

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

APRENDIZAGEM DOS PARASITOIDES *Diachasmimorpha longicaudata*  
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE) E *Aganaspis pelleranoi* (HYMENOPTERA:  
FIGITIDAE) ASSOCIADA A VOLÁTEIS DE FRUTOS

PATRICIA DANIELA DA SILVA PIRES  
Engenheira Agrônoma / UFRGS  
Mestre em Fitotecnia /UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos  
à obtenção do Grau de Doutora em Fitotecnia Área de Concentração Sanidade Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil  
Agosto de 2021

### CIP - Catalogação na Publicação

Pires, Patricia Daniela da Silva  
APRENDIZAGEM DOS PARASITOIDES *Diachasmimorpha*  
*longicaudata* (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) E *Aganaspis*  
*pelleranoi* (HYMENOPTERA: FIGITIDAE) ASSOCIADA A  
VOLÁTEIS DE FRUTOS / Patricia Daniela da Silva Pires.  
-- 2021.  
128 f.  
Orientador: Josué Sant'Ana.

Coorientadora: Luiza Rodrigues Redaelli.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,  
2021.

1. Parasitoides. 2. Braconidae. 3. Figitidae. 4.  
Fruit fly. I. Sant'Ana, Josué, orient. II. Redaelli,  
Luiza Rodrigues, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

PATRÍCIA DANIELA DA SILVA PIRES  
Engenheira Agrônoma - UFRGS  
Mestra em Fitotecnia - UFRGS

## **TESE**

Submetida como parte dos requisitos  
para obtenção do Grau de

### **DOUTORA EM FITOTECNIA**

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia  
Faculdade de Agronomia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 24.08.2021  
Pela Banca Examinadora  
(via videoconferência)

Homologado em: 22.11.2021  
Por

JOSUÉ SANT'ANA  
Orientador - PPG em Fitotecnia  
UFRGS

CARLA ANDRÉA DELATORRE  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Fitotecnia

LUIZA RODRIGUES REDAELLI  
Coorientadora - PPG em Fitotecnia  
UFRGS

ELTON LÚCIO DE ARAÚJO  
PPG em Fitotecnia/UFERSA

RAÚL ALBERTO LAUMANN  
EMBRAPA

RAFAEL DA SILVA GONÇALVES  
PARTAMON

CARLOS ALBERTO BISSANI  
Diretor da Faculdade de  
Agronomia

“Não espere por uma crise para descobrir o que é importante para você”

Platão

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Leni e Heron, por sempre me incentivarem a estudar e que, mesmo não estando mais presentes, sempre estarão na minha vida.

A minha irmã, Paula por sempre estar ao meu lado e ser a minha melhor amiga. A Paloma e ao Pedro, meus gatos, por me fazerem companhia e indicar que as vezes é hora de relaxar e que dormir é importante.

A meu tio Eleú por toda a sua ajuda durante os meus anos de agronomia.

Aos meus orientadores, Dr. Josué Sant'Ana e Dr<sup>a</sup>. Luiza Rodrigues Redaelli pelo ensino, orientação e pelo tempo que dedicaram para a minha formação e pela redação da tese e por compreender as dificuldades enfrentadas no último ano.

Aos amigos que eu fiz durante essa jornada e que sempre quero na minha vida, Cláudia, Jucelio, Nelson, Paloma, Roberta e Fernanda, muito obrigada por todos os doces, almoços e jantares e por muitas vezes aguentarem as minhas conversas e ajudarem a enxugar as minhas lágrimas.

À Dra. Natalia A. Leite pelo auxílio com as análises estatísticas e amizade construída durante esse período.

Aos bolsistas de iniciação científica Geluse e Nicolas pela ajuda na condução dos experimentos.

Aos colegas de laboratório, Camila, Carlos Diego, Dânia, Eduarda, Ezequiel, Fabiane, Joel, Juliana, Mariana, Priscila, Samuel e Thais pelas conversas, risadas e pela convivência.

A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de doutorado.

A Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia pelo ensino gratuito e de qualidade.

**APRENDIZAGEM DOS PARASITOIDES *Diachasmimorpha longicaudata*  
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE) E *Aganaspis pelleranoi*  
(HYMENOPTERA: FIGITIDAE) ASSOCIADA A VOLÁTEIS DE FRUTOS**

Autora: Patricia Daniela da Silva Pires  
Orientador: Josué Sant'Ana  
Coorientadora: Luiza Rodrigues Redaelli

**RESUMO**

*Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae), é um dos principais entraves para a produção e exportação de frutas brasileiras. No Brasil, o parasitoide nativo *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae) e o exótico *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) se destacam como agentes de controle biológico desta praga. O conhecimento dos fatores que afetam as interações entre parasitoides, *A. fraterculus* e frutas hospedeiras pode aumentar o potencial desses agentes em programas de controle biológico. O trabalho objetivou avaliar a influência do condicionamento pré-imaginal e imaginal na aprendizagem e memória olfativa de *A. pelleranoi* e de *D. longicaudata* a voláteis de goiaba vermelha (*Psidium guajava*) e de maçã (*Malus domestica*) em bioensaios de olfatometria e parasitismo. Fêmeas de ambas as espécies de parasitoides (4 a 6 dias de idade) que emergiram de larvas da mosca criadas em dieta artificial, goiaba e maçã ou condicionadas durante a fase adulta a voláteis destes frutos, foram submetidas a testes em olfatômetro Y e parasitismo, com chance de escolha, entre unidades com água ou polpa de um dos frutos. Constatamos que houve incremento nas taxas de parasitismo em *D. longicaudata* associado à memória química dos frutos ingeridos pelo seu hospedeiro. Contudo, este mesmo fator não alterou o comportamento de *A. pelleranoi*. Fêmeas de *A. pelleranoi*, independentemente de seu condicionamento pré-imaginal, preferiram odores de goiaba. Apenas o condicionamento de adultos por 48 horas em substrato contendo maçã, desencadeou mudança de comportamento em testes de olfatometria. Fêmeas de *D. longicaudata* quando condicionadas durante o período pré-imaginal em larvas de *A. fraterculus* que se alimentaram com polpa de goiaba ou maçã, preferiram voláteis do fruto no qual tiveram experiência prévia e intensificaram o parasitismo na presença destes odores, apresentando memória olfativa a estes voláteis, por até 11 dias. O condicionamento imaginal de *D. longicaudata* aos voláteis de frutos, também incrementou o comportamento quimiotático e parasitismo, porém por um período menor. Neste estudo foi possível evidenciar maior plasticidade olfativa do parasitoide exótico em relação ao nativo. Desta forma, o condicionamento de parasitoides aos odores das plantas nas quais seus hospedeiros se desenvolvem, deve ser levado em consideração nas estratégias de criação massal em biofábricas, visando o incremento da ação destes inimigos naturais em pomares comerciais.

---

<sup>1</sup>Tese de doutorado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (128f.) Agosto, 2021.

**LEARNING BY THE PARASITIDS *Diachasmimorpha longicaudata*  
(HYMENOPTERA: BRACONIDAE) AND *Aganaspis pelleranoi*  
(HYMENOPTERA: FIGITIDAE) ASSOCIATED WITH FRUIT VOLATILES**

Author: Patricia Daniela da Silva Pires

Adviser: Josué Sant'Ana

Co-adviser: Luiza Rodrigues Redaelli

**ABSTRACT**

*Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae), is one of the main obstacles to the production and export of Brazilian fruits. In Brazil, the native parasitoid *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae) and the exotic *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) stand out as biological control agents for this pest. Enhancing the knowledge of the factors that affect the interactions between parasitoids, *A. fraterculus* and host fruits can increase the potential of these agents in biological control programs. The aim of this study was to evaluate the influence of pre-imaginal and imaginal conditioning on the learning and olfactory memory of *A. pelleranoi* and *D. longicaudata* to red guava (*Psidium guajava*) and apple (*Malus domestica*) volatiles in olfactory and parasitism bioassays. Females of both species of parasitoids (4 to 6 days old) that emerged from fly larvae reared on artificial diet, guava and apple or conditioned during adulthood to volatiles of these fruits, were subjected to tests in Y olfactometer and parasitism, with a choice between units with water or pulp of one of the fruits. We found that there was an increase in the rates of parasitism in *D. longicaudata* associated with the chemical memory of the fruits ingested by its host. However, this same factor did not change the behavior of *A. pelleranoi*. Females of *A. pelleranoi*, regardless of their pre-imaginal conditioning, preferred guava odors. Only the conditioning of adults for 48 hours in a substrate containing apple, triggered a change in its behavior in olfactory tests. Females of *D. longicaudata*, when conditioned during the pre-imaginal period in *A. fraterculus* larvae that fed on guava or apple pulp, preferred volatiles from the fruit in which they had previous experience, and intensified parasitism in the presence of these odors, presenting olfactory memory to these volatiles, for up to 11 days. The imaginal conditioning of *D. longicaudata* to fruit volatiles also increased the chemotaxis and parasitism behavior, but for a shorter period. In this study, it was possible to show greater olfactory plasticity of the exotic parasitoid in relation to the native one. Thus, the conditioning of parasitoids to the odors of the plants in which their hosts develop should be considered when conducting mass rearing strategies in biofactories with the goal of increasing the action of these natural enemies in commercial orchards.

---

<sup>1</sup> Doctoral Thesis in Plant Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (128p.) August, 2021.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 <i>Anastrepha fraterculus</i> .....	3
2.2 Parasitoides de mosca-das-frutas.....	5
2.2.1 <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> .....	6
2.2.2 <i>Aganaspis pelleranoi</i> .....	8
2.2.3 Comportamento de busca.....	8
2.3 Comunicação química, aprendizagem e memória de parasitoides.....	11
2.4 Referências bibliográficas.....	17
3 ARTIGO 1 – Can <i>Anastrepha fraterculus</i> larval feeding influence chemotaxis and parasitism of <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> and <i>Aganaspis pelleranoi</i> .....	25
3.1 Abstract .....	27
3.2 Introduction .....	28
3.3 Materials and methods .....	30
3.4 Results .....	36
3.5 Discussion .....	40
3.6 References .....	44
4 ARTIGO 2 – Search behavior and parasitism of the native larval fruit fly parasitoid <i>Aganaspis pelleranoi</i> (Hymenoptera, Figitidae) after pre-imaginal and imaginal fruit conditioning.....	55
4.1 Abstract .....	57
4.2 Introduction .....	58
4.3 Materials and methods .....	60



	Página
4.4 Results.....	64
4.5 Discussion .....	66
4.6 References.....	72
5 ARTIGO 3 - Impacto do condicionamento pré-imaginal e imaginal na memória olfativa de <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> (Hymenoptera: Braconidae) a voláteis de frutos .....	85
5.1 Resumo .....	87
5.2 Introdução .....	88
5.3 Material e métodos .....	90
5.4 Resultados .....	94
5.5 Discussão .....	96
5.6 Referências bibliográficas .....	101
6 CONCLUSÕES .....	111
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	114

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
ARTIGO 1	
1 Effect of the type of pre-imaginal conditioning (artificial diet, apple and guava), the species of parasitoid ( <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> and <i>Aganaspis pelleranoi</i> ) and the interaction of these 2 factors in the preference of females to the volatiles of infested or uninfested fruits.....	51
2 Mean number ( $\pm$ SE) of <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> and <i>Aganaspis pelleranoi</i> emerged from <i>Anastrepha fraterculus</i> reared in three different diet and type of parasitism unit (n = 400, 10 /larvae per unit) (brushed with distilled water, guava or apple pulp) ( $25 \pm 2$ °C, $60 \pm 10\%$ RH) .....	52
ARTIGO 2	
1 Mean number ( $\pm$ SE) of parasitized pupae of <i>Anastrepha fraterculus</i> by <i>Aganaspis pelleranoi</i> , emerged parasitoid, and emergence of fruit flies in three types of parasitism units (brushed with distilled water, guava or apple pulp) offered simultaneously to the parasitoid from pre-imaginal conditioning on apple, from imaginal conditioning on apple (during 24 or 48 hours) or inexperienced (from artificial diet) .....	83
2 Mean number ( $\pm$ SE) of pupae of <i>Anastrepha fraterculus</i> , and emergence of <i>Aganaspis pelleranoi</i> in four types of conditioning (inexperienced [from artificial diet], pre-imaginal conditioning on apple, and imaginal conditioning on apple [during 24 or 48 hours]), and in three types of parasitism units (brushed with distilled water, guava or apple pulp) <sup>(1)</sup> .....	84
ARTIGO 3	
1 Número médio ( $\pm$ EP) de pupários de <i>Anastrepha fraterculus</i> parasitados, de adultos de <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> e de mosca-das-frutas que emergiram de três unidades de parasitismo (na presença de água destilada, polpa de goiaba ou de maçã), oferecidas simultaneamente ao parasitoide após diferentes tipos de condicionamento em polpa de goiaba. ....	109
2 Número médio ( $\pm$ EP) de pupários de <i>Anastrepha fraterculus</i> parasitados, de adultos de <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> e de mosca-das-frutas que emergiram de três unidades de parasitismo (na presença de água destilada, polpa de goiaba ou de maçã), oferecidas simultaneamente ao parasitoide após diferentes tipos de condicionamento em polpa de maçã.....	110

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
ARTIGO 1	
1 Chemotaxis responses of <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> females from <i>Anastrepha fraterculus</i> larvae reared on artificial diet (DI-art) (inexperienced), apple (DI-A) or guava (DI-G), tested in double-choice olfactometer submitted to uninfested apple (UA) or guava volatiles (UG) in contrasts with air, apple (IA, UA) or guava volatiles (IG, UG) (infested or uninfested). Numbers on the bars represent the responsive insects. Bars followed by asterisks differ significantly ( $\chi^2$ ; $P < 0.05$ ). .....	51
2 Chemotaxis responses of <i>Diachasmimorpha longicaudata</i> females from <i>Anastrepha fraterculus</i> larvae reared on artificial diet (DI-art) (inexperienced), apple (DI-A) or guava (DI-G), tested in double-choice olfactometer submitted to uninfested apple (UA) or guava volatiles (UG) in contrasts with air, apple (IA, UA) or guava volatiles (IG, UG) (infested or uninfested). Numbers on the bars represent the responsive insects. Bars followed by asterisks differ significantly ( $\chi^2$ ; $P < 0.05$ ). .....	52
ARTIGO 2	
1 Chemotaxic responses of <i>Aganaspis pelleranoi</i> females (pre-imaginal conditioning) from <i>Anastrepha fraterculus</i> larvae reared (A) only on artificial diet or (B) on apple, tested in two-choice olfactometer submitted to apple (IA, UA) or guava volatiles (IG, UG) (infested or uninfested). Numbers on the bars represent the responsive insects. Bars followed by asterisks differ significantly (GLM: binomial distribution; $P < 0.05$ ) .....	80
2 Chemotaxic responses of <i>Aganaspis pelleranoi</i> females (imaginal conditioning) from <i>Anastrepha fraterculus</i> larvae reared on artificial diet previously exposed to apple substrate for 24 or 48 hours, tested in two-choice olfactometer. Adults were submitted to apple (IA) or guava volatiles (IG) (infested). Numbers on the bars represent the responsive insects. Bars followed by asterisks differ significantly (GLM: binomial distribution; $P < 0.05$ ) .....	81

