFIN, C. T.; DILLON, A. B. Competition and intraguild predation between the braconid parasitoid *Bracon hylobii* and the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis downesi*, natural enemies of the large pine weevil, *Hylobius abietis*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 99, n. 02, p. 151, 2009. doi: 10.1017/S0007485308006287.

GODFRAY, H. C. J. **Parasitoids behavioral and evolutionary ecology**. [s.l.] Princeton University Press., 1994.

GONZALEZ, F.; TKACZUK, C.; DINU, M. M.; FIEDLER, Z.; VIDAL, S.; ZCHORI-FEIN, E.; MESSELINK, G. J. New opportunities for the integration of microorganisms into biological pest control systems in greenhouse crops. **Journal of Pest Science**, v. 89, p. 295–311, 2016. doi: 10.1007/s10340-016-0751-x.

GRBIC, M.; STRAND, M. R. Shifts in the life history of parasitic wasps correlate with pronounced alterations in early development. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 3, p. 1097–1101, 3 fev. 1998. doi: 10.1073/pnas.95.3.1097.

HARVEY, C. D.; GRIFFIN, C. T. Host activity and wasp experience affect parasitoid wasp foraging behaviour and oviposition on nematode-infected larvae of the forestry pest *Hylobius abietis*. **Ecological Entomology**, v. 37, n. 4, p. 269–282, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2311.2012.01362.x.

HARVEY, J. A. Factors affecting the evolution of development strategies in parasitoid wasps: the importance of functional constraints and incorporating complexity. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 117, n. 1, p. 1–13, 12 out. 2005. doi: 10.1111/j.1570-7458.2005.00348.x.

KAYA, H. K. Interaction between *Neoplectana carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) and *Apanteles militaris* (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of the armyworm, *Pseudaletia unipuncta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 31, n. 3, p. 358–364, 1978. doi: 10.1016/0022-2011(78)90229-X.

- KUSAKABE, A.; WANG, C.; XU, Y.; MOLNÁR, I.; STOCK, S. P. Selective Toxicity of Secondary Metabolites from the Entomopathogenic Bacterium *Photorhabdus luminescens* sonorensis against Selected Plant Parasitic Nematodes of the Tylenchina Suborder. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 1, 23 fev. 2022. doi: 10.1128/spectrum.02577-21.
- LACEY, L. A.; GRZYWACZ, D.; SHAPIRO-ILAN, D. I.; FRUTOS, R.; BROWNBRIDGE, M.; GOETTEL, M. S. Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 132, p. 1–41, 2015. doi: 10.1016/J.JIP.2015.07.009.
- LORDAN, J.; ALEGRE, S.; ALINS, G.; SARASÚA, M. J.; MORTON, A.; GARCÍA DEL PINO, F. Compatibility between *Forficula auricularia* and entomopathogenic nematodes to be used in pome fruit pest management. **Journal of Applied Entomology**, v. 138, n. 9, p. 635–643, 2014. doi: 10.1111/jen.12118.
- MBATA, G. N.; SHAPIRO-ILAN, D. I. Compatibility of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Biological Control**, v. 54, n. 2, p. 75–82, 2010. doi: 10.1016/J.BIOCONTROL.2010.04.009.
- MONTOYA, P.; BENREY, B.; BARRERA, J. F.; ZENIL, M.; RUIZ, L.; LIEDO, P. Oviposition Behavior and Conspecific Host Discrimination in *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a Fruit Fly Parasitoid. **Biocontrol Science and Technology**, v. 13, n. 7, p. 683–690, 2003. doi: 10.1080/09583150310001606273.
- MŘÁČEK, Z.; SPITZER, K. Interaction of the predators and parasitoids of the sawfly, *Cephalcia abietis* (Pamphilidae: Hymenoptera) with its nematode *Steinernema kraussei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 42, n. 3, p. 397–399, 1983. doi: 10.1016/0022-2011(83)90181-7.
- OLIVEIRA, P. C. do C.; FONSECA, E. D.; ALVARENGA, C. D.; GIUSTOLIN, T. A.; RABELO, M. M.; COUTINHO, C. R. Efeito da idade das larvas de *Ceratitis capitata* (Wied.) sobre a qualidade biológica do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead). **Arq. Inst. Biol.**, v. 81, n. 3, p. 244–249, 2014. doi: 10.1590/1808-1657001262012.
- PALADINO, L. Z. C.; PAPERESCHI, A. G.; CLADERA, J. L. Immature Stages of Development in the Parasitoid Wasp, *Diachasmimorpha longicaudata*. **Journal of Insect Science**, v. 10, n. 56, p. 1–13, 2010. doi: 10.1673/031.010.5601.
- PARANHOS, B. J.; NAVA, D. E.; MALAVASI, A. **Biological control of fruit flies in Brazil** *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 2019. . doi: 10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.26037.
- ROHDE, C.; MOINO JUNIOR, A.; CARVALHO, F. D.; SILVA, M. A. T. Selection of entomopathogenic nematodes for the control of the fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, n. suppl., p. 797–802, 2012. doi: 10.5039/agraria.v7isa2217.
- ROHR, R. A.; JAHNKE, S. M.; REDAELLI, L. R. Does *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) have a preferential instar to parasitize Tephritidae (Diptera)? **Iheringia - Serie Zoologia**, v. 109, p. e2019014, 2019. doi: 10.1590/1678-4766e2019014.

ROSENHEIM, J. A.; KAYA, H. K.; EHLER, L. E.; MAROIS, J. J.; JAFFEE, B. A. Intraguild Predation Among Biological-Control Agents: Theory and Evidence. **Biological Control**, v. 5, n. 3, p. 303–335, 1995.

SHANNAG, H. K.; CAPINERA, J. L. Interference of *Steinernema carpocapsae* (Nematoda: Steinernematidae) with *Cardiochiles diaphaniae* (Hymenoptera: Braconidae), a Parasitoid of Melonworm and Pickleworm (Lepidoptera: Pyralidae). **Environmental Entomology**, v. 29, n. 3, p. 612–617, 2000. doi: 10.1603/0046-225X-29.3.612.

SHAPIRO, D. I.; LEWIS, E. E. Comparison of Entomopathogenic Nematode Infectivity from Infected Hosts Versus Aqueous Suspension. **Environmental Entomology**, v. 28, n. 5, p. 907–911, 1 out. 1999. doi: 10.1093/ee/28.5.907.

SOUZA, M. D. D. D. C.; NASCIMENTO, A. B. DO; BATISTA, W. O.; GONÇALVES, M. P.; CRUZ, C. G. DA; GIUSTOLIN, T. A.; ALVARENGA, C. D. Plasticidade fenotípica em fêmeas de *Diachasmimorpha longicaudata* criado em diferentes espécies de moscas-dasfrutas (Diptera: Tephritidae). In: 11º Fórum Ensino, Pesquisa, Extensão e Gestão, **Anais...2017**.

SOUZA, M. M. **Interação de nematoides entomopatogênicos com o parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) para o controle de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)**. 2020. UFLA, 2020.

SOUZA, M. M.; ANTUNES, A. P. A.; LIMA, C. S.; OLIVEIRA, V. V. de; SALES, F. S.; MOINO JR, A.; ARANTES, ; Érika Helena. Aplicação de *Heterorhabditis amazonensis* GL em pupas de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). In: VII Impósio Internacional de Entomologia, **Anais...2023**.

TOMAR, P.; THAKUR, N.; YADAV, A. N. Endosymbiotic microbes from entomopathogenic nematode (EPNs) and their applications as biocontrol agents for agro-environmental sustainability. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 32, n. 1, p. 80, 28 jun. 2022. doi: 10.1186/s41938-022-00579-7.

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. Steinernematidae and Heterorhabditidae nematodes: a handbook of techniques southern cooperative. In: **Series Bulletin**. [s.l.: s.n.]1988.

**ARTIGO 3**

**EXPOSIÇÃO AOS NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS E OS  
PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE *Diachasmimorpha longicaudata*  
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE)**

## RESUMO

A utilização de nematoides entomopatogênicos (NEP) para controlar *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) é uma estratégia biológica eficaz. No entanto, seu hábito generalista, pode impactar os parasitoides nativos ou liberados de moscas-das-frutas. Como os programas de controle biológico de moscas-das-frutas são realizados com liberações do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), estudos precisam ser realizados para verificar os efeitos dos NEP nas gerações subseqüente dos parasitoides. Portanto, o objetivo foi analisar os parâmetros biológicos de *D. longicaudata* provenientes dos cruzamentos de parasitoides expostos aos NEP e sadios. Foi aplicado *Heterorhabditis amazonensis* GL em larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata*. Após 96 horas, as pupas que não apresentaram sintomas de infecção foram isoladas, e após a emergência os adultos foram sexados e colocadas em gaiolas. A testemunha recebeu água deionizada seguindo o mesmo procedimento. Em cada gaiola foram colocadas fêmeas (♀) e machos (♂) conforme os tratamentos: T1-♀ e ♂ sadios; T2-♀ sadias e ♂ sobreviventes; T3-♀ sobreviventes e ♂ sadios; e T4-♀ e ♂ sobreviventes. Diariamente foram ofertadas larvas de *C. capitata* de terceiro ínstar. As larvas parasitadas foram individualizadas e observadas diariamente para determinar os parâmetros da tabela de vida dos parasitoides. Com base nos resultados, a exposição dos parasitoides *D. longicaudata* aos NEP não impactaram na Taxa reprodutiva líquida ( $R_0$ ), Taxa intrínseca de aumento ( $r$ ) e na Taxa finita de aumento ( $\lambda$ ) da geração subseqüente. Já o Tempo médio de geração ( $T$ ) e a Taxa específica de fertilidade ( $m_x$ ) foram favorecidos pelos NEP. Com isso, a utilização de NEP juntamente com a liberação de *D. longicaudata* pode favorecer o controle biológico de *C. capitata* sem comprometer os aspectos bioecológicos dos parasitoides.

**Palavras-chave:** Parasitoide de moscas-das-frutas; tabela de vida; efeitos não letais; entomopatógenos.

## INTRODUÇÃO

Os nematoides entomopatogênicos (NEP) são agentes de biocontrole promissores para o manejo de *Ceratitidis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). Diversos estudos já comprovaram eficácia desses agente no controle de larvas de moscas-das-frutas (ROHDE et al., 2012; FOELKEL; MONTEIRO; VOSS, 2015; MINAS et al., 2016; HEVE et al., 2017; ROHDE; MERTZ; JUNIOR, 2020).