- 3 Chemotaxic responses of *Aganaspis pelleranoi* females from *Anastrepha fraterculus* larvae reared on artificial diet, previously exposed to apple substrate for 48 hours, and tested for a period of 1, 12 and 24 hours after imaginal conditioning in two-choice olfactometer submitted to apple (IA) or guava volatiles (IG) (infested). Numbers on the bars represent the responsive insects. Bars followed by asterisks differ significantly (GLM: binomial distribution;  $P < 0.05$ ). ..... 82
- ARTIGO 3
- 1 Respostas quimiotáxicas de fêmeas de *Diachasmimorpha longicaudata* oriundas de larvas de *Anastrepha fraterculus* mantidas (A) em goiaba ou (B) maçã (condicionamento pré-imaginal), testadas em olfatômetro de dupla escolha em diferentes idades, submetidas aos voláteis de goiaba infestada ou maçã infestada. Números dentro das barras representam o número de insetos responsivos. Barras seguidas de asteriscos diferem significativamente por contrastes do modelo escolhido ( $P < 0,05$ ). NS = Não significativo..... 106
- 2 Respostas quimiotáxicas de fêmeas de *Diachasmimorpha longicaudata* oriundas de larvas de *Anastrepha fraterculus* mantidas em dieta artificial, previamente expostas ao substrato de (A) goiaba e (B) maçã por 24, 48 e 72 horas (condicionamento imaginal) e testadas por um período de 1, 24 e 48 horas após o condicionamento em olfatômetro de dupla escolha submetidas aos voláteis de goiaba ou maçã infestada. Números dentro das barras representam o número de insetos responsivos. Barras seguidas de asteriscos diferem significativamente por contrastes do modelo escolhido ( $P < 0,05$ ). NS = Não significativo..... 107
- 3 Número médio de pupas formadas e pupários parasitados (parasitoide emergido + pupários com parasitoides) de *Anastrepha fraterculus*, de adultos de parasitoides *Diachasmimorpha longicaudata* e de mosca-das-frutas emergidas, a partir da exposição de fêmeas do parasitoide (com 4 dias de emergência) oriundas de larvas que se alimentaram de dieta artificial submetidas, simultaneamente, a três unidades de parasitismo (água destilada, polpa de goiaba e polpa de maçã). Barras ( $\pm$  EP) seguidas pelas mesmas letras dentro de cada parâmetro biológico não diferem entre si por contrastes do modelo escolhido ( $P < 0,05$ ) ..... 108

## 1 INTRODUÇÃO

A mosca-das-frutas sul-americana, *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae), é um dos principais entraves para a produção e exportação de frutas brasileiras. O dano é causado tanto pela oviposição no fruto, que facilita a entrada de patógenos e pode causar a deformação deste, quanto pelo hábito carpófago das larvas, que formam galerias, alterando o sabor e causando amadurecimento e queda precoce do mesmo.

A principal forma de controle das moscas-das-frutas é através de pulverizações de inseticidas, os quais também são utilizados em iscas tóxicas. No entanto, a crescente demanda por alimentos e por um ambiente com menos inseticidas tem exigido a busca de novas ferramentas para o controle da mosca. A utilização de micro himenópteros que parasitam larvas de terfritídeos é uma alternativa viável para mitigar os danos causados pela praga. Dentre os parasitoides que atuam no controle biológico de *A. fraterculus* destaca-se a espécie nativa, *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes) (Hymenoptera: Fitigidae) e a exótica, *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera, Braconidae), esta última com registro para controle da mosca em países da América Latina, inclusive no Brasil.

Para parasitoides de mosca-das-frutas, a detecção de odores oriundos dos frutos que abrigam seus hospedeiros é de fundamental importância na busca pelo herbívoro.

Contudo, esta percepção pode variar, entre outros fatores, de acordo com hábito, habitat, tipo de espécie de parasitoide e plasticidade olfativa deste organismo, ou seja, de sua capacidade em aprender a reconhecer novos estímulos. Desta forma, a plasticidade associada à memória faz parte das estratégias de sobrevivência dos parasitoides, aumentando a aptidão destes insetos ao meio.

Apesar da importância de *A. pelleranoi* e *D. longicaudata* no controle de moscas-das-frutas, não existem informações sobre o impacto do condicionamento pré-imaginal vs. imaginal destes parasitoides, relacionado ao tipo e a duração do estímulo, bem como a influência destes fatores na memória olfativa destes insetos a odores de frutos. O conhecimento dos aspectos que interferem nas interações entre os parasitoides, *A. fraterculus* e frutos hospedeiros pode ser uma informação importante na escolha da espécie de parasitoide a ser utilizada em um determinado sistema. Além disso, o condicionamento químico poderia ser uma nova ferramenta a ser utilizada em biofábricas para potencializar a busca e o parasitismo destes insetos antes da liberação.

Desta forma este estudo teve como objetivo geral avaliar a influência do condicionamento pré-imaginal e imaginal na aprendizagem e memória olfativa de fêmeas de *A. pelleranoi* e de *D. longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) a voláteis de goiaba vermelha (*Psidium guajava* L.) e de maçã (*Malus domestica* Borkh) em bioensaios de olfatometria e parasitismo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Anastrepha fraterculus*

Um dos maiores entraves à produção e livre comercialização de frutos frescos no mundo é a presença de insetos-praga como as moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) (Botton *et al.*, 2012). Insetos dessa família têm sido responsáveis por grandes perdas na produção de diversas frutíferas, além de ser um obstáculo ao livre trânsito no comércio internacional de frutas devido às restrições quarentenárias pelos países importadores (Lanzavecchia, 2014; Ekesi *et al.*, 2016).

*Anastrepha fraterculus*, conhecida como mosca-das-frutas sul-americana, está distribuída entre os extremos latitudinais da América do Sul (Ruiz *et al.*, 2014). A importância dessa espécie é maior nos países do sul do continente, como a Argentina, Uruguai e Brasil, sendo considerada uma praga primária nestas regiões (Ruiz *et al.*, 2021). Os adultos de *A. fraterculus* possuem cerca de 7 mm de comprimento e 16 mm de envergadura, coloração amarela com asas transparentes e duas manchas características, uma em forma de “S” na parte central e uma em “V” invertida no ápice (Salles, 1995; Nava & Botton, 2010). A duração do ciclo de vida é dependente das condições ambientais. Salles (2000) determinou que num intervalo de temperaturas entre 15 e 30°C, sendo a temperatura de 25 °C a mais indicada para o seu desenvolvimento. Segundo o autor, nessa temperatura,

a duração média para os estágios de ovo, larva e pupa é de 2,8; 12,7 e 14,1 dias, respectivamente.

A longevidade média, em condições de laboratório para fêmeas de *A. fraterculus* é de 115 dias e a de machos, 100 (25 °C, 70-80% UR, 16 horas de fotofase) (Joachim-Bravo *et al.*, 2003). O período de pré-oviposição varia entre 7 e 30 dias e o de oviposição dura, em média, 80 dias (Salles, 2000).

O dano da mosca-das-frutas sul-americana é causado tanto pela oviposição no fruto, que facilita a entrada de patógenos e pode causar a deformação destes, quanto pelo hábito carpófago das larvas, que formam galerias nos frutos, alteram o sabor e causam amadurecimento e queda precoce dos mesmos (Malavasi, 2000; Aguiar-Menezes *et al.*, 2004; Botton *et al.*, 2005). O controle de moscas-das-frutas é desafiador porque no terceiro ínstar, as larvas deixam os frutos em decomposição e penetram no solo, onde transformam-se em pupas; conseqüentemente, as larvas e as pupas são protegidas dos inseticidas aplicados tanto em cobertura quanto na forma de iscas tóxicas (Heve *et al.*, 2018).

As formas de controle utilizadas para *A. fraterculus* dependem do monitoramento do número de indivíduos no pomar (mosca/armadilha/dia), através de armadilhas do tipo McPhail contendo atrativo alimentar (Cera Trap<sup>®</sup>, BioAnastrepha<sup>®</sup>) ou suco de frutas (Arioli *et al.*, 2015). As avaliações devem ser semanais e o nível de ação é de 0,5 a um adulto/armadilha/dia (Nascimento *et al.*, 2000). Atingido este nível, o controle químico é realizado com o uso de inseticidas dos seguintes grupos químicos: espinosinas, neonicotinoides, organofosforados e piretroides (Agrofit, 2021). O controle das moscas-das-frutas com inseticidas está se tornando mais difícil em muitos países, como no Brasil, devido a questões associadas a resistência e da retirada do mercado de inseticidas com



elevado impacto ambiental e toxicidade, desta forma é necessário a utilização de outras técnicas que viabilizem o manejo da praga (Botton *et al.*, 2016).

Uma das formas de controle de mosca-das-frutas é através da utilização de inimigos naturais, como *D. longicaudata*, parasitoide mais utilizado em programas de controle biológico nas Américas, com registros para criação e liberação em território brasileiro (ANVISA, 2021; BRASIL, 2021). No entanto, ainda não existem atualmente biofábricas no Brasil operando para a produção e comercialização deste parasitoide.

## **2.2. Parasitoides de moscas-das-frutas**

Os parasitoides são pequenas vespas, cuja fase imatura (larva) se alimenta exclusivamente de um hospedeiro levando-o à morte, enquanto os adultos são de vida livre (Godfray, 1994). No Brasil, as espécies de parasitoides que atacam moscas-das-frutas são himenópteros das famílias Braconidae, Figitidae, Pteromalidae e Diapriidae (Paranhos *et al.*, 2019). Dentre os parasitoides nativos associados à mosca-das-frutas sul-americana são registrados na família Braconidae, *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti), *Doryctobracon brasiliensis* (Szépligeti), *Doryctobracon fluminensis* (Lima), *Opius bellus* Gahan e *Utetes anastrephae* (Viereck); em Figitidae são referidos *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes) e *Odontosema anastrephae* Borgmeier; em Pteromalidae, *Pachycrepoides vidimae* (Rondani) e em Diapriidae, *Trichopria anastrephae* Lima (Paranhos *et al.*, 2019).

Braconídeos são considerados os mais eficazes inimigos naturais das moscas-das-frutas (Silva *et al.*, 2007), são endoparasitoides, cenobiontes, que ovipositam em ovos ou larvas do hospedeiro e emergem do pupário (Wharton, 1989). Esta família inclui *D. areolatus* que é frequentemente a espécie dominante em levantamentos realizados no Brasil

(Marinho *et al.*, 2009; Nunes *et al.*, 2012; Pereira-Rêgo *et al.*, 2013) e *U. anastrephae*, parasitoide com o menor ovipositor dentre os braconídeos, normalmente recuperado de frutos coletados do solo (Sivinski *et al.*, 2000). Também faz parte dessa família espécies exóticas como *D. longicaudata*, parasitoide de larvas e *Fopius arisanus* (Sonan) (Hymenoptera, Braconidae) considerado como potencial agente no controle biológico por parasitar ainda na fase de ovo (Zenil *et al.*, 2004). Na família Figitidae, *A. pelleranoi* é a espécie mais abundante e amplamente dispersa no Brasil (Guimarães *et al.*, 1999; Nunes *et al.*, 2012).

### **2.2.1 *Diachasmimorpha longicaudata***

A utilização de parasitoides para o controle de moscas-das-frutas da família Tephritidae iniciou no Havaí, logo após a introdução da mosca-do-mediterrâneo *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) (Carvalho *et al.*, 2000). Nesse programa, a espécie *D. longicaudata* destacou-se pela facilidade de criação em laboratório e rápida adaptação ao ambiente (Baranowski *et al.*, 1993; Carvalho *et al.*, 2000).

Em 1994, *D. longicaudata* foi importada dos EUA e introduzida no Brasil pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical com o objetivo de verificar a eficácia e o comportamento nos pomares do nordeste do Brasil (Carvalho; Nascimento, 2002). Além de ser de fácil criação e multiplicação, *D. longicaudata* tem pouca especificidade com o hospedeiro, podendo parasitar larvas de *C. capitata* e várias espécies do gênero *Anastrepha* (Carvalho; Nascimento, 2002).

Meirelles *et al.* (2015) constataram, em laboratório, que o tempo de desenvolvimento de ovo-adulto em temperatura de 25 °C foi de  $17,9 \pm 0,13$  e de  $18,5 \pm$

0,15 dias para *D. longicaudata*, em *A. fraterculus* e *C. capitata*, respectivamente. Os autores observaram que a longevidade diminuiu de  $52,7 \pm 2,49$  para  $27,0 \pm 1,64$  dias com o aumento da temperatura de 18 °C para 25 °C. A cópula pode ocorrer logo após a emergência (Greany *et al.*, 1977; Sivinski & Webb, 1989). Os ovos, se fecundados, dão origem a fêmeas e, não fecundados, a machos (Carvalho, 2003). Segundo Greany *et al.* (1977), a progênie dos primeiros dias resulta em um número maior de fêmeas. Machos de *D. longicaudata* emergem, pelo menos, dois dias antes das fêmeas (25 °C) (Gil, 2003) e podem copular mais de uma vez (Martinez, 1992).

*Diachasmimorpha longicaudata* se desenvolve no interior da larva hospedeira e o adulto emerge após a formação do pupário (Carvalho; Nascimento, 2002). Larvas deste inseto, durante suas fases iniciais, possuem a cápsula mandibular e cefálica bem desenvolvidas, fatores que podem torná-la mais competitiva em relação a outros grupos de parasitoides de mosca-das-frutas (Paladino *et al.*, 2010; Murillo *et al.*, 2016).

As fêmeas de *D. longicaudata* preferem ovipositar em larvas de mosca-das-frutas de terceiro ínstar (Purcell *et al.*, 1994; Meirelles *et al.*, 2013). Greany *et al.* (1977) verificaram a presença de receptores no ovipositor de *D. longicaudata* capazes de discriminar larvas já parasitadas. Este fator pode influenciar a razão sexual, ou seja, imaturos de *A. fraterculus* quando foram expostos duas vezes a fêmeas de *D. longicaudata* originaram mais fêmeas do parasitoide, diferindo das que foram expostas somente uma vez ao parasitismo, cuja razão sexual foi desviada para machos (Rohr, 2019).

### **2.2.2 *Aganaspis pelleranoi***

*Aganaspis pelleranoi* é um parasitoide neotropical importante agente de controle biológico de *A. fraterculus* e de *C. capitata*, distribuído em todas as regiões do Brasil (Guimarães *et al.*, 1999), frequentemente encontrado em pomares de mirtáceas (Guimarães *et al.*, 1999; Guimarães *et al.*, 2003). Os machos possuem antenas maiores (3,9 – 4,0 mm) que as fêmeas (1,8 - 2,0 mm), o que permite a sua diferenciação sexual (Tormos *et al.*, 2013). A duração do ciclo de vida de *A. pelleranoi* em larvas de *A. fraterculus* a uma temperatura de 25 °C é, em média, 30 dias. Insetos mantidos a 20 °C apresentaram um maior número de descendentes ( $37,46 \pm 4,06$ ) do que os mantidos a 30 °C ( $5,46 \pm 1,80$ ), com maior emergência de fêmeas (Gonçalves *et al.*, 2014).

Devido ao tamanho do seu ovipositor, as fêmeas de *A. pelleranoi* buscam larvas de seu hospedeiro em frutos caídos (Ovruski *et al.*, 2000; Ovruski & Aluja, 2002) ou em pequenas rachaduras (Sivinski *et al.*, 2000). A vibração das larvas servem de pistas para localização do hospedeiro, enquanto caminham na superfície do fruto (Guimarães & Zucchi, 2004). Geralmente são encontrados nos pomares durante o período final de maturação dos frutos, normalmente parasitando as larvas que, de alguma forma, escaparam do parasitismo por braconídeos (Guimarães & Zucchi, 2004).

### **2.2.3 Comportamento de busca**

O processo de localização em parasitoides compreende uma série de estímulos associados ao hospedeiro e seu habitat e envolve não somente as pistas químicas, como também as visuais e táteis (Vinson, 1976; Benelli *et al.*, 2013; Canale *et al.*, 2014). Esse processo, de modo geral, pode ser dividido em quatro etapas: a) localização do habitat do

hospedeiro, que envolve pistas do ambiente e, geralmente, deslocamento de médias e longas distâncias; b) localização do hospedeiro, que consiste na busca por sinais emitidos diretamente pelo inseto, c) reconhecimento e d) escolha do hospedeiro para oviposição (Flanders, 1953).

Dentre os voláteis envolvidos na comunicação de parasitoides, destacam-se os cairomônios, substâncias que beneficiam somente o receptor, bem como os sinomônios, os quais favorecem tanto o emissor como o receptor do sinal químico (Nordlund & Lewis, 1976). Biancheri *et al.* (2019) observaram que fêmeas de *D. longicaudata* são capazes de detectar voláteis de larvas de tefritídeos sem a presença de substrato de alimentação, indicando que esses cairomônios emitidos pelo hospedeiro podem servir de pistas químicas, pelo menos a curtas distâncias, possivelmente para insetos que parasitam larvas expostas ao ambiente. Tanto cairomônios quanto sinomônios são percebidos por células nervosas localizadas dentro de sensilas olfativas presentes, principalmente, nas antenas (Atkins, 1980), sendo estas a mais importante ferramenta utilizada pela maioria dos parasitoides na localização de hospedeiros (Vet & Dicke, 1992; Godfray, 1994).

Durante o processo evolutivo, as plantas desenvolveram uma ampla gama de mecanismos de defesa para conter os ataques de herbívoros, que são categorizados como constitutivos (pré-formados) e induzidos; tanto as defesas constitutivas quanto as induzidas podem ter ação direta ou indireta (Karban & Chen, 2007). As defesas indiretas são definidas por Dicke & Baldwin (2010) como um conjunto de características que aumentam a eficiência de busca de inimigos naturais, como a emissão de voláteis induzida pelo ataque de herbívoros. Em algumas espécies, a produção de maiores volumes de néctar floral é uma estratégia para atrair mais parasitoides e predadores (War *et al.*, 2012). No entanto, a

maioria das estratégias é baseada na emissão de compostos voláteis produzidos pelo metabolismo secundário de uma planta, atuando na proteção contra o ataque de herbívoros, além de atrair parasitoides e/ou predadores (Yuan *et al.*, 2008; War *et al.*, 2012).

A ação da herbivoria em relação ao comportamento quimiotáxico e parasitismo já foi registrada para braconídeos. Silva *et al.* (2007) que avaliaram a resposta olfativa de fêmeas de *D. areolatus* aos voláteis de frutos de goiaba infestados por larvas de *A. fraterculus* e *C. capitata*. Os autores observaram que as fêmeas não distinguiram entre as espécies de moscas, mas tiveram uma percepção diferenciada entre frutos infestados ou não. Fêmeas de *F. arisanus* em ensaios de olfatometria preferiram voláteis de peras infestadas com *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae) a frutos não infestados (Cai *et al.* 2020). Pires *et al.* (2021) observaram que fêmeas de *D. longicaudata* são atraídas para goiabas e maçãs infestadas em detrimento as sadias.

Entre os mecanismos de defesa das plantas, os constitutivos também já foram observados na atração de parasitoides, como os voláteis de goiaba não infestadas, os quais atraíram fêmeas de *F. arisanus*, mesmo na ausência de seu hospedeiro (Altuzar *et al.*, 2004). Segura *et al.* (2016) constataram que fêmeas de *D. longicaudata* podem diferenciar voláteis de frutos, preferindo os de figo em relação aos de pêssego. Fêmeas de *D. longicaudata* oriundas de larvas de *A. fraterculus* foram capazes de detectar odores de mangas e goiabas, contudo apresentaram preferência inata pelos de manga (Zadra *et al.*, 2018).

A percepção aos odores de plantas por parasitoides também pode depender do hábito alimentar de seus hospedeiros, podendo ser mais perceptivos a voláteis de diversas plantas ou ter uma relação mais específica com determinados voláteis oriundos do habitat

de seu hospedeiro (Vinson, 1976; Turlings *et al.*, 1993; Bruce *et al.*, 2005). Segundo Dukas (1998), espécies generalistas percebem diversos estímulos de plantas em diferentes proporções, enquanto as especialistas têm uma percepção mais qualitativa.

### **2.3 Comunicação química, aprendizagem e memória de parasitoides**

Os sinais químicos são percebidos nos insetos por células nervosas localizadas dentro de sensilas olfativas presentes, principalmente, nas antenas (Atkins, 1980), sendo a mais importante ferramenta utilizada pela maioria dos parasitoides na localização de hospedeiros (Vet & Dicke, 1992; Godfray, 1994). O sistema sensorial dos insetos é caracterizado por elevada especificidade e sensibilidade e a codificação e recepção de compostos químicos ocorre por intermédio de proteínas de ligação hidrossolúveis, tais como as proteínas odoríferas de ligação (POLs) ou OBPs (*Odorant Binding Proteins*) (Leal, 2013). Segundo os autores, estas estruturas atuam como veículos moleculares para transportar e distribuir o odor para os receptores olfativos. Mudanças na percepção após a aprendizagem podem estar associadas à ativação de genes responsáveis pela síntese de proteínas de ligação presentes em antenas de insetos (Zhou, 2010). A presença destas estruturas nos insetos é fator crucial para o encontro do parasitoide com o hospedeiro (Liu *et al.*, 2018). De acordo com Tang *et al.* (2020), *D. longicaudata* apresenta genes que expressam diferentes proteínas (como as POLs) associadas ao olfato, as quais podem ser quali e quantitativamente distintas quando as vespas são oriundas de larvas de mosca das frutas que se alimentaram de goiaba, manga ou carambola. Os autores enfatizaram que este é um indicativo que algumas transcrições codificam POLs específicas, as quais têm a capacidade de discriminar diferentes odores em função do tipo de estímulo recebido. As

POLs interagem com receptores odoríferos específicos na membrana dos neurônios originando potenciais de ação. Este sinal é transmitido aos lóbulos antenais que transferem estas informações para o protocérebro e corpos cogumelares (CCs) (Benton, 2009).

A busca do parasitoide por hospedeiros é um comportamento inato, contudo pode ser modificado através da experiência, podendo resultar em uma aprendizagem (Vet *et al.*, 1995; Vinson, 1998). A aprendizagem é a aquisição de representações neurais estimuladas por novas informações oriundas do ambiente como características visuais, olfativas e auditivas e pode variar muito entre espécies (Dukas, 2008; Koppik *et al.*, 2015).

A mudança de comportamento dos insetos pode ser o resultado tanto de uma aprendizagem não associativa como associativa (Matthews & Matthews, 2010). Esta última, segundo os autores, ocorre através da associação de dois estímulos (um condicionado e outro incondicionado) anteriormente não relacionados e inclui reforço (Matthews & Matthews, 2010). Os eventos ligados podem ser a própria ação do animal e um reforço resultante no caso de aprendizagem operante (seleção natural) ou um estímulo neutro (estímulo condicionado) e um estímulo biologicamente relevante, positivo (recompensas) ou negativo (punições) (estímulo não condicionado) no caso da aprendizagem pavloviana (Pavlov, 2010; Matthews & Matthews, 2010). Este tipo de aprendizagem foi registrado para *Psytalia concolor* (Szépliget) (Hymenoptera: Braconidae) (Benelli & Canale, 2012; Canale *et al.*, 2014) e *F. arisanus* (Monsia *et al.*, 2019).

Na aprendizagem não associativa o indivíduo é exposto a apenas um estímulo, que pode ser repetitivo (constante) e resultar em habituação ou pode ser único e suficiente para induzir a sensibilização (Matthews & Matthews, 2010). A aprendizagem irá desencadear



novos padrões de comportamento frente a um estímulo específico, sendo que, na natureza, estas mudanças trariam alguma vantagem adaptativa para o organismo (Squirre & Kandel, 1999, Matthews & Matthews, 2010). A ocorrência de aprendizagem química não associativa já foi observada nos parasitoides braconídeos, *Biosteres arisanus* (Sonan) (Dukas & Duan, 2000) e *D. longicaudata* (Zadra *et al.*, 2018, Pires, *et al.*, 2021), assim como a visual em *D. longicaudata* (Segura *et al.*, 2007).

A aprendizagem e o comportamento de busca dos parasitoides pode ser influenciado pela experiência durante diferentes fases do seu ciclo de vida (Corbet, 1985; Turlings *et al.*, 1993). A resposta de fêmeas pode ser induzida por aprendizagem na fase de larva (Vet, 1983), na emergência (Kester; Barbosa, 1991), durante todo o período de vida adulta (De Jong; Kaiser, 1991) ou em mais de um momento do desenvolvimento (Cortesero *et al.*, 1995). Segundo Cobert (1985), as informações adquiridas na fase imatura podem ser transmitidas para a fase adulta pela Hipótese do Legado Químico, a qual prediz que os compostos químicos presentes no ambiente de desenvolvimento larval também estariam presentes na hemolinfa dos insetos ou na camada mais externa do hospedeiro e influenciariam na resposta quimiosensorial e na escolha do adulto.

Em holometábolos, a aquisição de aprendizado na fase imatura está relacionada às alterações do sistema nervoso que ocorrem durante o desenvolvimento larval e podem persistir na fase adulta (Barron & Corbet, 1999). *Hyssopus pallidus* (Askkwe) (Hymenoptera: Eulophidae), parasitoide de *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae), quando permaneceu em contato com extrato de maçã na fase imatura, foi capaz de responder positivamente a este odor quando adulto (Gandolfi *et al.*, 2003). Fêmeas de *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae) passaram a responder

positivamente ao odor de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (Poales: Poaceae), substância repelente a esta espécie, após aprendizagem na fase imatura (Tognon *et al.*, 2013).

Estudos conduzidos com *D. longicaudata* constataram que fêmeas de provenientes de larvas de *A. fraterculus* mantidas em goiabas, preferiram mais as unidades de parasitismo pinceladas com a polpa deste fruto, o mesmo tipo de comportamento foi observado pelo grupo de fêmeas oriundas de mangas, no qual o percentual de parasitismo foi superior ao tratamento controle (Zadra *et al.*, 2018). Além disso os autores, verificaram que o parasitoide com experiência ao odor passou a preferir unidades de parasitismo que continham o volátil ao qual haviam sido condicionados, mesmo que essa experiência tenha ocorrido na sua fase pré-imaginal. Pires *et al.* (2021) observaram que fêmeas de *D. longicaudata* oriundas de larvas de *A. fraterculus* que se alimentaram de goiaba ou maçã foram mais atraídas a esses odores e parasitaram mais unidades que continham a polpa desses frutos, no entanto, o mesmo comportamento não foi relatado para fêmeas de *A. pelleranoi*. Conforme os autores, fêmeas inexperientes de *A. pelleranoi* oriundas de larvas que se alimentaram de dieta artificial foram mais atraídas para os voláteis de goiaba quando contrastados com maçã, sendo que esse comportamento não se modificou quando as fêmeas eram oriundas de larvas que se alimentaram de maçã, mantendo a sua preferência inata por voláteis de goiaba.

Dependendo do tipo e intensidade de estímulo, as informações aprendidas pelos insetos podem ficar armazenadas nos corpos cogumelares (CCs), resultando em memória (Giurfa & Sandoz, 2012). Os CCs são compostos por um par de neurópilos e consistem em uma camada formada por conjuntos de milhares de neurônios (células de Kenyon), unidos

paralelamente, ocorrendo em ambos os lados do corpo central do protocérebro, seguidos por uma protuberância em formato de cálice, haste ou pedúnculo e por duas saliências que formam um ângulo reto (Heisenberg, 1998). Segundo o autor, estão separados do resto do cérebro por um revestimento fino de glia que forma uma bainha, as células de Kenyon ficam dentro desta bainha e sua organização estabelece a forma dos CCs. Nos insetos, existe uma diferença no tamanho e na forma dos CCs, sendo que o número de células de Kenyon pode variar de 2.500 em moscas, a 200 mil em baratas (Schurmann, 1987).