Os principais danos das moscas-das-frutas estão relacionados com a alimentação das polpa dos frutos pelas suas larvas, tornando esse produto impróprio para o consumo e/ou comercialização (LOUZEIRO et al., 2020). No final da fase larval, as moscas-das-frutas deixam os frutos e se enterram no solo para empupar, tornando-se suscetíveis à ação dos NEP (SHAURUB et al., 2015; PARANHOS; NAVA; MALAVASI, 2019).

Os NEP matam seus hospedeiros a partir da penetração dos Juvenil Infectante (JI) pelas aberturas naturais do inseto, como boca, ânus e espiráculos, ou pela cutícula do inseto. Os JIs correspondem ao terceiro estágio do ciclo de vida dos NEP, o único estágio que apresentam vida livre, sendo facilmente encontrados no solo. Já no interior do hospedeiro, os JIs liberam

suas bactérias simbiotes dos gêneros *Xenorhabdus* e *Photorhabdus* (em espécies da família Steinernematidae e Heterorhabditidae, respectivamente) que produzem um coquetel tóxico de metabólitos secundários, que ocasiona a morte dos insetos entre 24 e 48 horas (ALMENARA et al., 2011; DILLMAN et al., 2012; DILLMAN; STERNBERG, 2012).

Por ser considerado agentes generalistas, os NEP possuem uma ampla diversidade de hospedeiros. Desta forma, a aplicação em larga escala de NEP pode desequilibrar os ecossistemas agrícolas, uma vez que insetos benéficos podem se tornar alvos desses entomopatógenos (LACEY; UNRUH; HEADRICK, 2003).

O controle de *C. capitata* é feito a partir de liberações inundativas do parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) (CARVALHO; NASCIMENTO; MATRANGOLO, 2000; BADI et al., 2015; CAMARGOS; COSTA; MIRANDA, 2017). Por ser um é um endoparasitóide larva-pupa cenobionte, as fêmeas dessas espécies localizam as larvas hospedeiras pelo odor liberado pelos frutos infestados (MESSING; JANG, 1992) e pelas vibrações produzidas ao se alimentarem (vibrotaxia) (LAWRENCE, 1981). Em seguida, usam seus longos ovipositores para colocar um ovo dentro das larvas (HARBI et al., 2019; ROHR; JAHNKE; REDAELLI, 2019).

Dado que ambos os agentes de biocontrole podem coexistir no mesmo ambiente, é fundamental investigar a interação entre eles. Souza (2020) observou interações antagônicas entre o parasitoide *D. longicaudata* e NEP, onde as larvas de *C. capitata* parasitadas tiveram mortalidade superior que as larvas não parasitadas. O isolado *Heterorhabditis amazonensis* GL (Alho) foi o menos prejudicial, resultando na sobrevivência de 20% das larvas parasitadas. No entanto, não se sabe quais são os impactos da exposição aos NEP nos insetos que sobreviveram à infecção.

A infecção por entomopatógenos pode alterar parâmetros de aptidão, comportamento de busca de hospedeiros, alimentação, capacidade de voo, fecundidade, longevidade, desenvolvimento e a dinâmica populacional (KALVNADI et al., 2018). Estudos de efeitos subletais realizados com NEP demonstraram ter efeito na morfofisiologia e no desempenho reprodutivo dos insetos (GIRLING et al., 2010; EBRAHIMI et al., 2014).

Poucos estudos são feitos levando em consideração os impactos de NEP nos inimigos naturais. Com isso, o estudo teve como objetivo avaliar a exposição das larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata* ao nematoide *Heterorhabditis amazonensis* GL (Alho) nos parâmetros da tabela de vida da geração subsequente.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Condições experimentais

As criações de insetos e o bioensaio foram conduzidos em condições ambientais entre agosto e novembro de 2023. Durante este período, ocorreu uma ampla variação de temperatura, com mínimas registradas de 20,2°C e máximas de 33,5°C. A umidade relativa (UR) foi mais baixa, típica do período devido ao ar frio que retém menos umidade, com níveis em torno de 30%. Conforme a primavera se aproximava, os dias começaram a ficar mais longos, coincidindo com a emergência dos insetos no bioensaio.

### Criação de *Ceratitis capitata*

As moscas foram criadas em gaiolas de acrílico (60 x 31 x 30 cm) contendo duas garrafas plásticas de água de 250 ml com fita absorvente (Spontex®) e placas de Petri contendo uma mistura 1: 4 de levedura de cerveja e açúcar, que servirão de alimento.

As fêmeas depositam seus ovos em uma das faces da gaiola revestida com tecido *voil*, onde são retidos em potes plásticos (10 x 5 x 3,5 cm) com água. Os ovos foram coletados diariamente e colocados em dieta artificial, com auxílio de uma seringa.

A dieta artificial a ser utilizada foi adaptada de Albajes; Santiago-Álvarez (1980) utilizando levedura de cerveja, açúcar, farelo de trigo, benzoato de sódio, metilparabeno (nipagin), propilparabeno sódico (nipazol) e água.

As larvas se desenvolveram dentro da dieta até completar seu desenvolvimento, no qual foram retiradas e ofertadas aos parasitoides. As demais saíram da dieta para empupar, onde foram coletadas e colocadas em uma nova gaiola de criação, iniciando assim, um novo ciclo.

### Criação de *Diachasmimorpha longicaudata*

Os parasitoides foram mantidos em gaiolas de madeira (30 x 30 x 30 cm), forradas com papel sulfite branco, com as faces laterais revestidas com tecido *voil*. Em seu interior, foi disponibilizado água e alimento (açúcar cristal e mel).

Para o parasitismo, foi ofertado larvas de terceiro instar de *C. capitata*, na parte superior da gaiola de criação, vedada com outro revestimento de *voil*, preso nas laterais com velcro. Após a exposição, as larvas foram recolhidas e verificadas quanto à presença de pelo

menos três cicatrizes de oviposição, requisito para serem utilizadas no bioensaio (MONTROYA et al., 2003). As larvas não utilizadas, foram colocadas em recipientes plásticos até a emergência dos adultos para a manutenção da criação.

### **Multiplicação de nematoides entomopatogênicos**

Para o bioensaio, foi utilizado *Heterorhabditis amazonensis* GL, pois esse isolado permitiu a maior sobrevivência de larvas parasitadas de *C. capitata* em estudos realizados por Souza (2020).

Os nematoides foram obtidos do Banco de Patógenos do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano de Insetos da UFLA e multiplicados através do método *in vivo*, adaptado de (Woodring e Kaya (1988), utilizando-se lagartas de sexto instar de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) provenientes da criação estabelecida no mesmo laboratório.

Dez lagartas foram colocadas em uma placa de Petri (9cm) contendo dois papéis filtro (90mm), e em seguida foi aplicado 1,8 mL de suspensão aquosa de nematoides com concentração aproximada de 200 JIs/lagarta. Após sete dias, as lagartas mortas com sintomas de infecção por NEP foram transferidas para armadilha de White modificada, composta por uma placa de Petri de plástico com um pedaço de acrílico fixado no centro, forrada com uma folha de papel filtro (90 mm) e contendo água destilada, onde os JIs se depositaram após deixar o hospedeiro.

O conteúdo das armadilhas White foi vertido em uma proveta de 1000 mL, preenchido com água, onde foi mantido por 24 horas para que os JIs decantassem. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e a concentração ajustada para a utilização nos bioensaios. O restante foi armazenado em câmara climatizada ( $16 \pm 1^\circ\text{C}$ , UR  $70 \pm 10\%$ , no escuro) utilizando frascos para cultura de tecido (250mL).

### **Bioensaio**

Larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata* foram mantidas em placas de Petri, onde foi inoculada a suspensão de nematoides (80JIs/inseto) (SOUZA, 2020). Para o grupo controle foi aplicado 1mL de água deionizada. As placas de Petri foram mantidas em câmaras climatizadas até a morte dos hospedeiros e/ou emergência dos adultos. Os adultos emergidos das placas de Petri tratadas com NEP ou água (controle) foram contados e sexados até não ocorrer mais emergência por sete dias consecutivos.

Os parasitoides foram separados por sexo e, posteriormente, agrupados em conjuntos tratados e não tratados com NEP. A partir disso, os adultos foram dispostos em gaiolas plásticas, semelhantes à da criação, da seguinte forma: (1) fêmeas e machos não tratados; (2) fêmeas não tratadas e machos tratados; (3) machos não tratados e fêmeas tratadas; e (4) fêmeas e machos tratados. Diariamente foram ofertadas larvas de *C. capitata* para o parasitismo.

As larvas e/ou pupas parasitadas foram individualizadas em copos de acrílico (25 mL) vedados com papel filme e observadas diariamente até a emergência, onde foram pareadas e colocadas em outras gaiolas para determinar os parâmetros da tabela de vida dos parasitoides. Outras gaiolas foram preparadas, cada uma contendo uma única fêmea ou macho, para investigar os efeitos individuais dos NEP. As gaiolas plásticas continham água, açúcar e mel e diariamente era ofertada uma trouxa de *voil* com dez larvas de terceiro ínstar de *C. capitata* proveniente da criação. Após 24 horas, as larvas/pupas foram retiradas e reservadas até a emergência, onde foi registrada a porcentagem de parasitismo, emergência, o tempo de desenvolvimento e a razão sexual.

### **Análise Estatística**

Os parâmetros da tabela de vida foram estabelecidos utilizando o software TWOSEX-MSChart 2020 (CHI, 2023). As diferenças entre os grupos foram avaliadas por *bootstrapping* pareado ( $P \leq 0,05$ ) considerado estatisticamente significativo pelo Valor t de Student. Os gráficos foram traçados utilizando o software Sigmaplot v15.

Para testar as diferenças na viabilidade, parasitismo e razão sexual na geração  $F_1$ , foram utilizados Modelos Lineares Generalizados (GLM) com distribuição quasibinomial, onde foi ajustado considerando dois fatores: o tratamento derivado do pareamento de adultos provenientes de larvas expostas e sadias e o a condição do inseto (individual ou casal) e a interação entre eles, fazendo um desdobramento dos tratamentos dentro de cada condição. O teste da razão de verossimilhança (*log-likelihood ratio*) foi utilizado para testar o efeito de diferentes tratamentos, seguida por comparações de médias pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). A qualidade do ajuste foi determinada através de um gráfico semi-normal com um envelope de simulação. Essas análises foram realizadas utilizando o Software R 3.6 (R CORE TEAM, 2019).