A memória em insetos pode ser classificada como curta, média e longa, podendo existir simultaneamente (Menzel, 1999). De acordo com o autor, a consolidação da memória pode ocorrer em diferentes períodos, isto dependerá das experiências a que o inseto é submetido e das vantagens adaptativas associadas a aprendizagem frente a um novo estímulo. Em *Drosophila* spp., a memória apresenta cinco fases temporais distintas: aquisição ou aprendizagem; memória de curta duração, a qual decai 30 minutos após o treino; memória de média duração, a qual persiste, por aproximadamente 3 horas; memória de anestesia, que decai no prazo de quatro dias e memória de longa duração que se mantém por mais de uma semana (Dubnau & Tully, 1998). Em vespas parasitoides, a duração da memória de médio prazo pode ser adquirida após um único evento de treinamento e duram apenas algumas horas (Smid *et al.*, 2007). Fêmeas de *Telenomus podisi* condicionados aos voláteis de capim limão durante todo o desenvolvimento na fase imatura alteraram a sua preferência quimiotóxica por até 72 horas (Tognon *et al.*, 2013). Sobhy *et al.* (2019) ao avaliarem as respostas de fêmeas de *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) previamente condicionadas a odores de leveduras por 24 horas, observaram que essas respostas desapareciam 48 horas após o condicionamento. Fêmeas de *Nasonia vitripennis*

Walker (Hymenoptera: Pteromalidae) condicionadas aos odores de canela na presença do hospedeiro mostraram preferência por esse odor sendo capaz de manter essa memória olfativa por até 24 horas (Schurmann *et al.*, 2015). Fêmeas de *D. longicaudata* também foram capazes de modificar a sua resposta olfativa a odores não relacionado ao hospedeiro ou seu habitat, ou seja, quando expostas ao óleo essencial de baunilha por um período de quatro horas foram capazes de reconhecer esse odor e mantiveram uma memória olfativa de até 24 horas (Zadra *et al.* 2018).

Apesar da importância destes inimigos naturais, poucos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a influência da alimentação do hospedeiro de origem e/ou do condicionamento imaginal na aprendizagem e memória destes parasitoides em relação ao comportamento de busca e parasitismo. O conhecimento dos aspectos que interferem nas interações entre os parasitoides, *A. fraterculus* e frutos hospedeiros podem potencializar o uso destes agentes em programas de controle biológico.

## 2.5 Referências

AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Consulta de praga/doença. *Anastrepha fraterculus*. Disponível em: [http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 2 jan. 2021.

AGUIAR-MENEZES, E. L. *et al.* Moscas-das-frutas. In: CASSINO, P. C. R.; RODRIGUES, W. C. (coord.). **Citricultura Fluminense: principais pragas e seus inimigos naturais**. Seropédica: Ed. Universidade Rural, 2004. p. 67-84.

ALTUZAR, A.; MONTOYA, P.; ROJAS, J. C. Response de *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae) to fruit volatiles in a wind tunnel. **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 87, n. 4, p. 616-618, 2004.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Monografias de agrotóxicos. *Diachasmimorpha longicaudata*. Brasília, DF, [2021]. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/d/4303json-file-1/view>. Acesso em: 4 maio 2021.

ARIOLI, C. J. *et al.* Como combater mosca-das-frutas em pomares domésticos? *In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL CIÊNCIA, SAÚDE E TERRITÓRIO*, 3., 2015, Lages, SC. **Anais**. Lages: UNIPLAC, 2015. p. 320-325. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/305387187\\_Como\\_combater\\_mosca-das-frutas\\_em\\_pomares\\_domesticos](https://www.researchgate.net/publication/305387187_Como_combater_mosca-das-frutas_em_pomares_domesticos). Acesso em: 2 abr. 2021.

ATKINS, M. D. **Introduction to insect behavior**. New York: Macmillan, 1980. 237 p.

BARANOWSKI, R.; GLENN, H.; SIVINSKI, J. Biological control of the caribbean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, Gainesville, v. 76, p. 245-251, 1993.

BARRON, A. B.; CORBET, S. A. Pré-imaginal conditioning in *Drosophila* revisited. **Animal Behaviour**, London, v. 58, n. 3, p. 621-628, 1999.

BENELLI, G.; CANALE, A. Learning of visual cues in the fruit fly parasitoid *Psytalia concolor* (Szepligeti) (Hymenoptera: Braconidae). **Biological Control**, Orlando, v. 57, p. 767-777, 2012.

BENELLI, G. *et al.* Behavioral and electrophysiological responses of the parasitic wasp *Psytalia concolor* (Szépligeti) (Hymenoptera: Braconidae) to *Ceratitidis capitata* induced fruit volatiles. **Biological Control**, Orlando, v. 64, p. 116-124, 2013.

BENTON, R. Molecular basis of odor detection in insects. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1170, n. 4, p. 478-481, 2009.

BIANCHERI, M. J. B. *et al.* Response of two parasitoid species (Hymenoptera: Braconidae, Figitidae) to tephritid host and host food substrate cues. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 143, n. 4, p. 344-356, 2019.

BOTTON, M. *et al.* Manejo de pragas na cultura do pessegueiro. *In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO*, 8., 2005, Fraiburgo. **Anais**. Fraiburgo: EPAGRI, 2005. v. 1, p. 155-161.

BOTTON, M. *et al.* Novas alternativas para o monitoramento e controle de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae) na fruticultura de clima temperado. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA*, 22., 2012, Bento Gonçalves-RS. [**Anais ...**]. Bento Gonçalves: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2012. [p. 1-14].

BOTTON, M. *et al.* Moscas-das-frutas na fruticultura de clima temperado: situação atual e perspectivas de controle através do emprego de novas formulações de iscas tóxicas e da captura massal. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 29, n. 2, p. 103-108, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Mobilidade Social, do Produtor Rural e do Cooperativismo. Instrução normativa conjunta n. 2 de 29 de agosto de 2018. **Diário Oficial da União**: Seção 1, Brasília, DF, n. 170, p. 27-31, 3 set. 2018. Disponível em: [https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/39325537/do1-2018-09-03-instrucao-normativa-conjunta-n-2-de-29-de-agosto-de-2018-39325208](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/39325537/do1-2018-09-03-instrucao-normativa-conjunta-n-2-de-29-de-agosto-de-2018-39325208). Acesso em: 4 maio 2021.

BRUCE, T. J. A.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. Insect host location: a volatile situation. **Trends in Plant Science**, Philadelphia, v. 10, p. 269-274, 2005.

CAI, P. *et al.* Chemical cues induced from fly-oviposition mediate the host-seeking behaviour of *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae), an effective egg parasitoid of *Bractocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae), within a tritrophic context. **Insects**, Basel, v. 11, n. 231, p. 1-14, 2020.

CANALE, A. *et al.* Associative learning for host-induced fruit volatiles in *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae), a koinobiont parasitoid of tephritid flies. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 104, p. 774-780, 2014.

CARVALHO, R. S. **Estudos de laboratório e de campo com o parasitoide exótico *Diachasmimorpha longicaudata* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae) no Brasil**. 2003. 182 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

CARVALHO, R. S.; NASCIMENTO, A. S. Criação e utilização de *Diachasmimorpha longicaudata* para controle biológico de moscas-das-frutas. *In*: PARRA, J. R. P. *et al.* (ed.). **Controle biológico no Brasil: parasitoides e predadores**. São Paulo: Manole, 2002. p. 65-179.

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

CORBET, S. A. Insect chemosensory responses: a chemical legacy hypothesis. **Ecological Entomology**, London, v. 10, n. 2, p. 143-153, 1985.

CORTESERO, A. M. *et al.* Influence of two successive learning processes on the response of *Eupelmus vuilleti* Crw (Hymenoptera: Eupelmidae) to volatile stimulus from host and host plants. **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 8, p. 751-762, 1995.

- DE JONG, R.; KAISER, L. Odour learning by *Leptopilina boulardi*, a specialist parasitoid (Hymenoptera: Eucoilidae). **Journal of Insect Behavior**, New York, v. 4, p. 743-450, 1991.
- DICKE, M.; BALDWIN, I. T. The evolutionary context for herbivory-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. **Trends in Plant Science**, Philadelphia, v. 15, p. 167-175, 2010.
- DUBNAU, J.; TULLY, T. Gene discovery in *Drosophila*: new insights for learning and memory. **Annual Review of Neuroscience**, Palo Alto, v. 21, p. 407-444, 1998.
- DUKAS, R. Evolution biology of insect learning. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v. 53, p. 145-160, 2008.
- DUKAS, R.; DUAN, J. J. Potential fitness consequences of associative learning in a parasitoid wasp. **Behavioral Ecology**, Cary, v. 11, p. 536-543, 2000.
- EKESI, S. *et al.* Taxonomy, ecology and management of native and exotic fruit fly species in Africa. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 61, p. 219-238, 2016.
- FLANDERS, S. E. Variations in susceptibility of citrus-infesting coccids. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 46, p. 266-269, 1953.
- GANDOLFI, M.; MATTIACCI, L.; DORN, S. Preimaginal learning determines adult response to chemical stimuli in a parasitic wasp. **Proceedings of the Royal Society B**, London, v. 270, n. 1533, p. 2623-2629, 2003.
- GIL, R. **Biologia e comportamento de *Diachasmimorpha longicaudata* Ashmead (Hymenoptera: Braconidae) criado sobre larvas de *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) irradiadas e não irradiadas com radiação gama.** 2003. 53 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2003.
- GIURFA, M.; SANDOZ, J. C. Invertebrate learning and memory: fifty years of olfactory conditioning of the proboscis extension response in honeybees. **Learning & Memory**, Cold Spring Harbor, v. 19, p. 54-66, 2012.
- GODFRAY, H. C. J. **Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology.** Princenton, USA: Princenton University Press, 1994.
- GONÇALVES, R. S. *et al.* Effect of constant temperatures on the biology, life table, and thermal requirements of *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae), a parasitoid of *Anastrepha fraterculus* (Diptera:Tephritidae). **Environmental Entomology**, College Park, v. 43, n. 2, p. 491-500, 2014.

- GREANY, P. D. *et al.* Chemically mediated host finding by *Biosteres (Opus) longicaudatus*, a parasitoid of tephritid fruit fly larvae. **Journal Chemical Ecology**, New York, v. 3, p. 189-195, 1977.
- GUIMARAES, J. A.; DIAZ, N. B.; ZUCCHI, R. A. Parasitoides – Figitidae (Eucoilinae). *In*: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 1999. p. 127-141.
- GUIMARAES, J. A. *et al.* Eucoilinae species (Hymenoptera: Cynipoidea: Figitidae) parasitoids of fruit-infesting dipterous in Brazil. Identity, geographical distribution and host associations. **Zootaxa**, Auckland, v. 278, p. 1-23, 2003.
- GUIMARAES, J. A.; ZUCCHI, R. A. Parasitism behavior of three species of Eucoilinae (Hymenoptera: Cynipoidea: Figitidae) fruit fly parasitoids (Diptera) in Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 217-224, 2004.
- HEISENBERG, M. What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. **Learning & Memory**, Cold Spring Harbor, v. 5, p. 1-10, 1998.
- HEVE, W. K. *et al.* W. Responses of *Anastrepha suspensa*, *Diachasmimorpha longicaudata*, and sensitivity of guava production to *Heterorhabditis bacteriophora* in fruit fly integrated pest management. **Journal of Nematology**, College Park, v. 50, n. 3, p. 261-272, 2018.
- JOACHIM-BRAVO, I. S. *et al.* Longevity and fecundity of four species of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 543-549, 2003.
- KARBAN, R.; CHEN, Y. Induced resistance in rice against insects. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 97, p. 327-335, 2007.
- KESTER, K. M.; BARBOSA, P. Behavioral and ecological constraints imposed by plants on insect parasitoids: Implications for biological control. **Biological Control**, Orlando, v. 1 n. 2, p. 94-106, 1991.
- KOPPIK, M. *et al.* A. Intraspecific variability in associative learning in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. **Animal Cognition**, Berlin, v. 18, p. 593-604, 2015.
- LANZAVECCHIA, S. B. Microsatellite markers from the “South American fruit fly” *Anastrepha fraterculus*: a valuable tool for population genetic analysis and SIT applications. **BMC Genet**, London, v. 15, p. S13, 2014. Supl. 2.
- LEAL, W. S. Odorant reception in insects: roles of receptors, binding proteins, and degrading enzymes. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v. 58, p. 373-391, 2013.



- LIU, Jian-Bai *et al.* Transcriptome characterization and gene expression analysis related to chemoreception in *Trichogramma chilonis*, an egg parasitoid. **Gene**, Amsterdam, v. 678, p. 288-301, 2018.
- MALAVASI, A. Áreas-livres ou de baixa prevalência. *In*: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil**: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 175-181.
- MARINHO, C. F. *et al.* Parasitoides (Hymenoptera: Braconidae) de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no Estado de São Paulo: plantas associadas e parasitismo. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 38, n. 3, p. 321-326, 2009.
- MARTINEZ, L. M. **Parasitismo, supervivencia e reproducción de *Diachasmimorpha longicaudata* parasitoide de moscas de la fruta**. 1992. Tesis (Maestria) - Colegio de Post Graduados, Montecillos, Mexico, 1992.
- MATTHEWS, R. W.; MATTHEWS, J. R. **Insect behavior**. New York: John Wiley, 2010. 514 p.
- 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**, Gainesville, v. 96, n. 2, p. 412- 418, 2013.
- 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**, Gainesville, v. 98, n. 4, p. 1223-1226, 2015.
- MENZEL, R. Memory dynamics in the honeybee. **Journal of Comparative Physiology A**, New York, v. 185, p. 323–340, 1999.
- MONSIA, A. *et al.* Effect of fruit and host fly species on the associative learning by *Fopius arisanus*. **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 109, n. 5, p. 649-658, 2019.
- MURILLO, F. D. *et al.* First instar larvae morphology of Opiinae (Hymenoptera: Braconidae) parasitoids of *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) fruit flies. Implications for interspecific competition. **Arthropod Structure & Development**, Oxford, v. 45, p. 294-300, 2016.
- NASCIMENTO, A. S.; CARVALHO, R. 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, 2000. p. 109-112.

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

NORDLUND, D. A.; LEWIS, W. J. Terminology of chemical releasing stimuli in intraspecific and interspecific interactions. **Journal Chemical Ecology**, New York, v. 2, n. 2, p. 211-220, 1976.

NUNES, A. M. *et al.* Moscas frugívoras e seus parasitoides nos municípios de Pelotas e Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 1, p. 6-12, 2012.

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

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

PALADINO, L. Z.; PAPESCHI, A. G.; CLADERA, J. L. Immature stages of development in the parasitoid wasp, *Diachasmimorpha longicaudata*. **Journal Insect Science**, Oxford, v. 10, p. 1-13, 2010.

PARANHOS, B. A. J.; NAVA, D. E.; MALAVASI, A. Biological control of fruit flies. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 54, p. 1-14, 2019.

PAVLOV, P. I. Conditioned reflexes: an investigation of the physiological activity of the cerebral cortex. **Annals of Neurosciences**, Oxford, v. 17, n. 3, p. 136-141, 2010.

PEREIRA-RÊGO, D. R. G. *et al.* Variação na infestação de mosca-das-frutas (Diptera: Tephritidae) e parasitismo em diferentes fases de frutificação em mirtáceas nativas no Rio Grande do Sul. **EntomoBrasilis**, Vassouras, v. 6, n. 2, p. 141-145, 2013.

PIRES, P. D. S.; SANT'ANA, J.; REDAELLI, L. R. Can *Anastrepha fraterculus* larval feeding influence chemotaxis and parasitism of *Diachasmimorpha longicaudata* and *Aganaspis pelleranoi*? **Bulletin of Entomological Research**, London, v. 111, n. 5, p. 560-567, 2021.

PURCELL, M. F. *et al.* Influence of guava ripening on parasitism of the oriental fruit-fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae), by *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) and other parasitoids. **Biological Control**, Orlando, v. 4, n. 4, p. 396-403, 1994.

ROHR, R. A. **Interações entre parasitoides das famílias Braconidae e Figitidae (Insecta: Hymenoptera) e seus hospedeiros (Diptera: Tephritidae)**. 2019. 138 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

RUIZ, M. J. *et al.* Toxic effect of citrus peel constituents on *Anastrepha fraterculus* Wiedemann and *Ceratitis capitata* Wiedemann immature stages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 62, p. 10084-10091, 2014.

RUIZ, M. J. *et al.* Lemon and *Schinus polygama* essential oils enhance male mating success of *Anastrepha fraterculus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 169, p. 172-182, 2021.

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

SALLES, L. A. B. Biologia e ciclo de vida de *Anastrepha fraterculus* (Wied.). In: MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. (ed.). **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. cap. 8, p. 81-86.

SCHURMANN, F. W. The architecture of the mushroom bodies and related neuropils in the insect brain. In: GUPTA, A. G. (ed.). **Arthropod brain: its evolution, development, structure, and functions**. New York: John Wiley, 1987. p. 231-275.

SCHURMANN, G.; KUGEL, D.; STEIDLE, J. L. M. Early memory in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. **Journal of Comparative Physiology A**, New York, v. 201, p. 375-383, 2015.

SEGURA, D. F. *et al.* Role of visual information and learning in habitat selection by a generalist parasitoid foraging for concealed hosts. **Animal Behaviour**, London, v. 74, n. 1, p. 131-142, 2007.

SEGURA, D. F. *et al.* Response of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* to host and host-habitat volatile cues. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v. 143, p. 164-176, 2012.

SEGURA, D. F. *et al.* Innate host habitat preference in the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata*: functional significance and modifications through learning. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 11, n. 3, [art.] e0152222, [p. 1-18], 2016.

SILVA, J. W. P.; BENTO, J. M. S.; ZUCCHI, R. A. Olfactory response of three parasitoid species (Hymenoptera: Braconidae) to volatiles of guavas infested or not with fruit fly larvae (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**, Orlando, v. 41, p. 304-311, 2007.

- SIVINSKI, J.; PINERO, J.; ALUJA, M. The distributions of parasitoids (Hymenoptera) of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) along an altitudinal gradient in Veracruz, Mexico. **Biological Control**, Orlando, v. 18, n. 3, p. 258-269, 2000.
- SIVINSKI, J.; WEBB, J. C. A costing signals produced during courtship in *Diachasmimorpha longicaudata* and others Braconidae. **Annals of the Entomological Society of America**, Columbus, v. 82, n. 1, p. 116-120, 1989.
- SMID, H. M. *et al.* Species specific acquisition and consolidation of long-term memory in parasitic wasps. **Proceedings of the Royal Society B. Biological Science**, Edinburgh, v. 274, p. 1539-1546, 2007.
- SOBHY, I. S. *et al.* Associative learning and memory retention of nectar yeast volatiles in a generalist parasitoid. **Animal Behaviour**, London, v. 153, p. 137-146, 2019.
- SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. **Memory: from mind to molecules**. Gordonsville: W. H. Freeman, 1999. 254 p.
- TANG, L. *et al.* De novo transcriptome identifies olfactory genes in *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead). **Genes**, Basel, v. 11, n. 2, [art.] 144, 2020.
- TOGNON, R. *et al.* Aprendizagem e memória de *Telenomus podisi* (Hymenoptera, Platygasteridae). **Iheringia - Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 103, p. 266-271, 2013.
- TORMOS, J. *et al.* Development, preimaginal phases and adult sensillar equipment in *Aganaspis* Parasitoids (Hymenoptera: Figitidae) of fruit flies. **Microscopy and Microanalysis**, New York, v. 19, n. 6, p. 1475-1489, 2013.
- TURLINGS, T. C. J. *et al.* Learning of host-finding cues by hymenopterous parasitoids. *In*: PAPA, D. R.; LEWIS, A. C. (ed.). **Insect learning**, New York: Chapman & Hall, 1993. p. 51-78.
- VET, L. E. M. Host habitat location through olfactory cues by *Leptopilina clavipes* (Hartig) (Hymenoptera: Eucoilidae), a parasitoid of fungicorous *Drosophila*: the influence of conditioning. **Netherlands Journal of Zoology**, Amsterdam, v. 33, p. 225-248, 1983.
- VET, L. E. M.; DICKE, M. Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v. 37, n. 1, p. 141-172, 1992.
- VET, L. E. M.; LEWIS, W. J.; CARDÉ, R. T. Parasitoid foraging and learning. *In*: CARDÉ, R. T.; BELL, W. J. **Chemical ecology of insects 2**. New York: Chapman & Hall, 1995. p. 65-101.
- VINSON, S. B. Host selection by insect parasitoids. **Annual Review Entomology**, Palo Alto, v. 21, p. 109-33, 1976.

VINSON, S. B. The general host selection behavior of parasitoid Hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species. **Biological Control**, Orlando, v. 11, n. 2, p. 79-96, 1998.

WAR, A. R. *et al.* Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 7, p. 1306-1320, 2012.

WHARTON, R. A. Classical biological control of fruit infesting Tephritidae. *In*: ROBINSON, A. S.; HOOPER, G. (ed.). **World crop pests- fruit flies: their biology, natural enemies and control**. Amsterdam: Elsevier, 1989. v. 3B., p. 303-313.

YUAN, J. S. *et al.* Molecular and genomic basis of volatile-mediated indirect defense against insects in rice. **The Plant Journal**, Oxford, v. 55, p. 491-503, 2008.

ZADRA, W. C. *et al.* Plasticidade da aprendizagem de *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) associada a voláteis de frutos e óleos essenciais. **Iheringia - Serie Zoológica**, Porto Alegre, v. 108, [art.] e2018026, [p. 1-9], 2018.

ZENIL, M. *et al.* Reproductive biology of *Fopius arisanus* (Hymenoptera: Braconidae) on *Ceratitis capitata* and *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae). **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 169-178, 2004.

ZHOU, J. J. Odorant-binding proteins in insects. **Vitamins and Hormones**, San Diego, v. 83, p. 241-272, 2010.

### 3. ARTIGO 1

**Can *Anastrepha fraterculus* larval feeding influence chemotaxis and parasitism of  
*Diachasmimorpha longicaudata* and *Aganaspis pelleranoi*?**

(\*) Manuscrito publicado no periódico Bulletin of Entomological Research em 05 de abril de 2021.

---

DOI: <https://www.doi.org/10.1017/S0007485321000249>

**Can *Anastrepha fraterculus* larval feeding influence chemotaxis and parasitism of *Diachasmimorpha longicaudata* and *Aganaspis pelleranoi*?**

Short Title: Influence of host feeding in parasitoid behaviour

Patricia Daniela da Silva Pires<sup>1</sup>, Josué Sant' Ana<sup>1</sup> & Luiza Rodrigues Redaelli <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Crop Protection, PPG-Fitotecnia, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

### 3.1 Abstract

*Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) is a major barrier to fruit production and exportation. In Brazil, the native parasitoid *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae) and the exotic parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) stand out as biological control agents. Knowledge of the factors that affect interactions among parasitoids, *A. fraterculus*, and host fruits may enhance the use of these agents in biological control programs. This study evaluated the chemotaxis and parasitism of *A. pelleranoi* and *D. longicaudata* females reared on *A. fraterculus* larvae and kept on an artificial diet, red guava (*Psidium guajava*) or apple (*Malus domestica*). Females of both parasitoid species that emerged from larvae raised on artificial diet, guava, or apple, were tested to Y olfactometer choice tests. In the parasitism tests, both parasitoid species were made to choose between *A. fraterculus* larvae brushed with water, apple pulp or guava pulp. *D. longicaudata* females from artificial diet (control) did not distinguish between fruit odours; however, females of *D. longicaudata* from larvae kept in apple or guava directed to the odours of their original fruit. The greatest parasitism for *D. longicaudata* occurred in the units that contained the pulp in which the larvae grew. *A. pelleranoi* from artificial diet preferred guava odors, including the females kept in apple. Similar results were observed in the parasitism bioassays. Our results found that *A. fraterculus* larval feeding influenced search behaviour and parasitism of *D. longicaudata*, whereas *A. pelleranoi* rearing experience did not affect its host choices.

**Key words:** learning, fruit fly, parasitoids, Hymenoptera, Braconidae, Figitidae



### 3.2 Introduction

One of the greatest barriers to the production and free commercialization of fresh fruits in the world is the presence of insect pests such as fruit flies (Diptera: Tephritidae) (Badii et al., 2015; Ekesi et al., 2016). The females cause damage even without ovipositing inside the fruit, that make tasting punctures which allow the larvae to feed on the fruit pulp, resulting in a decrease in the commercial value (Nunes et al., 2015). Braconids are considered the most effective natural enemies of fruit flies (Silva et al., 2007). This family includes species such as *Doryctobracon areolatus* (Szépligeti), *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead), *Fopius arisanus* (Sonan). Several species of Figitidae are also reported as parasitoids of Tephritidae larvae, being natural controllers of these pests (Costa et al., 2007), such as *Diceratapis flavipes* (Kieffer), *Aganaspis nordlanderi* Wharton and *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes) (Guimarães et al., 1999).

Parasitoid search efficiency is important for successful biological control using parasitoids (Lewis and Martin, 1990). Plant volatiles are cues used by parasitoids to locate the host and its habitat (Vinson, 1976; Belda and Riudavets, 2010, Benelli et al., 2013; Canale et al., 2014). Parasitoids, including Braconidae species, are usually responsive to herbivory-induced plant volatiles (Khan et al., 2008) that are activated by the defence genes responsible for producing secondary metabolic compounds such as alcohols, aldehydes, terpenoids, green leaf volatiles and aromatic compounds (Dicke, 2009).

*D. longicaudata* females prefer fruit infested by different species of fruit flies than uninfested ones (Carrasco et al., 2005; Stuhl et al. 2011; Segura et al., 2012; 2016; Harbi et al. 2019). *Diachasmimorpha kraussii* (Fullaway) (Hymenoptera: Braconidae), another

parasitoid of fruit flies, responds to fruit infested fruits but its response depends on the fruit fly that infest the fruit (Masry et al. 2018). Interestingly, the response was lower when the fruit was infested by its non-host *Drosophila melanogaster* (Meigen) (Diptera: Drosophilidae). Guimarães and Zucchi (2004) reported that *A. pelleranoi* initially uses fruit volatiles to locate oviposition sites and uses vibrotaxis to find the host.

Experience can affect the parasitoid's search process, as learning can decrease the time it takes to locate its host (Matthews & Matthews, 2010). Learning can occur during the immature stage (preimaginal conditioning) and manifest in the imago (Corbet, 1985; Turlings *et al.*, 1993) or in the adult stage (Storeck *et al.*, 2000). *Hyssopus pallidus* (Askew) (Hymenoptera: Eulophidae) conditioned to apple juice extract during the preimaginal period became more attracted to this fruit in the adult phase than those that were unexperienced (Gandolfi *et al.*, 2003). *D. longicaudata* females reared on *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) larvae in mango (*Mangifera indica* L.) distinguished the volatiles of this fruit, unlike those from guava and artificial diet (Zadra *et al.*, 2018).

The South American fruit fly, *A. fraterculus*, is the most economically important species of the genus in Brazil (Malavasi, 2000) and has been observed in native fruits like *P. guajava* and *E. uniflora* (Zucchi, 2000) and other fruits such as peach (*Prunus persica* L.) (Nava and Botton, 2010), grapes (*Vitis vinifera* L.) (Zart *et al.*, 2009), apple (*Malus domestica* Borkh) (Santos *et al.*, 2015), and citrus (Ourique *et al.*, 2018). *D. longicaudata*, an Asian braconid, and *A. pelleranoi*, a Neotropical figitid, are two biological control agents for *A. fraterculus*. Although these parasitoids share hosts, they exhibit different foraging behaviour. *A. pelleranoi* often parasitizes larvae in fallen fruits (Ovruski *et al.*, 2004) and

is constantly found in Myrtaceae (Guimarães *et al.* 1999; Guimarães *et al.* 2003), while *D. longicaudata* can parasitize larvae in fruits still on the plant (Sivinski and Aluja, 2003; Harbi *et al.*, 2018), in native species such as guava (Silva *et al.*, 2007) and Brazilian cherry (Meirelles *et al.*, 2016), as well as exotic species such as peach and persimmon (*Diospyros kaki* L.) (Meirelles *et al.*, 2016).