## RESULTADOS

### Desenvolvimento de *Diachasmimorpha longicaudata* provenientes do cruzamento entre sobreviventes a infecção de nematoides entomopatogênicos e sadios

Quando houve cruzamento entre o macho e a fêmea sobreviventes, houve uma redução no desenvolvimento das fases imaturas e da longevidade das fêmeas. Em ambos os casos, esse tratamento diferenciou dos demais ( $P \leq 0,05$ ), com exceção do cruzamento entre fêmeas sadias e machos sobreviventes ( $P > 0,05$ ). Para os machos, os cruzamentos realizados não afetaram o desenvolvimento das fases imaturas ( $P > 0,05$ ). No entanto, houve um aumento considerado na fase adulta e no ciclo de vida em adultos provenientes do cruzamento entre machos e fêmeas sobreviventes, diferenciando dos demais ( $P \leq 0,05$ ). No tratamento 3 (fêmeas sobreviventes e machos sadios) obteve um maior número de fêmeas, enquanto no tratamento 4 (fêmeas e machos sobreviventes) houve um maior número de machos. Apesar disso, não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 1).

**Tabela 1** – Período de desenvolvimento (dias) de *Diachasmimorpha longicaudata* provenientes do cruzamento entre sadios e sobreviventes à infecção de nematoides entomopatogênicos

Fase	♀ Sadias	♀ Sadias	♀ Sobrevivente	♀ Sobrevivente
	♂ Sadios	♂ Sobrevivente	♂ Sadios	♂ Sobrevivente
♀ Imaturo	17,2±0,24 <sup>a</sup>	16,8±0,70AB	17,3±0,38A	15,9±0,34B
♀ Adulto	17,2±1,22 <sup>a</sup>	15,2±1,06B	19,6±1,22A	14,2±0,86B
♀ Total	34,4±0,69 <sup>a</sup>	30,6±1,35B	36,9±1,27A	30,1±0,95B
♂ Imaturo	14,2±0,16 <sup>a</sup>	14,9±0,18 <sup>a</sup>	14,6±0,33A	15,2±0,35A
♂ Adulto	16,0±0,36B	16,2±0,81B	16,6±0,97B	23,3±2,19A
♂ Total	30,5±0,29B	31,1±0,84B	31,2±0,85B	38,5±2,31A
<b>Razão Sexual</b>	0,583 <sup>a</sup>	0,417 <sup>a</sup>	0,683A	0,333A

♀ fêmea ♂ macho

\*Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste Bootstrap ( $p > 0,05$ ).

### **Sobrevivência e fecundidade de *Diachasmimorpha longicaudata* provenientes do cruzamento entre sobreviventes a infecção de nematoides entomopatogênicos e sádios**

O desenvolvimento também pode ser observado na curva de sobrevivência por estágio de idade ( $S_{xj}$ ). As curvas da taxa de sobrevivência das fêmeas terminaram mais tarde em comparação com as curvas dos machos, com a exceção do tratamento que envolveu o cruzamento entre machos e fêmeas sobreviventes (T4). Além disso, percebe-se que os estágios imaturos registraram a maior taxa de mortalidade, resultando em uma viabilidade pupal entre 14,7 e 23,3%, sem apresentar diferenças entre os tratamentos ( $P>0,05$ ) (Figura 1).

A taxa de sobrevivência específica por idade ( $l_x$ ) demonstra que 50% da mortalidade foi registrada aos 32,0; 33,0; 32,0 e 31,0 dias para os casais tratamentos 1, 2, 3 e 4, respectivamente, sem diferenças significativas entre eles ( $P>0,05$ ), enquanto os insetos isolados, tiveram 50% da mortalidade registrada nos dias 29,0; 31,0; 31,0 e 33,0 para os tratamentos 1, 2, 3 e 4 para os mesmos tratamentos, na mesma ordem, onde o tratamento que teve machos e fêmeas sádias diferenciou do tratamento que tiveram machos e fêmeas sobreviventes ( $P\leq 0,05$ ). Não houve diferença na mortalidade quando os insetos estavam sozinhos ou pareados ( $P>0,05$ ) (Figura 2).

As curvas  $l_x$  mostraram rápidos declínios na sobrevivência para todos os tratamentos após o dia 30, com exceção dos casais do tratamento 4 e os insetos individuais do tratamento 1. Os insetos individuais do tratamento 3, tiveram mortalidade gradual após 20º dia (Figura 2).

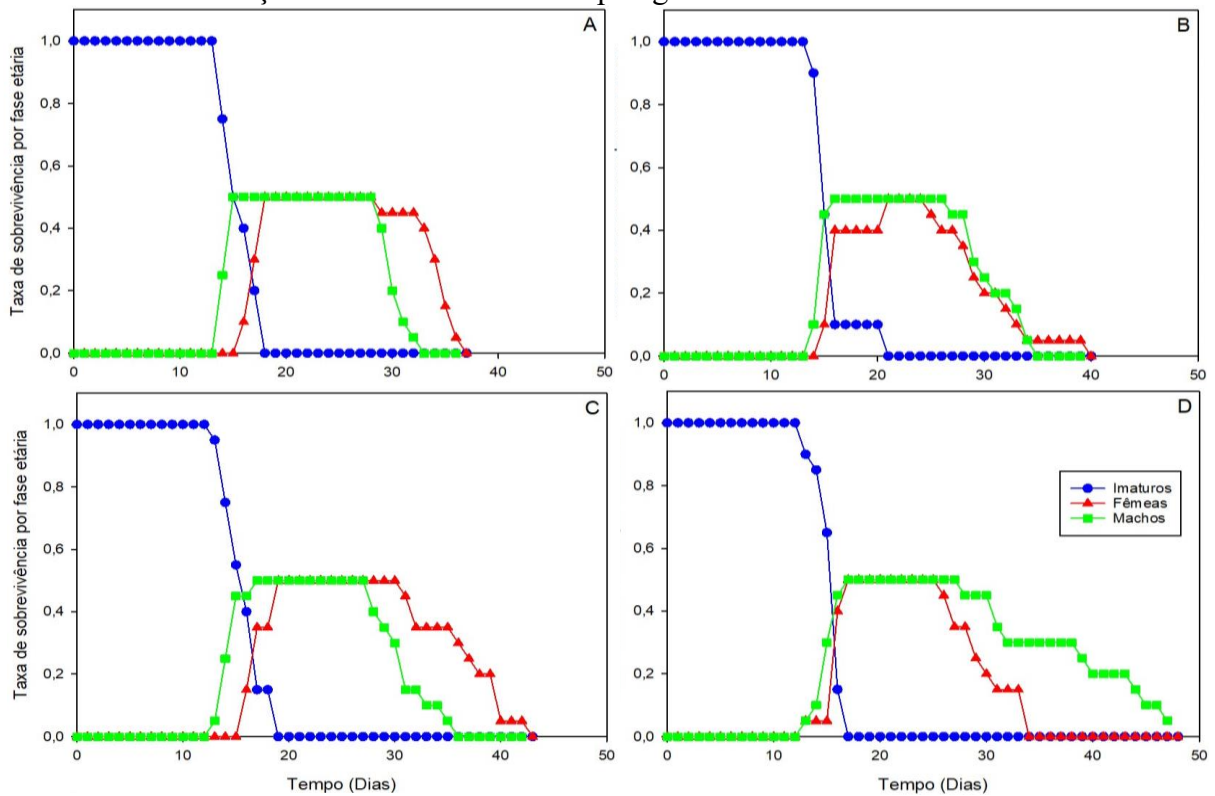
A taxa de fecundidade específica por idade ( $m_x$ ) indicou o início da oviposição dos casais nos dias 17, 15, 16 e 13 para os tratamentos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Já para as fêmeas individuais, a fecundidade iniciou-se nos dias 16, 16, 13 e 11, para os mesmos tratamentos na mesma ordem. O tratamento derivado do cruzamento entre fêmeas e machos saudáveis atingiu seu ápice no 29º dia para o casal e no 28º dia para a fêmea individual. No tratamento com fêmeas saudáveis e machos sobreviventes, foram observados picos no 22º e no 29º dia para o casal, enquanto para a fêmea individual o ápice ocorreu no 20º dia. No tratamento com fêmeas sobreviventes e machos saudáveis, o pico foi registrado no 31º dia para o casal e no 33º dia para a fêmea individual. Já no tratamento com fêmeas e machos sobreviventes, o pico foi alcançado no 27º dia para a fêmea individual e no 29º dia para o casal (Figura 2).

O parasitismo total dos tratamentos variou entre 19,7 e 25,9% para os casais e entre 21,5 e 32,5% para as fêmeas individuais, sem diferenças significativas entre eles ( $\chi^2=1307,1$ ,  $df=447$ ,  $p=0,274$ ;  $\chi^2=478,85$ ,  $df=201$ ,  $p=0,137$ , respectivamente). Os casais do tratamento 3 e tratamento 4 parasitaram oito e sete larvas, respectivamente, já as fêmeas individuais do tratamento 1 parasitaram oito larvas no pico de parasitismo, e do tratamento 4 parasitou seis

larvas no máximo. Apesar disso, não foram detectadas diferença significativas entre os casais e as fêmeas individuais, assim como entre as condições impostas para os parasitoides ( $\chi^2=1627,3$ ,  $df=612$ ,  $p=0,370$ ).