The searching behavior of parasitoids of fruit flies is affected by the host fruit of the fruit fly. Understanding how this occurs in two species of parasitoids, one exotic and the other native, can help in the use of these organisms in biological control programs of fruit flies. Therefore, this work aimed to evaluate the chemotaxis and parasitism of *A. pelleranoi* and *D. longicaudata* from *A. fraterculus* larvae kept on artificial diet, guava or apple, in order to verify its preimaginal learning to fruit volatiles.

### 3.3 Materials and methods

The rearing and maintenance of the insects, as well as the bioassays, were performed in environmental chambers ( $25 \pm 2$  °C,  $70 \pm 10\%$  RH., 14 h photophase).

#### *Anastrepha fraterculus* rearing

Rearing of flies was based on the methodology proposed by Terán (1977), with certain adaptations. The adults were kept in wooden cages ( $45 \times 30 \times 30$  cm), with front sleeve openings and covered with voile fabric on the sides. The insects received distilled water and food containing crystal sugar, brewer's yeast, soy extract (3:1:1), and vitamin complex (Centrum Select<sup>®</sup>), in the proportion of one macerated tablet for each 250 g diet, available in Petri dishes (9 x 1.5 cm) and changed once a week.

As oviposition substrate, a blue voile tissue pouch covered with a silicone layer (30 × 30 cm), was used according to the methodology described by Meirelles *et al.* (2016). The eggs were removed daily and placed on blue voile (3 cm<sup>2</sup>) inside Petri dishes (9 x 2 cm) that contained bottom moistened filter paper, then conditioned for 48 h. After this period, these eggs were placed on an artificial diet consisting of peeled raw carrot (125 g), boiled carrot (125 g), brewer's yeast (25 g), cornmeal (150 g), sugar (125 g), distilled water (175 mL), nipagin (1.1 g), citric acid (3.6 g), and sodium benzoate (1.1 g) arranged in Styrofoam trays (18 × 24 × 2 cm). The egg trays were covered with another tray, wrapped in a newspaper sheet and placed in an environmental chamber (25 ± 2 °C, 70 ± 10% RH) in a scotophase for seven days. After this period, the trays were placed on sand in a large plastic container (51 × 30 × 20 cm) for pupation. The pupae remained in plastic pots (100 mL) with the lid opening (2 × 2 cm) protected with voile and contained sterile sand at the bottom, where they stayed for about 10 days.

#### *Diachasmimorpha longicaudata* and *Aganaspis pelleranoi* rearing

Adult parasitoids were kept in wooden cages (27 × 25 × 30 cm), covered with voile on the sides. They received water in plastic pots (100 mL) with perforated lid, containing strips of Spontex Resist® fabric. Their gelatinous diet [water (120 mL), honey (120 mL), agar (0.8 g), ascorbic acid (0.05 g), and nipagin (0.005 g)] was placed in Petri dishes (9 × 2 cm) and replaced weekly (Meirelles *et al.*, 2013). Third instar *A. fraterculus* larvae (approximately ten days old) reared on an artificial diet were exposed for 60 min in oviposition units made of a plastic plate (4 cm of diameter and 0.3 deep), wrapped in white voile described by Altafini *et al.* (2013). After this period, the larvae were placed in sand

filled Gerbox®, with a voile-protected opening (9 × 9 cm) in the lid, where they remained until fly or parasitoid emergence.

### *Fruit infestation*

Guavas (cv. Paluma) and apples (cv. Red delicious) were used to rear the host larvae. These fruits were sanitized with sodium hypochlorite (0.5%) for approximately 30 min. For artificial infestation, four perforations were made in the skin of the fruit and part of the pulp removed (1g). 10 - 15 second instar larvae of *A. fraterculus* from an artificial diet were placed in each opening, totalling 50 larvae per fruit. The uninfested fruits used in the tests also had their peel cut, but they were not infested. The infested fruits used in the bioassays were infested for 48 h prior to the tests. Artificial infestation with larvae from artificial diet was done to standardize the number and larval age in each fruit.

### *Preimaginal conditioning of parasitoids*

The fruits (guava or apple) infested with second instar *A. fraterculus* larvae (five days old) from artificial diet were packed in plastic pots (500 mL), covered with voile tissue containing sterile sand at the bottom, and remained there for approximately five days until the larvae reach the third instar. After this period, the larvae were removed (with a soft forceps) from the fruits, exposed to parasitism by *D. longicaudata* or *A. pelleranoi*, for 1 (Altafini *et al.*, 2013) and 4 h (Gonçalves *et al.*, 2013), respectively. After exposure, larvae were transferred to 100 ml plastic vials with sterilized sand until emergence.

Unexperienced parasitoids were defined as *A. fraterculus* larvae that developed on artificial diet and never had contact with fruit odours. Parasitoids (male and female) from

larvae that developed on the three types of food were separated shortly after emergence. Groups containing 10 paired females were kept in wooden cages ( $19.5 \times 16.5 \times 25.5$  cm) and received capillary water and honey diluted in water (7:3), offered in Petri dishes (9 x 1.5 cm) with cotton wicks. It was tested the responses of 4 to 6-day-old females. Thus, we evaluate the responses of *D. longicaudata* preimaginal conditioned on artificial diet (DI-art), on guava (DI-G) and on apple (DI-A), as well as, *A. pelleranoi* (Ap-art, Ap-G and Ap-A).

### *Olfactometry*

The bioassays were conducted in a climatized room ( $25 \pm 1$  °C,  $70 \pm 10\%$  RH) during the photophase under fluorescent light (60 W, 290 lux). The tests were performed in a two-choice glass olfactometer (Y) for both *D. longicaudata* (6.5 cm diameter, 21 cm initial arena, bifurcated into 10 cm arms) and *A. pelleranoi* (1 cm diameter, 12 cm initial arena, bifurcated into 5 cm arms). These were coupled to a glass chamber (29.5 cm height  $\times$  12.5 cm diameter). An airflow, previously filtered with activated charcoal, was blown into the system with an air pump connected to a flowmeter and humidifier at a rate of 0.6 L/min and 0.3 L/min for *D. longicaudata* and *A. pelleranoi*, respectively. The olfactometer was inverted horizontally ( $180^\circ$  rotation) every five repetitions and every ten repetitions it was washed with mild soap, ethyl alcohol, and distilled water and dried in a sterilization oven at 150 °C. Prior to the start of the experiments, the females were individualized, acclimatized for 30 min in the test room and individually placed in the arena.

The chemotaxis of *D. longicaudata* and *A. pelleranoi* females from larvae reared on either artificial diet, guava, or apple were evaluated. The comparisons included uninfested

apple vs. air; uninfested guava vs. air; apple infested vs. uninfested apple; uninfested guava vs. uninfested apple; infested guava vs. infested apple; and infested guava vs. uninfested guava. The larvae were maintained in the fruits during the experiments.

Positive response (first choice) was recorded when the insect remained for at least 30 seconds at the end of one arm and not responsive was recorded when the insect did not move or did not reach one of the two arms of the olfactometer within 5 min. At least 40 repetitions were performed for each comparison.

### *Parasitism*

Parasitism tests were performed on different days for each species of parasitoids. *D. longicaudata* and *A. pelleranoi* females (4-6 days old) from larvae reared on artificial diet, guava, or apple (preimaginal conditioning) were individually exposed in a cylindrical plastic arena (29 × 12 cm) and given it the choice between three parasitism units, which were previously brushed with fresh apple pulp, guava pulp or with distilled water only (control). Exposure time was 1 h for *D. longicaudata* (Altafini *et al.*, 2013) and 4 h for *A. pelleranoi* (Gonçalves *et al.*, 2013). Brushed voile fabric was compared with fresh apple or guava pulp, as well as voile fabric brushed with distilled water only (control). After exposure, the larvae were placed in 50 mL plastic pots containing sand and kept in a climate chamber until the emergence of parasitoids or flies was observed. Pupae in which no emergence was observed were dissected and counted. We observed response of each female of *D. longicaudata* (n = 40) and *A. pelleranoi* (n = 40) exposed, simultaneously, to three parasitism units, each one with 10 third instar of *A. fraterculus* larvae.

We recorded the number of pupae formed, emerged parasitoids, parasitized pupae (emerged parasitoids from the puparia + dissected puparia with parasitoids presence) and emerged fruit fly.

### *Statistical analysis*

The experimental design for all bioassays was completely randomized. For each two-choices assays, females' preference for infested or uninfested fruit (apple or guava) odors was analyzed using a  $\chi^2$  test with Yates correction. The other analyzes were performed using generalized linear models (GLMs) in the statistical software R 4.0.0 (R-Studio, 2020). For the olfactometer bioassays, the frequency of the parasitoid choice for each arm was considered as a binomial response variable, and GLMs with a binomial error structure and logit link function were constructed. These data were analysed in a factorial scheme of two parasitoids (*D. longicaudata* and *A. pelleranoi*) by three types of diet (artificial diet, guava and apple) used in preimaginal condition, explanatory variables, to assess if the diet preference was affected by the type of food conditioning and parasitoid species. Parasitism data were assessed for normality (Shapiro and Wilk, 1965) and homogeneity of variance (Fligner and Killeen, 1976). Also, descriptive analysis (density plot and qqplot) were performed (Ggplot2 Package). The gaussian distribution was used for emerged fruit fly (Dl-A, Ap-art and Ap-A) and parasitized pupae (Ap-art and Ap-A) variables; and the poisson distribution was used for emerged fruit fly (Ap-G), emerged parasitoid (Dl-art), pupae (Dl-art, Dl-A, Dl-G, Ap-art, Ap-A and Ap-G) and parasitized pupae (Dl-art and Ap-G) variables. For the other data, zero-inflated Poisson (ZIP)



regression was used (Lambert, 1992). Outliers were removed when necessary. Post-hoc tests were done for pairwise comparisons of least-square means using the compact letter display (CLD) function (Multcompview Package) and Tukey adjust (Tukey HSD test,  $\alpha = 0.05\%$ ) (Piepho, 2004).

### 3.4 Results

#### *Olfactometry*

Unexperienced *D. longicaudata* (DI-art) females went to uninfested guava or apple volatiles when contrasted with air ( $P < 0.05$ ) (fig. 1). *D. longicaudata* females reared on artificial diet did not differ between the volatiles of infested guava and apple ( $\chi^2 = 0.200$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0.8231$ ) and between the odours of the same fruits uninfested ( $\chi^2 = 0.800$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0.5023$ ) (fig. 1). However, when the females were exposed to the volatiles of fruits infested (guava  $\chi^2 = 16.2$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.0001$  or apple  $\chi^2 = 12.8$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0.0008$ ) with *Anastrepha fraterculus* larvae, they preferred the volatiles emitted by the fruits containing the larvae to those of non-infested fruits.

*D. longicaudata* females from fly larvae reared in apple (DI-A) were more attracted to apple than guava volatiles, regardless of the guava was infested ( $\chi^2 = 9.8$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0.0037$ ) or uninfested ( $\chi^2 = 16.2$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0.0001$ ) (fig.1). When the assays contrasted odours from infested versus uninfested apples ( $\chi^2 = 9.8$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0.0037$ ) or infested versus uninfested guavas ( $\chi^2 = 9.8$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0.0037$ ), a greater attraction to infested fruits was observed (fig. 1).

The same behaviour was observed in female parasitoids from fly larvae reared in guava (DI-G) (fig. 1), which were more attracted to guavas than infested apples ( $\chi^2 = 16.20$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0.001$ ) or uninfested apples ( $\chi^2 = 28.80$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$ ). When fruits of the same species were exposed, females preferred infested guava ( $\chi^2 = 12.80$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$ ) and apple ( $\chi^2 = 12.80$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$ ) (fig. 1).

Unexperienced *A. pelleranoi* females reared on artificial diet (Ap-art) were more attracted to the apple and guava volatiles when contrasted with air ( $P < 0.050$ ) (fig. 2). *A. pelleranoi* females from artificial diet responded more to volatiles of guava than volatiles of apples ( $\chi^2 = 20.00$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$ ) and uninfested apples ( $\chi^2 = 9.80$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0.037$ ) (fig. 2). When volatiles of infested or uninfested guava ( $\chi^2 = 39.20$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$ ) or apples ( $\chi^2 = 28.80$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$ ) were compared, more *A. pelleranoi* responded to the infested fruit (fig. 2).

*A. pelleranoi* individuals from larvae maintained on apples (Ap-A) did not change their behaviour, that is, they continued to prefer guava volatiles, both infested ( $\chi^2 = 12.80$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$ ) and uninfested ( $\chi^2 = 45.00$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$ ) (fig. 2). When comparing the *Aganaspis pelleranoi* female's attraction to infested fruits versus non-infested ones regardless of the fruit (guava  $\chi^2 = 20.00$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$  or apple  $\chi^2 = 28.80$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$ ), we found that the females preferred those that contained the host's larvae.

When *A. pelleranoi* developed in fly larvae reared in guava (Ap-G), they preferred both infested ( $\chi^2 = 39.20$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$ ) and uninfested guava ( $\chi^2 = 72.20$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$ ) over apple (fig. 2). However, when subjected to odours of the same species, females

preferred infested guava ( $\chi^2 = 16.20$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$ ) and infested apple fruits ( $\chi^2 = 51.20$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$ ) (fig. 2).

For the contrast, infested apple versus uninfested apple there was no interaction between parasitoid species and diets used in preimaginal condition (GLM:  $\chi^2 = 0.62$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0.7336$ ). Also, there was no difference between the probability of choosing infested apple between the parasitoid species (GLM:  $\chi^2 = 2.22$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0.1364$ ), and this probability, regardless of the parasitoid species, was not altered by pre-imaginal conditioning (GLM:  $\chi^2 = 0.36$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0.8352$ ) (table 1). For infested guava versus uninfested guava, there was no interaction between parasitoid species and diets used in preimaginal condition (GLM:  $\chi^2 = 1.37$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0.5031$ ). However, the probability of *A. pelleranoi* females choosing the infested guava fruits was higher than *D. longicaudata* (GLM:  $\chi^2 = 14.42$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$ ), and this probability was not altered by pre-imaginal conditioning (GLM:  $\chi^2 = 0.39$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0.8317$ ) (table 1).