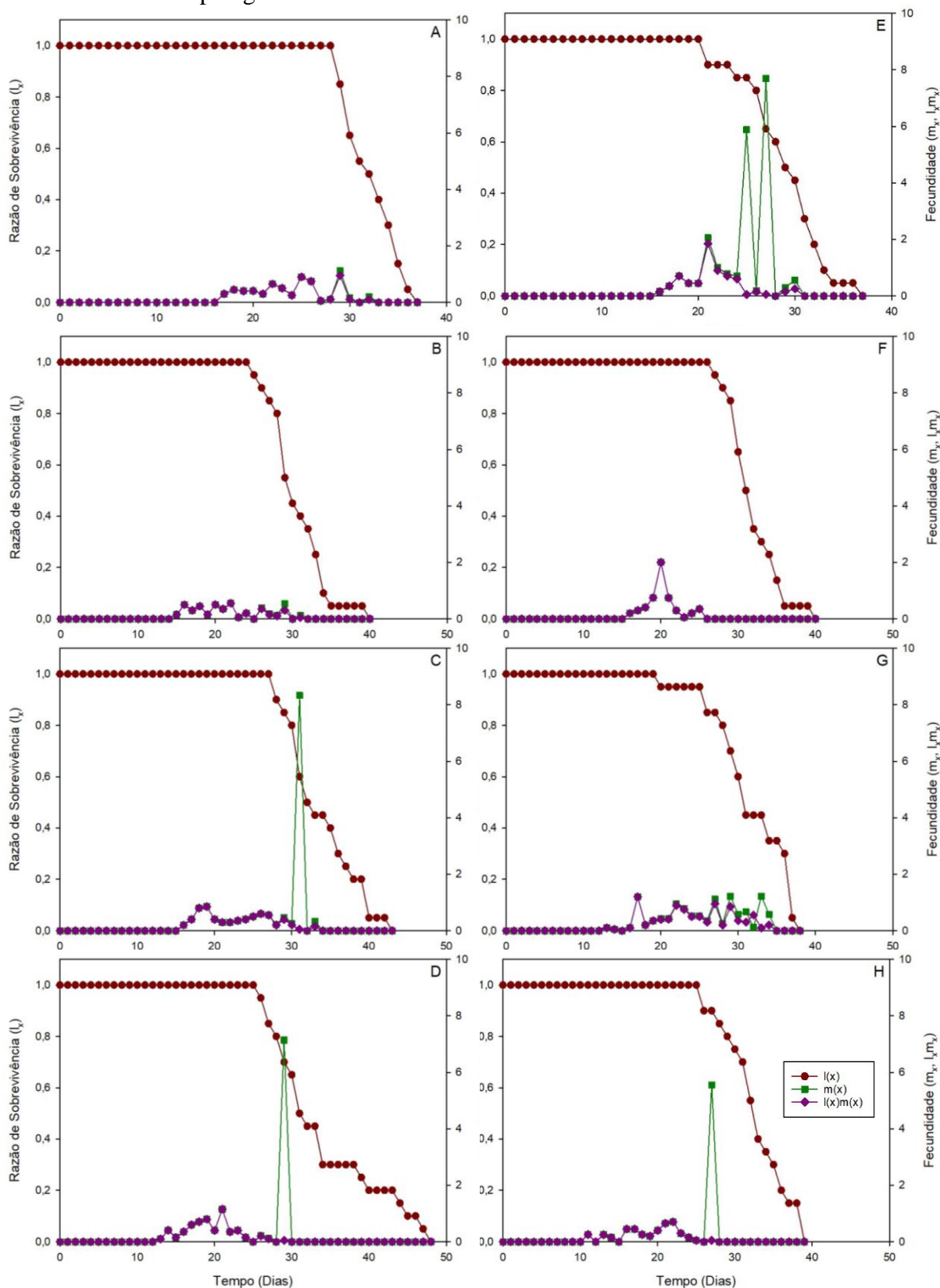
Além disso, a maternidade específica por idade ( $l_xm_x$ ) de *D. longicaudata* foi semelhante entre todos os tratamentos, para os casais e insetos individuais ( $P<0,05$ ). O pico da curva  $l_xm_x$  ocorreu no dia 29 para o tratamento 1, dia 21 para o tratamento 2, dia 19 para o tratamento 3 e dia 21 para o tratamento 4, nos casais. Para as fêmeas individuais, o pico ocorreu no dia 21 para o tratamento 1, dia 20 para o tratamento 2, dia 17 para o tratamento 3 e dia 22 para o tratamento 4 (Figura 2).

**Tabela 1** – Taxa de sobrevivência específica por estágio de idade ( $S_{xj}$ ) de *Diachasmimorpha longicaudata* provenientes do cruzamento entre sádios e sobreviventes à infecção de nematoides entomopatogênicos\*



\*Provenientes do cruzamento entre fêmeas e machos sádios (A), fêmeas sádias e machos sobreviventes (B), fêmeas sobreviventes e machos sádios (C), fêmeas e machos sobreviventes (D).

**Figura 2** — Taxa de sobrevivência específica por idade ( $l_x$ ), fecundidade feminina específica por idade ( $f_x$ ), fecundidade específica por idade ( $m_x$ ) e maternidade específica por idade ( $l_x m_x$ ) de *Diachasmimorpha longicaudata* provenientes do cruzamento entre sádios e sobreviventes à infecção de nematoides entomopatogênicos\*



\*Provenientes do cruzamento entre fêmeas e machos sádios (A, E), fêmeas sádias e machos sobreviventes (B, F), fêmeas sobreviventes e machos sádios (C, G), fêmeas e machos sobreviventes (D, HA), quando dispostos em casais (A, B, C, D) e de forma individual (E, F, G, H).

### **Reprodução de *Diachasmimorpha longicaudata* provenientes do cruzamento entre sobreviventes a infecção de nematoides entomopatogênicos e sadios**

A fertilidade, os períodos de pré-oviposição (APOP) pós-oviposição (TPOP) e os dias de oviposição não foram afetadas significativamente pela exposição da população parental aos NEP, quando foram dispostos em casais e nas fêmeas individuais. O período de oviposição apresentou diferença entre o tratamento proveniente de fêmeas e machos sadios e o tratamento proveniente de fêmeas sadias e machos das fêmeas individuais ( $P \leq 0,05$ ). Comparando os parâmetros reprodutivos entre casais e fêmeas individuais de cada tratamento, percebeu-se que apenas o tratamento 1 apresentou diferença entre eles para o período de oviposição ( $P \leq 0,05$ ) (Tabelas 2 e 3).

Todos os tratamentos resultaram em maior número de machos tanto nos casais quanto nas fêmeas individuais. A razão sexual não houve diferenças entre os tratamentos de fêmeas individuais ( $p > 0,05$ ). Para os casais, a razão sexual do cruzamento proveniente de fêmeas sadias e machos sobreviventes foi significativamente diferente dos tratamentos provenientes dos cruzamentos entre fêmeas sobreviventes e machos sadios e entre fêmeas e machos sobreviventes ( $P \leq 0,05$ ).

### **Parâmetros populacionais de *Diachasmimorpha longicaudata* provenientes do cruzamento entre sobreviventes a infecção de nematoides entomopatogênicos e sadios**

Os parâmetros populacionais ( $R_0$ ,  $r$ ,  $\lambda$ ,  $T$ ) dos casais e indivíduos de *D. longicaudata* provenientes do cruzamento entre tratados e sadios são exibidos nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Pode-se observar que a taxa reprodutiva líquida ( $R_0$ ), a taxa intrínseca de aumento ( $r$ ) e a taxa finita de aumento permaneceram inalterados pela exposição de NEP, quando os parasitoides foram mantidos em casal e individuais ( $p > 0,05$ ). Já o tempo médio de geração ( $T$ ) foi afetada quando os machos eram os sobreviventes a infecção de NEP em ambos os casos.

**Tabela 2** – Fecundidade, Períodos de pré-oviposição do adulto (APOP), oviposição e pós-oviposição (dias) e razão sexual de casais de *Diachasmimorpha longicaudata* provenientes do cruzamento entre sadios e sobreviventes à infecção de nematoides entomopatogênicos

Fase	♀ Sadias	♀ Sadias	♀ Sobrevivente	♀ Sobrevivente
	♂ Sadios	♂ Sobrevivente	♂ Sadios	♂ Sobrevivente
<b>Fecundidade</b>	12,4±4,01Aa	8,3±1,95Aa	13,3±3,27Aa	11,8±2,77Aa
<b>Dias de oviposição</b>	6,00±1,31Aa	4,44±0,67Aa	6,44±1,21Aa	5,33±1,07Aa
<b>APOP<sup>1</sup></b>	1,87±0,80Aa	1,11±0,47Aa	1,22±0,51Aa	2,22±1,16Aa
<b>Período de oviposição</b>	7,0 ±2,84Ab	8,0±2,61Aa	8,0±2,62Aa	7,0±2,84Aa
<b>TPOP<sup>2</sup></b>	19,25±0,94Aa	18,11±,14Aa	18,33±0,61Aa	18,11±1,28Aa
<b>Razão Sexual</b>	0,109Aba	0,211Aa	0,035Ba	0,119Ba

<sup>1</sup>Período de pré-oviposição do adulto (dias); <sup>2</sup>Período total de pré-oviposição (dias)

\*Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem entre si entre os tratamentos (na linha) e médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem entre os casais e individuais (entre as tabelas 2 e 3) pelo teste Bootstrap (p>0,05).

**Tabela 3** – Fecundidade, Períodos de pré-oviposição do adulto (APOP), oviposição e pós-oviposição (dias) e razão sexual de fêmeas individuais de *Diachasmimorpha longicaudata* provenientes do cruzamento entre sadios e sobreviventes à infecção de nematoides entomopatogênicos

Fase	♀ Sadias	♀ Sadias	♀ Sobrevivente	♀ Sobrevivente
	♂ Sadios	♂ Sobrevivente	♂ Sadios	♂ Sobrevivente
<b>Fecundidade</b>	13,6±2,82Aa	10,6±2,59Aa	18,5±4,99Aa	8,6±2,26Aa
<b>Dias de oviposição</b>	5,44±0,65Aba	3,88±0,76Ba	8,12±1,50Aa	4,00±0,73Ba
<b>APOP<sup>1</sup></b>	0,67±0,23Aa	1,33±0,43Aa	0,37±0,26Aa	1,33±0,72Aa
<b>Período de oviposição</b>	8,0±2,71Aa	6,0±2,53Ba	11±4,07Aba	5,0±3,39Aba
<b>TPOP<sup>2</sup></b>	17,66±0,43Aa	18,11±0,55Aa	16,87±0,60Aa	17,22±1,20Aa
<b>Razão Sexual</b>	0,000Aa	0,000Aa	0,005Aa	0,028Aa

<sup>1</sup>Período de pré-oviposição do adulto (dias); <sup>2</sup>Período total de pré-oviposição (dias)

\*Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem entre si entre os tratamentos (na linha) e médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem entre os casais e individuais (entre as tabelas 2 e 3) pelo teste Bootstrap (p>0,05).