For the contrast, infested apple versus infested guava there was no interaction between parasitoid species and diets used in preimaginal condition (GLM:  $\chi^2 = 2.73$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0.2560$ ). However, when evaluating the probability of choosing infested guava fruits between species (GLM:  $\chi^2 = 26.09$ ;  $df = 2$ ;  $P < 0.0001$ ), it was observed that *A. pelleranoi* had more than 86% chance of choosing these fruits while for *D. longicaudata* this percentage was 53%. and that the type of conditioning has an influence on the choice of parasitoid (GLM:  $\chi^2 = 25.98$ ;  $df = 2$ ;  $P < 0.001$ ) (table 1).

For the contrast uninfested apple versus uninfested guava there was an interaction between the type of conditioning and the species of parasitoid (GLM:  $\chi^2 = 6.90$ ;  $df = 2$ ;  $P$

= 0.0318), that is, both the species parasitoid and imaginal conditioning has an influence on the choice of parasitoid. *A. pelleranoi* females have a 77% probability of choosing uninfested guava fruits and this percentage increases to 83% probability if females are previously conditioned to guava odors.

### *Parasitism*

For *D. longicaudata*, the number of parasitized pupae and emerged parasitoids from larvae reared on artificial diet was similar among parasitism units brushed with water, apple pulp or guava (GLM:  $\chi^2 = 0.0635$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0.9382$ ) and (GLM:  $\chi^2 = 1.3464$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0.2632$ ), respectively (Table 2). However, the number of parasitized pupae was always greater in units that contained the pulp in which the original host had developed, guava (GLM:  $\chi^2 = 7.0133$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0.03$ ) and apple (GLM:  $\chi^2 = 8.5304$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0.0141$ ). For *A. pelleranoi* females from *A. fraterculus* larvae that had developed on artificial diet, the number of parasitized pupae was higher only in guava-pulp-brushed units, compared to those with distilled water (GLM:  $\chi^2 = 11.9050$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0.0026$ ). In those from guava-fed larvae, the number of parasitoids was higher in the units brushed with guava pulp (GLM:  $\chi^2 = 11.8490$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0.0027$ ). When the source host was kept on apple, the emergence was higher in the units that contained either pulp, compared with water (GLM:  $\chi^2 = 6.6153$ ;  $df = 2$ ;  $P = 0.0366$ ) (table 2).

### **3.5 Discussion**

Unexperienced *D. longicaudata* females did not differentiate apple volatiles from guava. The average number of pupae parasitized did not differ between units brushed with

water, guava, or apple pulp. In chemotaxis bioassays, unexperienced *A. pelleranoi* chose guava odours over apple odours; however, in parasitism assays they exhibited no preference between the parasitism units. The number of pupae formed was expected, considering that both species are koinobionts (Ovruski *et al.*, 2000; Cancino *et al.*, 2012), causing no immediate damage to the host.

The lack of significant response by unexperienced *D. longicaudata* to these fruit odours may be due to its generalist search behaviour, attaching larvae of several species of *Anastrepha*, *Bactrocera*, and *Ceratitis* in different hosts (Leyva *et al.*, 1991; Alvarenga *et al.*, 2005; Ovruski *et al.*, 2007). On the other hand, *A. pelleranoi* is mainly referred to as a parasitoid of *Anastrepha* species larvae (Guimarães *et al.*, 1999; Sivinski *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2007). In addition, it is often found in Myrtaceae, parasitizing tephritid larvae, suggesting, unlike *D. longicaudata*, a more direct association between *A. pelleranoi* and this plant family (Garcia and Corseuil, 2004).

Contrary to our results, other studies have observed that unexperienced *D. longicaudata* distinguish volatiles from different fruits. It was more responsive to fermented orange odours than fermented peach and mango (Leyva *et al.*, 1991). Its preference to fig volatiles over peach orange and apple volatiles was also observed by Segura *et al.* (2016). Similarly, *D. longicaudata* was more responsive to mango volatiles than guava volatiles (Zadra *et al.*, 2018). The fruits evaluated in our study originate from Central America to southern Mexico (guava) (Morton, 1987) and central Asia (apple) (Juniper *et al.*, 1999), which are very far from the Indo-Australiana origin of *D. longicaudata* (Sthul *et al.*, 2012). The absence of a direct relationship between the origin of the fruits and *D. longicaudata* could partly explain its similar responses to odours. Plants

and animals from the same region can coevolve to increase their chances of survival (Del-Claro, 2012).

The preference for infested fruits exhibited by both parasitoid species may be related to the release of volatiles in response to phytophagous attacks (Turling and Wackers, 2004), which may serve as foraging clues for herbivores and natural enemies (Waschke *et al.*, 2013). During the evolutionary process with insects, plants have developed a wide range of defence mechanisms to counter herbivore attacks. These mechanisms are categorized as constitutive (preformed) and induced. Both constitutive and induced defences may have direct or indirect action (Karban and Chen, 2007). Indirect defences are defined by Dicke and Baldwin (2010) as a set of characteristics that increase the efficiency of natural insect enemies, such as the emission of volatiles induced by herbivorous attack. In some species, producing larger volumes of floral nectar is a strategy to attract more parasitoids and predators (War *et al.*, 2012). However, most strategies are based on the emission of volatile compounds produced by a plant's secondary metabolism (Yuan *et al.*, 2008; War *et al.*, 2012).

In this work, both *D. longicaudata* and *A. pelleranoi* were more attracted to the volatile of fly-infested fruits, indicating that the chemical profile of the host fruit might have changed, possibly signalling to the parasitoid the presence of fly larvae. Eben *et al.* (2000) obtained similar results, i.e., *D. longicaudata* preferred mango and grapefruit (*Citrus paradisi* Macfaden) volatiles infested by *Anastrepha ludens* (Loew) larvae over uninfested ones. The chromatographic analysis of mangoes showed qualitative and quantitative differences in compounds released by *A. ludens* infested fruits in relation to uninfested and mechanically damaged fruits (Carrasco *et al.*, 2005). In addition, they found

that infested mangoes were more attractive to *D. longicaudata* compared to other treatments. According to those authors, the different response is probably related to the presence of 2-phenylethyl, a substance present only in the infested mango. *D. longicaudata* female's attraction to infested fruits were also observed by Segura *et al.* (2012) in oranges with *C. capitata* larvae compared to uninfested ones. Masry *et al.* (2018) found that *Diachasmimorpha kraussii* (Fullaway) preferred volatiles from nectarines (*Prunus persica* var. *Nucipersica* L.) infested with *B. tryoni* larvae over uninfested ones. The attraction of *A. pelleranoi* to guavas infested with *A. fraterculus* and *C. capitata* larvae was also reported by Guimarães and Zucchi (2004).

Our study showed that *A. pelleranoi* did not change its behaviour (chemotaxis and parasitism) in response to its host's diet, preferring guava odours over those from apple. For Bernays (2001), the less plasticity in specialist insects can be partially explained by their greater sensitivity to the volatiles of their hosts. On the other hand, the host food substrate influenced the chemotaxis choice of *D. longicaudata* females and resulted in a higher number of parasitized pupae in units that contained the pulp in which the original host had been raised. A similar result was seen by Zadra *et al.* (2018), who found that *D. longicaudata* parasitism was higher in *A. fraterculus* larvae that contained the odours to which they had been conditioned (mango or guava).

The results observed for *D. longicaudata* can be explained through the Chemical Legacy Hypothesis, which postulates that the information obtained in the immature phase can be transmitted to the adult by chemical compounds present in the larval development environment (Corbet, 1985), which could be absorbed and stored on the hemolymph of insects or on the outer layer of the pupa. Changes in perception after the experiment may

be associated with activation of genes responsible for the synthesis of binding proteins present in insect antennae (Zhou, 2010). Parasitoids with a wide range of hosts, including *D. longicaudata*, might optimize by learning the search behaviour for fruit hosts, thereby increasing their chances of survival.

The way females deal with the chemical complexity of the environment depends on their life history, and a higher degree of parasitoid specialization may influence the search for the host (Waschke *et al.*, 2013). *A. pelleranoi* probably associates larvae of *A. fraterculus* with fruits of Myrtaceae, such as guava (Costa *et al.*, 2007). This may have influenced the choice of host; thus, a change in behaviour of parasitoids will require the development of more generations of larvae that feed on other fruits.

Understanding how the parasitoid locates the host and the strategies adopted to achieve this goal is important for applied biological control. Learning can be a relevant tool in improving host search, reducing host search time, and increasing parasitoid fitness (Dukas and Duan, 2000). Our results found that *A. fraterculus* larval feeding influences search behaviour and parasitism of *D. longicaudata*. Thus, the conditioning of *D. longicaudata* to volatiles of plants for which the control is intended could help increase the efficiency of this parasitoid in the field.

### **Acknowledgements**

Financial support and scholarships were provided by the Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) for first author (88882.439605/2019-01) and National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) for the second (process n°. 303758/2018-0) and third authors



(process n°. 306626/2019-5), We thank Dr. Fábio Janoni Carvalho, Dra. Natalia Alves Leite, and MSc Carlos Diego Ribeiro dos Santos for their collaboration on statistical analysis. The authors declare no conflicts of interest. We also thank the two anonymous reviewers for constructive comments.

### 3.6 References

- Alvarenga, C.D., Brito, E.S., Lopes, E.N., Silva, M.A., Alves, D.A., Matrangolo, C.A.R & Zucchi, R.A.** (2005) Introdução e recuperação do parasitoide exótico *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) em pomares comerciais de goiaba no norte de Minas Gerais. *Neotropical Entomology* **34**, 133-136.
- Altafini, D.L., Redaelli, L.R. & Jahnke, S.M.** (2013) Superparasitism of *Ceratitis capitata* and *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Florida Entomologist* **96**, 391-395.
- Badii, K. B., Billah, M. K., Afreh-Nuamah, K., Obeng-Ofori, D. & Nyarko, G.** (2015) Review of the pest status, economic impact and management of fruit-infesting flies (Diptera: Tephritidae) in Africa. *African Journal of Agricultural Research* **10**, 1488-1498.
- Belda, C. & Riudavets, J.** (2010) Attraction on the parasitoid *Anisopteromalus calandrae* (Howard) (Hymenoptera: Pteromalidae) to odors from grain and store product pest in a Y-tube olfactometer. *Biological Control* **54**, 29-34.
- Benelli, G., Revadi, S., Carpita, A., Giunti, G. & Raspi, A.** (2013) Behavioral and electrophysiological responses of the parasitic wasp *Psytalia concolor* (Szépligeti) (Hymenoptera: Braconidae) to *Ceratitis capitata*- induced fruit volatiles. *Biological Control* **64**, 116-124.
- Bernays, E.A.** (2001) Neural limitations in Phytophagous Insects: Implications for Diet Breadth and Evolution of Host Affiliation. *Annual Review of Entomology* **46**, 703-727.
- Canale, A., Geri, S. & Benelli, G.** (2014) Associative learning for host-induced fruit volatiles in *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae), a koinobiont parasitoid of tephritid flies. *Bulletin of Entomological Research* **104**, 774-780.
- Cancino, J., Liedo, P., Ruiz, L., López, G., Montoya, P. & Barrera, J.F.** (2012) Discrimination by *Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae) of hosts previously attacked by conspecifics or by the larval parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Biocontrol Science Technology* **22**, 899-914.

- Carrasco, M., Montoya, P., Cruz-Lopes, L. & Rojas, J.C** (2005) Responses of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) to mango fruit volatiles. *Environmental Entomology* **34**, 576-583.
- Cobert, S.A.** (1985) Insect chemosensory responses: a chemical legacy hypothesis. *Ecological Entomology* **10**, 143-153.
- Costa, R.I.F., Silva, C.G., Marchiori, C.H., Amaral, B.B., Poletti, M.M. & Torres, L.C.** (2007) Parasitismo em *Anastrepha* sp. (Diptera: Tephritidae) por *Aganaspis pellaranoi* (Brèthes, 1924) e *Direratapis* sp. (Hymenoptera: Figitidae: Eucoilinae). *Ciência Agrotecnologia* **31**, 720-723.
- Del-Claro, K.** (2012) *Origens e importância das relações plantas-animais para ecologia e conservação*. Ecologia das Plantas-Animais, uma abordagem ecológica (eds. by K Del-Claro & HM Torezan-Silingardi HM) Technical Books Editora, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 37-50.
- Dicke, M.** (2009) Behavioural and community ecology of plants that cry for help. *Plant, Cell and Environment* **32**, 654-665.
- Dicke, M. & Baldwin, I.T.** (2010) The evolutionary context for herbivory-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. *Trends in Plant Science* **15**, 167-175.
- Dukas, R. & Duan, J.J.** (2000) Potential fitness consequences of associative learning in a parasitoid wasp. *Behavioral Ecology* **11**, 536-543.
- Eben, A., Benrey, B., Sivinski, J. & Aluja, M.** (2000) Host species and host plant effects on performance of *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Environmental Entomology* **29**, 87-94.
- Ekesi, S., De Meyer, M., Mohamed, S. A., Virgilio, M. & Borgemeister, C.** (2016) Taxonomy, ecology and management of native and exotic fruit fly species in Africa. *Annual Review of Entomology* **61**, 219-238.
- Fligner, M.A, Killeen, T.J.** (1976) Distribution-free two-sample tests for scale. *Journal of the American Statistical Association* **71**, 210-213.
- Gandolfi, M., Mattiacci, L. & Dorn, S.** (2003) Preimaginal learning determines adult response to chemical stimuli in a parasitic wasp. *Proceedings of the Royal Society B* **270**, 2623-2629.
- Garcia, F.R.M. & Corseuil, E.** (2004). Native Hymenopteran parasitoids associated with fruit flies (Diptera: Tephritidae) in Santa Catarina state, Brazil. *Florida Entomologist* **87**, 517-521.