**Tabela 4** – Comparação dos parâmetros reprodutivos de casais *Diachasmimorpha longicaudata* provenientes do cruzamento entre sadios e sobreviventes à infecção de nematoides entomopatogênicos

Fase	♀ Sadias	♀ Sadias	♀ Sobrevivente	♀ Sobrevivente
	♂ Sadios	♂ Sobrevivente	♂ Sadios	♂ Sobrevivente
<sup>1</sup> R <sub>0</sub>	6,2±2,40Aa	4,15±1,32 Aa	6,65±2,17Aa	5,9±1,88 Aa
<sup>2</sup> r	7,56±1,89Aa	7,95±1,74 Aa	8,21±1,63 Aa	8,87±1,92Aa
<sup>3</sup> λ	1,08±2,00Aa	1,06±1,75Aa	1,08±1,75Aa	1,09±2,07Aa
<sup>4</sup> T	24,11±0,16Aa	21,62±1,02ABa	23,07±0,95Aa	20,01±1,01Ba

<sup>1</sup>Taxa reprodutiva líquida; <sup>2</sup>Taxa intrínseca de aumento; <sup>3</sup>Taxa finita de aumento; <sup>4</sup>Tempo médio de geração. \*Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem entre si entre os tratamentos (na linha) e médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem entre os casais e individuais (entre as tabelas) pelo teste Bootstrap (p>0,05)

**Tabela 5** – Comparação dos parâmetros reprodutivos de fêmeas individuais de *Diachasmimorpha longicaudata* provenientes do cruzamento entre sádios e sobreviventes à infecção de nematoides entomopatogênicos

Fase	♀ Sádias	♀ Sádias	♀ Sobrevivente	♀ Sobrevivente
	♂ Sádios	♂ Sobrevivente	♂ Sádios	♂ Sobrevivente
<sup>1</sup> R <sub>0</sub>	6,8±2,04Aa	5,3±1,73Aa	9,25±3,18Aa	4,3±1,45Aa
<sup>2</sup> r	8,67±1,45Aa	7,95±1,73Aa	9,28±1,59Aa	7,51±2,18Aa
<sup>3</sup> λ	1,09±1,57 Aa	1,08±1,86 Aa	1,10±1,72 Aa	1,07±2,33Aa
<sup>4</sup> T	22,10±0,64ABa	20,99±0,35Ba	23,98±1,06Aa	19,40±1,58Ba

<sup>1</sup>Taxa reprodutiva líquida; <sup>2</sup>Taxa intrínseca de aumento; <sup>3</sup>Taxa finita de aumento; <sup>4</sup>Tempo médio de geração. \*Médias seguidas por letras maiúsculas iguais não diferem entre si entre os tratamentos (na linha) e médias seguidas por letras minúsculas iguais não diferem entre os casais e individuais (entre as tabelas) pelo teste Bootstrap (p>0,05).

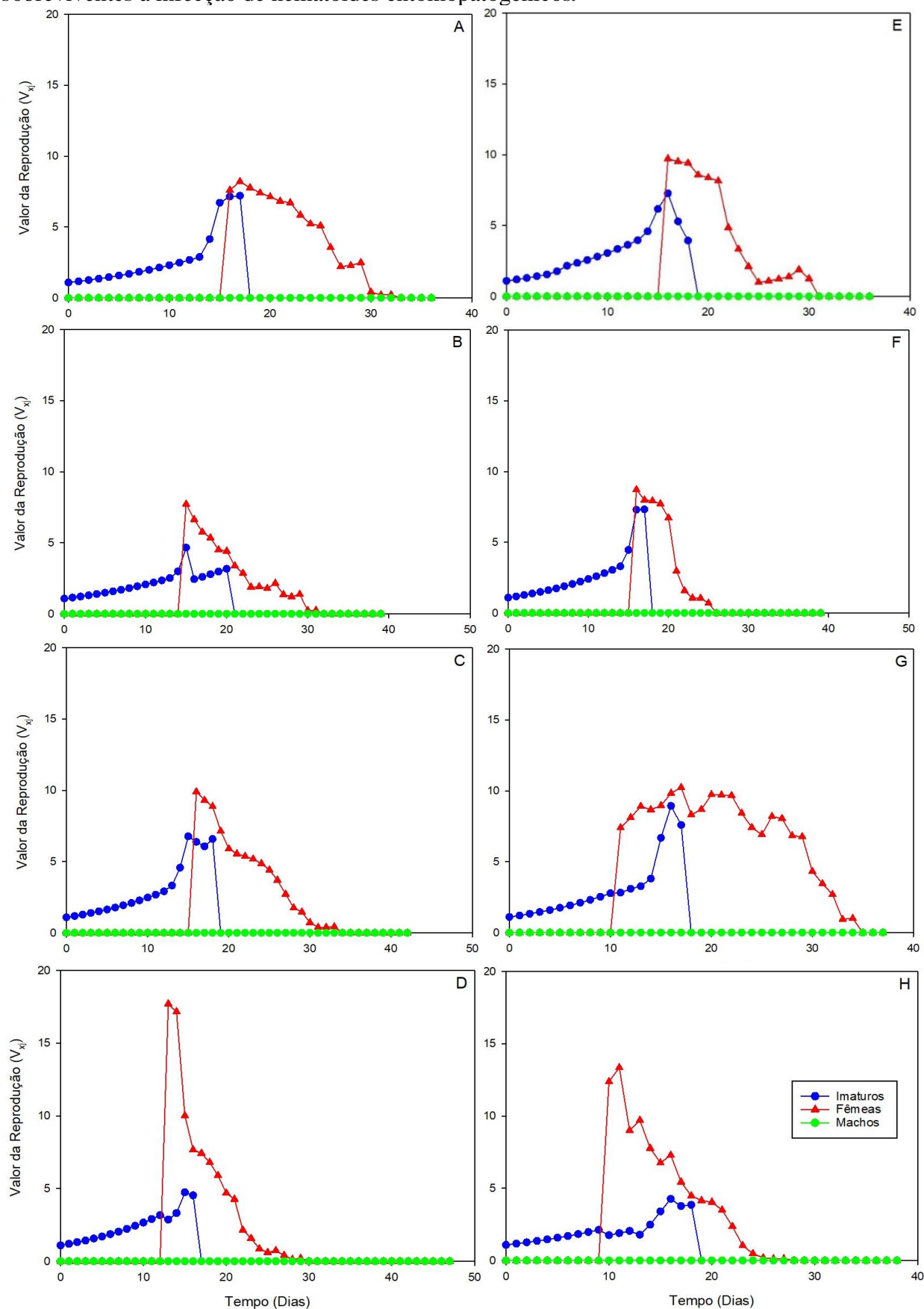
### Valor reprodutivo e expectativa de vida de *Diachasmimorpha longicaudata* provenientes do cruzamento entre sobreviventes a infecção de nematoides entomopatogênicos e sádios

O maior valor reprodutivo por estágio ( $V_{xj}$ ) foi registrado no tratamento proveniente do cruzamento entre fêmeas e machos sobreviventes da infecção dos NEP como 18,0 para os casais e 14,0 para as fêmeas individuais, ambos no 12º dia, diferenciando dos demais tratamentos ( $P \leq 0,05$ ). Não houve diferença entre casais e fêmeas individuais do mesmo tratamento ( $P > 0,05$ ) (Figura 3).

A expectativa de vida específica por idade ( $E_{xj}$ ) de *D. longicaudata* é apresentada na Figura 4. Os imaturos possuem uma expectativa de vida entre 15 e 18 dias para todos os tratamentos, com exceção do casal do tratamento proveniente do cruzamento entre fêmeas sádias e machos sobreviventes, que foi superior a 20 dias.

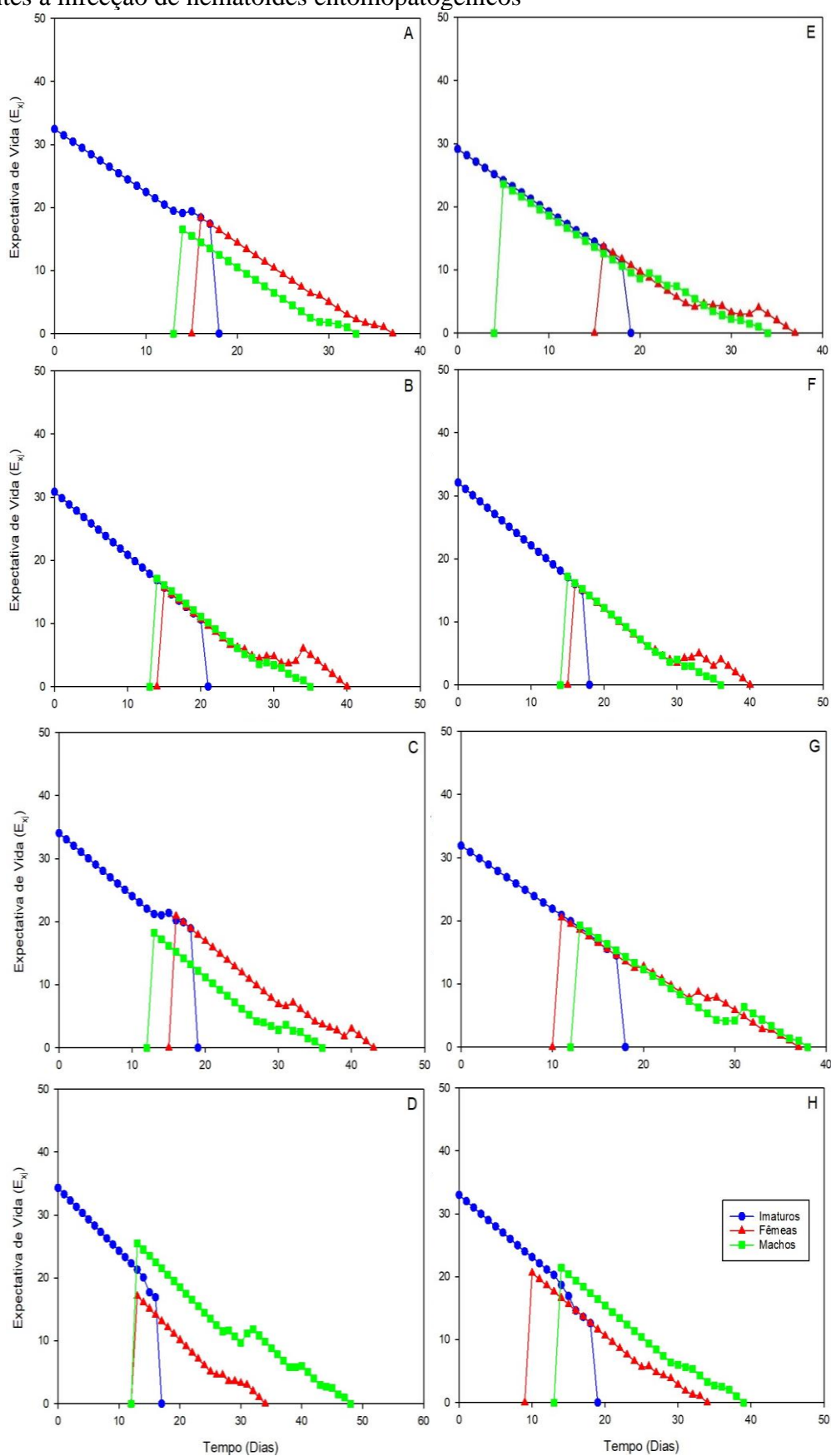
Os machos surgiram primeiro que as fêmeas em quase todos os tratamentos. A diferença entre o surgimento do macho e o surgimento da fêmea das fêmeas individuais do tratamento 1 foi de 10 dias. No casal do tratamento 4, os machos emergem simultaneamente com as fêmeas no 12º dia. Já as fêmeas individuais do tratamento 3 e 4, as fêmeas emergem primeiro. A expectativa de vida feminina foi maior que a masculina, exceto para o casal do tratamento 4 e as fêmeas individuais dos tratamentos 3 e 4.

**Figura 3** –: Taxa reprodutiva específica para idade ( $V_{xj}$ ) de *Diachasmimorpha longicaudata* sobreviventes à infecção de nematoides entomopatogênicos.



Provenientes do cruzamento entre fêmeas e machos sadios (A,E), fêmeas sadias e machos sobreviventes (B,F), fêmeas sobreviventes e machos sadios (C,G), fêmeas e machos sobreviventes (D,A), quando dispostos em casais (A,B,C,D) e de forma individual (E,F,G,H).

**Figura 4** –: Expectativa de vida específica por idade ( $E_{xj}$ ) de *Diachasmimorpha longicaudata* sobreviventes à infecção de nematoides entomopatogênicos



Provenientes do cruzamento entre fêmeas e machos sadios (A,E), fêmeas sadias e machos sobreviventes (B,F), fêmeas sobreviventes e machos sadios (C,G), fêmeas e machos sobreviventes (D,A), quando dispostos em casais (A,B,C,D) e de forma individual (E,F,G,H).

## DISCUSSÃO

As larvas de *C. capitata* parasitadas por *D. longicaudata* expostas aos NEP geraram parasitoides viáveis que conseguiram gerar descendentes. Além disso, foi observado o cruzamento entre indivíduos sadios e sobreviventes da infecção. Este é o primeiro relato dos parâmetros biológicos do parasitoide *D. longicaudata* em larvas de *C. capitata* expostas aos NEP.

Os estudos relacionados a utilização de NEP e parasitoides para o controle de pragas, focam apenas nos impactos diretos dos entomopatógenos sobre os parasitoides (MBATA; SHAPIRO-ILAN, 2010) ou na capacidade dos parasitoides de evitarem hospedeiros infectados (LACEY; UNRUH; HEADRICK, 2003; ATWA et al., 2013). Poucos estudos retratam sobre efeitos subletais de nematoides em parasitoides.

Os efeitos subletais de NEP são mais estudados em insetos-pragas, resultando em descoloração e afinamento da cutícula, deformidades nas asas, antenas e pernas. Além disso, ocorre alterações na produção de ovos fertilizados, na eclosão das larvas e na longevidade dos insetos sobreviventes (GIRLING et al., 2010; EBRAHIMI; NIKNAM; LEWIS, 2011; EBRAHIMI et al., 2014). Esses efeitos foram observados para *D. longicaudata* em larvas de *C. capitata*, conforme os dados obtidos no presente trabalho.

O período de desenvolvimento dos parasitoides em larvas de *C. capitata* foi inferior aos obtidos por Harbi et al. (2016), que foi de  $21,3 \pm 0,1$  dias para machos e  $22,9 \pm 0,1$  dias para fêmeas, mas foram condizentes com os períodos relatados por Paladino, Papeschi e Cladera (2010), que foi de 16 dias, e por Meirelles, Redaelli e Ourique (2013), os quais variaram de 25,3 a 15,4 dias para temperaturas entre 21 e 31°C, respectivamente.

A redução da fase imatura das fêmeas no tratamento 4 (fêmeas e machos sobreviventes), fez com que a emergência dos machos e fêmeas ocorresse simultaneamente. Isso ocorreu possivelmente em decorrência da exposição da população parental aos NEP, tanto do macho quanto da fêmea. Nos demais tratamentos, observou-se uma diferença na emergência de machos e fêmeas, como já era esperado. Normalmente, nos dois primeiros dias apenas machos emergiram, enquanto a proporção de fêmeas começam a aumentar somente a partir do terceiro dia (MEIRELLES; REDAELLI; OURIQUE, 2013).

Várias teorias são especuladas para a ocorrência da protandria (machos emergem antes das fêmeas). Segundo Moller (2004), essa característica é vista como parte da seleção sexual, pois os machos que são alimentados previamente tendem a ser mais

robustos, o que aumenta suas chances de sucesso em competições por acasalamento e, conseqüentemente, de transmitir seus genes. Morbey (2012) sugerem que essa protandria pode estar relacionada ao comportamento fisiológico e à seleção natural, pois os machos que emergem antes enfrentam riscos como predadores e mudanças ambientais, o que seleciona os machos mais resistentes para realizar a cópula quando as fêmeas emergem posteriormente.

A longevidade dos adultos parece ter sido influenciada pela condição dos machos na população parental. Nos tratamentos com machos sadios (tratamentos 1 e 3), as fêmeas descendentes apresentaram uma fase adulta superior à dos machos. O prolongamento da fase adulta das fêmeas favorece o controle biológico, pois são as fêmeas responsáveis pela redução populacional das moscas-das-frutas (HEIMPEL; LUNDGREN, 2000).

Outro fator que favorece o controle biológico é a redução do início da fecundidade dos parasitoides, como ocorreu nos insetos originados do cruzamento entre as fêmeas e os machos sobreviventes da infecção de NEP. Isso faz com que esses parasitoides parasitem larvas de *C. capitata* mais cedo que os parasitoides provenientes dos demais tratamentos, fazendo com que o controle das moscas-das-frutas ocorra precocemente.

A antecipação da fecundidade não interfere no sincronismo com a praga, já que o parasitoide *D. longicaudata* consegue parasitar os três ínstares larvais de *C. capitata*, onde cada fêmea é capaz de parasitar até cinco larvas de moscas-das-frutas por dia (HARBI et al., 2016; ROHR; JAHNKE; REDAELLI, 2019). No presente estudo, esse parasitismo foi observado apenas em três tratamentos, durante um dia ao longo de todo o seu ciclo, ocorrendo próximo ao final do ciclo de vida dos insetos.

As taxas de parasitismo observadas neste estudo podem ter sido subestimadas, pois apenas as larvas que resultaram na emergência de um parasitoide foram consideradas. Pupas inviáveis, que poderiam ter sido parasitadas, não foram contabilizadas. Essa inviabilidade pupal pode ter sido ocasionada pelo superparasitismo, uma vez que a emergência de parasitoides adultos diminui à medida que o nível de superparasitismo aumenta (GONZÁLEZ et al., 2007). Esse fato também justifica as maiores taxas de mortalidade ocorrerem durante as fases imaturas.

Nas vespas mais velhas, a reduzida carga de ovos diminui o superparasitismo, facilitando assim a emergência dos parasitoides. Considerando a existência do superparasitismo, a exposição da população parental aos NEP pode ter diminuído a carga de ovos nas fêmeas, já que o pico de oviposição, não foi observado nos tratamentos em

que as fêmeas não tinham sido expostas. No entanto, novos testes precisam ser feitos para comprovar o superparasitismo nas pupas inviáveis.

A emergência de parasitoides também foi relatado em fêmeas individuais de todos os tratamentos, ou seja, a reprodução ocorreu sem a necessidade de fecundação, caracterizando-se como partenogênese, porém no tratamento resultantes do cruzamento entre machos e fêmeas sadios, a emergência foi superior aos outros tratamentos.

A partenogênese pode ter uma base genética, como um evento de hibridização entre espécies relacionadas ou uma mutação em genes específicos do sexo, que pode resultar na origem de uma linhagem partenogenética ou pode induzida por endossimbiontes, como as bactérias do gênero *Wolbachia* (VAN DER KOOI; MATTHEY-DORET; SCHWANDER, 2017).

A infecção endossimbionte é uma causa comum de partenogênese em vários grupos haplodiplóides, como os insetos da ordem Hymenoptera (VAN DER KOOI; MATTHEY-DORET; SCHWANDER, 2017). Apesar de já ter sido constatado a presença de *Wolbachia* em *D. longicaudata* (SINTUPACHEE et al., 2006), ainda falta estudos para comprovar se essa bactéria interfere na reprodução desse parasitoide. Além disso, são necessários outros estudos para investigar se outros microrganismos, como as bactérias simbiotes dos NEP, podem induzir partenogênese.

A razão sexual próximas a zero nas fêmeas individuais obtidas nesse estudo pode ser devido a partenogênese arrenótoca, onde os machos se originam de um ovo diplóide fertilizado, desta forma o controle da proporção sexual da prole é principalmente materno, mas vários fatores bióticos e abióticos podem afetar o rendimento da progênie do parasitoide e a proporção sexual da prole (PARANHOS et al., 2008; VAN DER KOOI; MATTHEY-DORET; SCHWANDER, 2017).

Os tratamentos provenientes de fêmeas sadias (1 e 2) geraram progênie 100% masculina, enquanto nos tratamentos provenientes de fêmeas sobreviventes houve o aparecimento de algumas poucas fêmeas. Talvez a exposição aos NEP da população parental tenha permitido o surgimento de fêmeas. No entanto, esse comportamento não foi observado em outros estudos, pois não houve a individualização dos insetos quando expostos a entomopatógenos.

Já nos casais, o tamanho das larvas pode ter influenciado na razão sexual. Segundo Kitthwee (2000), os machos foram produzidos a partir de moscas hospedeiras menores. Como durante o experimento a necessidade de larvas era muito grande, ocorreu

que as larvas não tenham se desenvolvido o suficiente para proporcionar uma razão sexual adequada para os descendentes.

A idade dos adultos pode ser outro fator que influenciou a proporção sexual dos descendentes dos casais. Estudos realizados por Ashley & Chambers (1979) relatou que a progênie tendenciosa feminina resultou em todos os testes de fêmeas parasitoides *D. longicaudata* com mais de 2 dias em relação aos machos em *A. suspensa*. No entanto, Viscarret et al. (2006) não encontraram influência da idade das fêmeas de *D. longicaudata* na proporção sexual da progênie obtida de pupas de *C. capitata*.

No presente estudo, os machos e as fêmeas emergiram quase que simultaneamente devido à exposição da população parental aos NEP. Isso pode afetar o comportamento reprodutivo e a dinâmica populacional da espécie, ocorrendo um desencontro temporal para o acasalamento. A cópula de *D. longicaudata* ocorre imediatamente após a emergência da fêmea (DOUTT, 1964), se os machos não emergirem rapidamente o suficiente para acompanhá-las, isso pode resultar em fêmeas virgens que produzem exclusivamente descendentes machos, o que tem implicações negativas para o controle da praga.

Em alguns parasitoides, há um efeito significativo da idade dos adultos na capacidade de resposta dos machos e do sucesso do acasalamento, interferindo na geração de descendentes (MCCLURE; WHISTLECRAFT; MCNEIL, 2007). Especificamente em *D. longicaudata*, conforme relatado por Ramadan (1991), machos de 1 dia de idade se acasalam com 1 fêmea, enquanto machos de 4 dias podem se acasalar com até 4 fêmeas, e aqueles com 16 dias podem acasalar com até 5 fêmeas. Assim, a emergência dos machos antes das fêmeas indica que, à medida que envelhecem, sua capacidade de acasalar com múltiplas fêmeas aumenta, otimizando assim as chances de perpetuação da descendência.

A diferença entre o tempo de emergência dos machos e fêmeas, pode ter sido influenciado pelo APOP e período de oviposição das fêmeas de *D. longicaudata*, como evidenciado por Paranhos et al. (2008), onde foi observado que as oviposições de fêmeas emergidas durante as primeiras 24 horas geraram poucos descendentes resultantes, sendo a maioria eram do sexo masculino, semelhante aos dados obtidos pelo presente estudo.

Os parâmetros populacionais nesse estudo não foram alterados devido à exposição dos parentais aos NEP, diferentemente de outros parasitoides, que tiveram seus parâmetros alterados nos grupos tratados por entomopatógenos (FAZELI-DINAN; TALAEI-HASSANLOUI; GOETTEL, 2016; JARRAHI; SAFAVI, 2016).

O valor  $r$  é o parâmetro mais importante para avaliar o crescimento populacional (CAREY, 1993). Neste caso, os NEP não interferem no aumento populacional de *D. longicaudata*. O cruzamento entre machos e fêmeas sobreviventes, resultou em um menor  $T$ . O menor  $T$  dos parasitoides em comparação com o seu hospedeiro é uma vantagem, pois leva a mais gerações em um determinado período (JARRAHI; SAFAVI, 2016).

Desta forma, a exposição da população parental de *D. longicaudata* parece favorecer a aptidão do parasitoide. No entanto, novos testes precisam ser feitos, incluindo comportamento de forrageamento e acasalamento de machos e fêmeas. Além disso, esses testes devem ser feitos em condições de campo para assegurar a relevância dos dados obtidos.

## CONCLUSÃO

A exposição da população parental dos parasitoides *D. longicaudata* aos NEP não impactou os parâmetros da tabela de vida da geração subsequente. A Taxa específica de fertilidade ( $m_x$ ) e o Tempo médio de geração ( $T$ ) foi favorecida pelos NEP.

## REFERÊNCIAS

- ALBAJES, R.; SANTIAGO-ÁLVAREZ, C. Efectos de la densidad larvaria y de la alimentación en la proporción de sexos de *Ceratitis capitata* (Diptera; trypetidae). **INIA/Ser. Agric**, v. 13, p. 175–182, 1980.
- ALMENARA, D. P.; NEVES, M. R. de C.; KAMITANI, F. L.; WINTER, C. E. Nematoides entomopatogênicos: as duas faces de uma simbiose. **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 1–6, 2011. doi: 10.7594/revbio.06b.01.
- ASHLEY, T. R.; CHAMBERS, D. L. Effects of parasite density and host availability on progeny production by *Biosteres (Opus) longicaudatus*, [Hym.: Braconidae], a parasite of *Anastrepha suspensa* [Dip.: Tephritidae]. **Entomophaga**, v. 24, n. 4, p. 363–369, 1979. doi: 10.1007/BF02374175.
- ATWA, A. A.; HEGAZI, E. M.; KHAFAGI, W. E.; EL-AZIZ, G. M. A. Interaction of the koinobiont parasitoid *Microplitis rufiventris* of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*, with two entomopathogenic Rhabditids, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. **Journal of insect science (Online)**, v. 13, p. 84, 2013. doi: 10.1673/031.013.8401.

- BADII, K. B.; BILLAH, M. K.; AFREH NUAMAH, K.; OBENG OFORI, D.; NYARKO, G. Review of the pest status, economic impact and management of fruit-infesting flies (Diptera: Tephritidae) in Africa. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 12, p. 1488–1498, 2015. doi: 10.5897/ajar2014.9278.
- CAMARGOS, M. G.; COSTA, M. de L. Z.; MIRANDA, E. D. S. Custos variáveis de produção de *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) para controle de moscas-das-frutas. **Revista iPecege**, v. 3, n. 2, p. 9, 2017. doi: 10.22167/r.ipecege.2017.2.9.
- CAREY, J. R. **Applied demography for biologists: with special emphasis on insects**. [s.l.] Oxford University Press, 1993.
- CARVALHO, S. C.; NASCIMENTO, A. S.; MATRANGOLO, W. J. R. Controle biológico. In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Holos ed. [s.l.: s.n.] p. 113–117. 2000.
- CHI, H. **TWOSEX-MSChart: a computer program for the age-stage, two-sex life table analysis**. . Acesso em: 2 mar. 2024.
- DILLMAN, A. R.; GUILLERMIN, M. L.; LEE, J. H.; KIM, B.; STERNBERG, P. W.; HALLEM, E. A. Olfaction shapes host-parasite interactions in parasitic nematodes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 35, p. E2324–E2333, 2012. doi: 10.1073/pnas.1211436109.
- DILLMAN, A. R.; STERNBERG, P. W. Entomopathogenic nematodes. **Current Biology**, v. 22, n. 11, p. R430–R431, 2012. doi: 10.1016/j.cub.2012.03.047.
- DOUTT, R. I. Características biológicas de los adultos entomófagos. In: **Control biologic de las plagas de insectos y malas hierbas**. Mexico: P. de Beach, 1964. p. 179–204. 1964.
- EBRAHIMI, L.; NIKNAM, G.; DUNPHY, G. B.; TOORCHI, M. Side effects of immune response of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* against the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* infection Abstract Entomopathogenic nematodes (EPNs) are lethal pathogens of agricultural. **Invertebrate survival journal**, v. 11, n. 1, p. 132–142, 2014.
- EBRAHIMI, L.; NIKNAM, G.; LEWIS, E. E. Lethal and sublethal effects of Iranian isolates of *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis bacteriophora* on the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. **BioControl**, v. 56, n. 5, p. 781–788, 2011. doi: 10.1007/s10526-011-9343-0.
- FAZELI-DINAN, M.; TALAEI-HASSANLOUI, R.; GOETTEL, M. Virulence of the entomopathogenic fungus *Lecanicillium longisporum* against the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* and its parasitoid *Encarsia formosa*. **International Journal of Pest Management**, v. 62, n. 3, p. 251–260, 2016. doi: 10.1080/09670874.2016.1182228.

- FOELKEL, E.; MONTEIRO, L. B.; VOSS, M. Virulence of nematodes against larvae of the south-American fruit fly in laboratory using soil from Porto Amazonas, Paraná, Brazil, as substrate. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 405–410, 2015. doi: 10.1590/0103-8478cr20150370.
- GIRLING, R. D.; ENNIS, D.; DILLON, A. B.; GRIFFIN, C. T. The lethal and sub-lethal consequences of entomopathogenic nematode infestation and exposure for adult pine weevils, *Hylobius abietis* (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, n. 3, p. 195–202, 2010. doi: 10.1016/j.jip.2010.04.003.
- GONZÁLEZ, P. I.; MONTOYA, P.; PEREZ-LACHAUD, G.; CANCINO, J.; LIEDO, P. Superparasitism in mass reared *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**, v. 40, n. 3, p. 320–326, 2007. doi: 10.1016/j.biocontrol.2006.11.009.
- HARBI, A.; CHERMITI, K. A. B.; MARTINS, D.; HAFSI, A.; SABATER-MOÏZ, B. Life History Parameters of *Diachasmimorpha longicaudata* on *Ceratitis capitata* Under Laboratory Conditions: Implications for Mass Rearing and Biological Control. **Tunisian Journal of Plant Protection**, v. 11, n. 2, p. 207–217, 2016.
- HARBI, A.; DE PEDRO, L.; FERRARA, F. A. A.; TORMOS, J.; CHERMITI, B.; BEITIA, F.; SABATER-MUNOZ, B. *Diachasmimorpha longicaudata* Parasitism Response to Medfly Host Fruit and Fruit Infestation Age. **Insects**, v. 10, n. 7, p. 211, 2019. doi: 10.3390/insects10070211.
- HEIMPEL, G. E.; LUNDGREN, J. G. Sex Ratios of Commercially Reared Biological Control Agents. **Biological Control**, v. 19, n. 1, p. 77–93, 2000. doi: 10.1006/bcon.2000.0849.
- HEVE, W. K.; EL-BORAI, F. E.; CARRILLO, D.; DUNCAN, L. W. Biological control potential of entomopathogenic nematodes for management of Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa* Loew (Tephritidae). **Pest Management Science**, v. 73, n. 6, p. 1220–1228, 2017. doi: 10.1002/ps.4447.
- JARRAHI, A.; SAFAVI, S. A. Sublethal effects of *Metarhizium anisopliae* on life table parameters of *Habrobracon hebetor* parasitizing *Helicoverpa armigera* larvae at different time intervals. **BioControl**, v. 61, n. 2, p. 167–175, 2016. doi: 10.1007/s10526-015-9707-y.
- KALVNADI, E.; MIRMOAYEDI, A.; ALIZADEH, M.; POURIAN, H.-R. Sub-lethal concentrations of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* increase fitness costs of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) offspring. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 158, p. 32–42, 2018. doi: 10.1016/j.jip.2018.08.012.
- KITTHWEE, S. Seasonal Occurrence of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), a Parasitoid of *Bactrocera correcta* (Bezzi) (Diptera: Tephritidae) in a Guava Orchard in Central Thailand. **ScienceAsia**, v. 26, n. 2, p. 87, 2000. doi: 10.2306/scienceasia1513-1874.2000.26.087.

- LACEY, L. A.; UNRUH, T. R.; HEADRICK, H. L. Interactions of two idiobiont parasitoids (Hymenoptera: Ichneumonidae) of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) with the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Rhabditida: Steinernematidae). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 83, n. 3, p. 230–239, 2003. doi: 10.1016/S0022-2011(03)00102-2.
- LAWRENCE, P. O. Host vibration - a cue to host location by the parasite, *Bioteres longicaudata*. **Oecologia**, v. 48, p. 249–251, 1981.
- LOUZEIRO, L. R. F.; SOUZA-FILHO, M. F. de; RAGA, A.; SCHMIDT, F. L. Relationship between fruit fly (Diptera: Tephritidae) infestation and the physicochemical changes in fresh fruits. **African Journal of Agricultural Research**, v. 15, n. 1, p. 122–133, 2020. doi: 10.5897/AJAR2019.14533.
- MBATA, G. N.; SHAPIRO-ILAN, D. I. Compatibility of *Heterorhabditis indica* (Rhabditida: Heterorhabditidae) and *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Biological Control**, v. 54, n. 2, p. 75–82, 2010. doi: 10.1016/J.BIOCONTROL.2010.04.009.
- MCCLURE, M.; WHISTLECRAFT, J.; MCNEIL, J. N. Courtship Behavior in Relation to the Female Sex Pheromone in the Parasitoid, *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae). **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, n. 10, p. 1946–1959, 16 out. 2007. doi: 10.1007/s10886-007-9355-5.
- MEIRELLES, R. N.; REDAELLI, L. R.; OURIQUE, C. B. Comparative Biology of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) Reared on *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, v. 96, n. 2, p. 412–418, 2013. doi: 10.1653/024.096.0204.
- MESSING, R. H.; JANG, E. B. Response of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) to host-fruit stimuli. **Environmental Entomology**, v. 21, n. 5, p. 1189–1195, 1992.
- MINAS, R. dos S.; SOUZA, R. M.; DOLINSKI, C.; CARVALHO, R. da S.; BURLA, R. da S. Potential of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae) to control Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) soil stages. **Nematoda**, v. 3, 2016. doi: 10.4322/nematoda.02016.
- MOLLER, A. P. Protandry, sexual selection and climate change. **Glob Change Biol**, v. 10, p. 2028–2035, 2004.
- MONTOYA, P.; BENREY, B.; BARRERA, J. F.; ZENIL, M.; RUIZ, L.; LIEDO, P. Oviposition Behavior and Conspecific Host Discrimination in *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae), a Fruit Fly Parasitoid. **Biocontrol Science and Technology**, v. 13, n. 7, p. 683–690, 2003. doi: 10.1080/09583150310001606273.
- MORBELY, Y. E. Protandry, sexual size dimorphism, and adaptive growth. **J Theor Biol**, v. 339, p. 93–99, 2012.

- PALADINO, L. Z. C.; PAPESCHI, A. G.; CLADERA, J. L. Immature Stages of Development in the Parasitoid Wasp, *Diachasmimorpha longicaudata*. **Journal of Insect Science**, v. 10, n. 56, p. 1–13, 2010. doi: 10.1673/031.010.5601.
- PARANHOS, B. J.; COSTA, M. D. L. Z.; OVRUSKI, S. M.; ALVES, R. M.; BLUMMER, L.; WALDER, J. M. M. Offspring in Response to Parental Female Densities in the Fruit Fly Parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae). **Florida Entomologist**, v. 91, n. 4, p. 628–635, 2008. doi: 10.1653/0015-4040-91.4.628.
- PARANHOS, B. J.; NAVA, D. E.; MALAVASI, A. **Biological control of fruit flies in Brazil** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2019. . doi: 10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.26037.
- RAMADAN, M. M. **Reproductive strategies and mass production of Opiinae (Hymenoptera: Braconidae) parasitoids of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae)**. 1991. University of Hawaii at Manoa, Honolulu., 1991.
- ROHDE, C.; MERTZ, N. R.; JUNIOR, A. M. Entomothogenic Nematodes on control of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Revista Caatinga**, v. 33, n. 4, p. 974–984, 2020. doi: 10.1590/1983-21252020v33n412rc.
- ROHDE, C.; MOINO JUNIOR, A.; CARVALHO, F. D.; SILVA, M. A. T. Selection of entomopathogenic nematodes for the control of the fruit fly *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, n. suppl., p. 797–802, 2012. doi: 10.5039/agraria.v7isa2217.
- ROHR, R. A.; JAHNKE, S. M.; REDAELLI, L. R. Does *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) have a preferential instar to parasitize Tephritidae (Diptera)? **Iheringia - Serie Zoologia**, v. 109, p. e2019014, 2019. doi: 10.1590/1678-4766e2019014.
- SHAURUB, E. H.; SOLIMAN, N. A.; HASHEM, A. G.; ABDEL-RAHMAN, A. M. Infectivity of four entomopathogenic nematodes in relation to environmental factors and their effects on the biochemistry of the Medfly *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**, v. 44, n. 6, p. 610–618, 2015. doi: 10.1007/s13744-015-0332-3.
- SINTUPACHEE, S.; MILNE, J. R.; POONCHAISRI, S.; BAIMAI, V.; KITTAYAPONG, P. Closely Related *Wolbachia* Strains within the Pumpkin Arthropod Community and the Potential for Horizontal Transmission via the Plant. **Microbial Ecology**, v. 51, n. 3, p. 294–301, 2006. doi: 10.1007/s00248-006-9036-x.
- SOUZA, M. M. **Interação de nematoides entomopatogênicos com o parasitoide *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) para o controle de *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)**. 2020. UFLA, 2020.
- VAN DER KOOI, C. J.; MATTHEY-DORET, C.; SCHWANDER, T. Evolution and comparative ecology of parthenogenesis in haplodiploid arthropods. **Evolution Letters**, v. 1, n. 6, p. 304–316, 2017. doi: 10.1002/evl3.30.

VISCARRET, M. M.; LA ROSSA, R.; SEGURA, D. F.; OVRUSKI, S. M.; CLADERA, J. L. Evaluation of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) reared on a genetic sexing strain of *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**, v. 36, n. 2, p. 147–153, 2006. doi: 10.1016/j.biocontrol.2005.08.009.

WOODRING, J. L.; KAYA, H. K. Steinernematidae and Heterorhabditidae nematodes: a handbook of techniques southern cooperative. In: **Series Bulletin**. [s.l: s.n.]1988.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de parasitoides e NEP como agentes de controle biológico está crescendo para complementar os métodos químicos tradicionais, reduzindo assim as preocupações ambientais e de saúde humana associadas ao uso excessivo e inadequado de inseticidas. Além disso, esses agentes de biocontrole são compatíveis com outros métodos de controle, podendo ser utilizados de forma integrada, inclusive a aplicação combinada dos dois agentes para maximizar a eficácia.

Muitos estudos já demonstraram que a combinação de entomopatógenos com entomófagos aumenta a eficácia no controle de pragas. No entanto, alguns relatam efeitos adversos, como a infecção do parasitoide ou a morte prematura do hospedeiro antes que o parasitoide complete seu ciclo de desenvolvimento.

No presente trabalho, foi observado que a infecção das larvas de *C. capitata* por NEP interrompe o desenvolvimento do parasitoide *D. longicaudata* devido a presença das bactérias simbiotes presentes nos JIs e seus metabólitos secundários, o que pode impactar diretamente na eficácia do controle biológico.

Apesar das interferências entre os agentes de controle, este estudo indica que os NEP e os parasitoides podem ser usados de forma conjunta, pois quando as larvas são expostas aos NEP, mas que não demonstra sintomas de infecção, não há impactos negativos no desenvolvimento nem nos parâmetros biológicos do parasitoide.

A avaliação dos impactos da infecção por NEP em doses não letais nos aspectos biológicos e comportamentais dos parasitoides de moscas-do-mediterrâneo sobreviventes é crucial para entender como esses efeitos podem influenciar as futuras gerações do inimigo natural, principalmente no desempenho reprodutivo, na longevidade, na capacidade de busca por hospedeiros e outras características cruciais para a eficácia do controle biológico a longo prazo. Porém, nenhuma interferência na fecundidade desses organismos foi observada, indicando que não há efeitos não letais no cruzamento entre indivíduos saudáveis e aqueles que sobreviveram à infecção por NEP, o que sugere que as gerações futuras da praga e do inimigo natural não são afetadas.

Estes resultados destacam a importância de avaliar minuciosamente as interações entre os agentes de controle biológico e os insetos-alvo, a fim de desenvolver estratégias que reduzam os impactos adversos sobre os inimigos naturais. Uma possibilidade é utilizar os NEP e *D. longicaudata* de forma intercalada para reduzir os níveis populacionais de *C. capitata*.

A estratégia de iniciar a inoculação dos NEP seguida pela liberação dos parasitoides após pelo menos 12 horas permite que as larvas não infectadas sejam parasitadas. Isso ocorre porque as fêmeas de *D. longicaudata* conseguem distinguir entre hospedeiros saudáveis e infectados, depositando seus ovos apenas nos hospedeiros adequados para o desenvolvimento de sua prole, ou seja, nas larvas saudáveis. Alternativamente, é viável liberar primeiro os parasitoides, desde que a inoculação dos NEP ocorra após a formação dos pupários dos hospedeiros parasitados. Os pupários atuam como uma barreira de resistência à infecção por NEP, permitindo que apenas as larvas que escaparam da ação do parasitoide sejam infectadas.

As duas abordagens garantem que o primeiro agente aplicado tenha tempo suficiente para desempenhar seu papel antes da introdução do segundo agente. A sincronização precisa dos tempos de aplicação é essencial para otimizar a eficácia do controle sem comprometer o resultado geral. No entanto, são necessários estudos adicionais para aprimorar a combinação e ajustar as estratégias conforme necessário, levando em consideração variáveis como condições ambientais, densidade populacional das pragas e interações entre os agentes biológicos.

Portanto, este estudo contribui significativamente para o conhecimento científico sobre a ecologia comportamental e aplicada dos NEP e do parasitoide *D. longicaudata* para o controle de *C. capitata* em sistemas agrícolas, fornecendo embasamento para futuras pesquisas de campo e contribuam para o manejo sustentável das moscas-das-frutas. Estudos como esses são importantes devido à dificuldade de controle de *C. capitata*, considerada uma das principais praga da fruticultura mundial, pois é capaz de se adaptar-se a diversas condições climáticas e de infestar várias espécies frutíferas.