- Gonçalves, R.S., Nava, D.E., Pereira, H.C., Lisbôa, H., Grutzmacher, A.D. & Valgas, R.A.** (2013) Biology and fertility life table of *Aganaspis pellaranoi* (Hymenoptera: Figitidae) in larvae of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* **106**, 791-798.
- Guimarães, J.A., Zucchi, R.A., Diaz, N.B., Souza Filho, M.F. & Uchôa, F.M.A.** (1999) Espécies de Eucoilinae (Hymenoptera: Cynipoidea: Figitidae) parasitoides de larvas de frugívoras (Diptera: Tephritidae e Lonchaiedae) no Brasil. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* **28**, 63-273.
- Guimarães, J.A., Gallardo, F.E., Diaz, N.B. & Zucchi, R.A.** (2003) Eucoilinae species (Hymenoptera: Cynipoidea: Figitidae) parasitoids of fruit-infesting dipterous in Brazil. Identity, geographical distribution and host associations. *Zootaxa* **278**, 1-23.
- Guimarães, J.A. & Zucchi, R.A.** (2004) Parasitism behavior of three species of Eucoilinae (Hymenoptera: Cynipoidea: Figitidae) fruit fly parasitoids (Diptera) in Brazil. *Neotropical Entomology* **33**, 217-224.
- Juniper, B.E., Watkins, R. and Harris, S.A.** (1999). The origin of the apple. *Proceedings of the Eucarpia Symposium on the fruit breeding and genetics* **484**, 27-33.
- Karban, R. & Chen, Y.** (2007) Induced resistance in rice against insects. *Bulletin of Entomological Research* **97**, 327-335.
- Khan, Z.R., James, D.G., Midega, C.A.O & Pickett, J.A** (2008) Chemical ecology and conservation biological control. *Biological Control* **45**, 210-224.
- Lambert D.** (1992). Zero-inflated Poisson regression, with an application to defects in manufacturing. *Technometrics* **34**, 1-14.
- Leyva, J.L., Browning, H.W. & Gilstrap, F.E.** (1991) Effect of host fruit species, size, and color on parasitization of *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Environmental Entomology* **20**, 1469-1474.
- Lewis, W.J. & Martin, W.R.** (1990) Semiochemicals for use with parasitoids: status and future. *Journal of Chemical Ecology* **16**, 3067- 3089.
- Malavasi, A.** (2000) Áreas-livres ou de baixa prevalência. *Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado* (ed. by A Malavasi & RA Zucchi) Holos, Ribeirão Preto, SP, Brazil, pp. 175-181.
- Masry, A., Clarke, A.R. & Cunningham, J.P.** (2018) Learning influences host versus nonhost discrimination and postalighting searching behavior in the Tephritid fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha kraussii* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Economic Entomology* **111**, 787-794.

- Matthews, R.W. & Matthews, J.R.** (2010) *Insect behavior*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Meirelles, R.N., Redaelli, L.R., Jahnke, S.M., Ourique, C.B. & Ozorio, D.V.B.** (2016) Parasitism of fruit flies (Tephritidae) in field, after the releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) in Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Fruticultura* **38**, 1-10.
- Morton, J.F.** (1987) Guava. *Fruits of warm climates* (ed. by C.F. Dowling Jr). Creative Resources Systems, Winterville, NC, USA, 356-363.
- Nava, D.E. & Botton, M.** (2010) *Bioecologia e Controle de Anastrepha fraterculus e Ceratitis capitata em Pessegueiro*. Embrapa, Pelotas, Brazil. (Documento 315).
- Nunes, M.Z., Boff, M.I.C., Santos, R.S.S, Franco, C.R., Wille, P.E., Rosa, J.M. & Amarante, C.V.T.** (2015) Damage and development of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) in fruits of two pear cultivars. *Agrociencia Uruguay* **19**, 42-48.
- Ourique, C.B., Redaelli, L.R., Efrom, C.F.S. & Pedrini, D.** (2018) Effects of kaolin and limestone on infestation of South American fruit fly in citrus orchards. *Biological Agriculture & Horticulture* **35**, 61-71.
- Ovruski, S.M., Aluja, M. Sivinski, J. & Wharton, R.** (2000) Hymenopteran parasitoids on fruit-infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the southern United States: Diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. *Integrated Pest Management Reviews* **5**, 81-107.
- Ovruski SM, Schliserman P & Aluja M** (2004) Indigenous parasitoids (Hymenoptera) attacking *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in native and exotic host plants in northwestern Argentina. *Biological Control* **29**, 43-57.
- Ovruski, S.M., Wharton, R.A., Rull, J. & Guillén, L.** (2007) The effect of four fruit species on the parasitization rate of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae, Trypetinae) by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae, Opiinae) under laboratory conditions. *Biocontrol Science and Technology* **17**, 1079-1085.
- Piepho, H.P.** (2004) An Algorithm for a Letter-Based Representation of All-Pairwise Comparisons. *Journal of Computational and Graphical Statistics* **13**, 456-466.
- Rohr, R.A., Jahnke, S.M. & Redaelli, L.R.** (2019) Influence of the original host in preference of *Aganaspis pelleranoi* and *Doryctobracon aerolatus*, parasitoids of Tephritidae larvae. *Bulletin of Insectology* **72**, 13-20.

- Santos, J.P., Redaelli, L.R., Sant'Ana, J. & Hickel, E.R.** (2015) Suscetibilidade de genótipos de macieira a *Anastrepha fraterculus* (Díptera: Tephritidae) em diferentes níveis de infestação. *Revista Brasileira de Fruticultura* **37**, 90-95.
- Segura, D.F., Viscarret, M.M., Ovruski, S.M. & Cladera, J.L.** (2012) Response of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* to host and host-habitat volatile cues. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **143**, 164-176.
- Segura DF, Nussenbaum AL, Viscarret MM, Devescovi F, Bachmann, G.E., Corley, J.C., Ovruski, S.M. & Cladera, J.L.** (2016) Innate host habitat preference in the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata*: functional significance and modifications through learning. *PLoS ONE* **11**, 1-18.
- Silva, J.W.P., Bento, J.M.S. & Zucchi, R.A.** (2007) Olfactory response of three parasitoid species (Hymenoptera: Braconidae) to volatiles of guavas infested or not with fruit fly larvae (Diptera: Tephritidae). *Biological Control* **41**, 304-311.
- Shapiro, S. S., Wilk, M.B.** (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* **52**, 591-611.
- Sivinski, J., Pinero, J. & Aluja, M.** (2000) The distributions of parasitoids (Hymenoptera) of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) along an altitudinal gradient in Veracruz, Mexico. *Biological Control* **18**, 258-269.
- Sivinski, J. & Aluja, M.** (2003) The evolution of ovipositor length in the parasitic Hymenoptera and the search for predictability in biological control. *Florida Entomologist* **86**, 143-150.
- Storeck, A., Poppy, G.M., Van Emden, H.F. & Powell, W.** (2000) The role of plant chemical cues in determining host preference in the generalist aphid parasitoid *Aphidius colemani*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **97**, 41-46.
- Stuhl, C., Sivinski, J., Teal, P., Paranhos, B. & Aluja, M.** (2011) A compound produced by frugivorous Tephritidae (Diptera) larvae promotes oviposition behavior by the biological control agent *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Environmental Entomology* **40**, 727-736.
- Stuhl, C., Sivinski, J., Teal, P. & Aluja, M.** (2012) Responses of multiple species of tephritid (Diptera) fruit fly parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Opiinae) to sympatric and exotic fruit volatiles. *Florida Entomologist* **95**, 1031-1039.
- Terán, H.R.** (1977) Comportamiento alimentario y su correlación a la reproducción en hembras de *Ceratitis capitata* (Wied.) (Diptera: Tephritidae). *Revista Agronómica del Noroeste Argentino* **14**, 17-34.

- Turlings, T.C.J., Wackers, F.L., Vet, L.E.M., Lewis, W.J. & Tumlinson, J.H.** (1993) Learning of host-finding cues by hymenopterous parasitoids. *Insect Learning: ecological and evolutionary perspectives* (ed. by DR Papaj & AC Lewis). Chapman & Hall, New York, NY, USA, pp. 51-78.
- Turlings, T.C.J. & Wackers, F.L.** (2004) Recruitment of predators and parasitoids by herbivore-injured plants. *Advances in Insect Chemical Ecology* **2**, 21-75.
- Vinson, S.B.** (1976) Host selection by insect parasitoids. *Annual Review of Entomology* **21**, 109-33
- War, A.R., Paulraj, M.G., Ahmad, T., Buhroo, A.A., Hussainm B., Ignacimuthu, S. & Sharma, H.C.** (2012) Mechanisms of Plant Defense against Insect Herbivores. *Plant Signaling and Behavior* **7**, 1306-1320.
- Wäschke, N., Meiners, T. & Rostás, M.** (2013) Foraging strategies of parasitoids in complex chemical environments. *Chemical Ecology of Insect Parasitoids* (ed. by E Wajnberg & S Colazza) John Wiley & Sons, West Sussex, UK, 37-63.
- Yuan, J. S., Kollner, T.G., Wiggins, G., Grant, J., Degenhardt, J. & Chen, F.** (2008) Molecular and genomic basis of volatile-mediated indirect defense against insects in rice. *The plant Journal* **55**, 491-503.
- Zadra, W.C., Sant'Ana, J., Redaelli, L.R. & Tognon, R.** (2018) Plasticidade da aprendizagem de *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) associada a voláteis de frutos e óleos essenciais. *Iheringia, Série zoologia* **108**, 1-9.
- Zart, M., Fernandes, O.A. & Botton, M.** (2009) Bioecologia e controle da mosca-das-frutas sul-americana *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) na cultura da videira. Embrapa, Bento Gonçalves, Brazil. (Circular técnica 81).
- Zhōu, J.J.** (2010) Odorant-binding proteins in insects. *Vitamins and Hormones* **83**, 241-272.
- Zucchi, R.A.** (2000) *Taxonomia. Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: conhecimento básico e aplicado* (Ed. by. A Malavasi & RA Zucchi). Holos, Ribeirão Preto, SP, Brazil pp. 13-24.

Figure 1. Chemotaxis responses of *Diachasmimorpha longicaudata* females from *Anastrepha fraterculus* larvae reared on artificial diet (DI-art) (inexperienced), apple (DI-A) or guava (DI-G), tested in double-choice olfactometer submitted to uninfested apple (UA) or guava volatiles (UG) in contrasts with air, apple (IA, UA) or guava volatiles (IG, UG) (infested or uninfested). Numbers on the bars represent the responsive insects. Bars followed by asterisks differ significantly ( $\chi^2$ ;  $P < 0.05$ ).

Figure 2. Chemotaxis responses of *Aganaspis pelleranoi* females from *Anastrepha fraterculus* larvae reared on artificial diet (Ap-art) (inexperienced), apple (Ap-A) or guava (Ap-G), tested in double-choice olfactometer submitted to uninfested apple (UA) or guava volatiles (UG) in contrasts with air, apple (IA, UA) or guava volatiles (IG, UG) (infested or uninfested). Numbers on the bars represent the responsive insects. Bars followed by asterisks differ significantly ( $\chi^2$ ;  $P < 0.05$ ).

Table 1 Effect of the type of pre-imaginal conditioning (artificial diet, apple and guava), the species of parasitoid (*Diachasmimorpha longicaudata* and *Aganaspis pelleranoi*) and the interaction of these 2 factors in the preference of females to the volatiles of infested or uninfested fruits.

	Conditioning type		Parasitoid		Interaction	
	$\chi^2$	P value	$\chi^2$	P value	$\chi^2$	P value
IA x UA	0.36	0.8352	2.22	0.1364	0.62	0.7336
IG x UG	0.39	0.8218	14.42	0.0002 *	1.37	0.5030
IG x IA	25.98	2.28x 10 <sup>-6</sup> *	26.09	3.27x 10 <sup>-7</sup> *	2.73	0.2560
UG x UA	17.03	0.0002 *	10.77	0.0010 *	6.90	0.03182 *

IA- infested apple; UA- uninfested apple; IG- infested guava; UG- uninfested guava.

\*Means followed by asterisks are significantly different in line (GLM,  $P < 0.05$ ).



Table 2 Mean number ( $\pm$  SE) of *Diachasmimorpha longicaudata* and *Aganaspis pelleranoi* emerged from *Anastrepha fraterculus* reared in three different diet and type of parasitism unit (n = 400, 10 /larvae per unit) (brushed with distilled water, guava or apple pulp) ( $25 \pm 2$  °C,  $60 \pm 10\%$  RH).

		<i>Diachasmimorpha longicaudata</i>			<i>Aganaspis pelleranoi</i>		
		Types of Parasitism Units					
Diet of the host	Biological parameter	Distilled water	Guava	Apple	Distilled water	Guava	Apple
Artificial diet	Pupae	9.8 $\pm$ 0.20 A	9.8 $\pm$ 0.35 A	9.8 $\pm$ 0.38 A	9.7 $\pm$ 0.61 A	9.8 $\pm$ 0.58 A	9.8 $\pm$ 0.36 A
	Emerged Parasitoids	5.6 $\pm$ 3.05 A	4.7 $\pm$ 2.8 A	5.7 $\pm$ 3.16 A	1.6 $\pm$ 1.78 B	3.0 $\pm$ 2.53 A	2.1 $\pm$ 1.99 AB
	Parasitized pupae	7.4 $\pm$ 2.18 A	7.8 $\pm$ 1.78 A	7.7 $\pm$ 1.45 A	3.2 $\pm$ 1.47 B	4.9 $\pm$ 1.40 A	3.5 $\pm$ 1.34 B
Guava	Fruit fly	2.1 $\pm$ 1.80 A	1.6 $\pm$ 1.6 A	1.67 $\pm$ 1.86 A	6.1 $\pm$ 1.40 A	4.1 $\pm$ 1.61 B	5.6 $\pm$ 1.62 A
	Pupae	9.7 $\pm$ 0.54 A	9.8 $\pm$ 0.17 A	9.7 $\pm$ 0.42 A	9.8 $\pm$ 0.37 A	9.8 $\pm$ 0.16 A	9.8 $\pm$ 0.25 A
	Emerged Parasitoids	2.3 $\pm$ 3.45 B	6.0 $\pm$ 3.14A	1.0 $\pm$ 2.18B	1.1 $\pm$ 1.23B	2.2 $\pm$ 2.14 A	1.1 $\pm$ 1.66 B
Apple	Parasitized pupae	3.58 $\pm$ 3.61 B	8.32 $\pm$ 1.01 A	2.68 $\pm$ 2.72 B	3.15 $\pm$ 1.51 B	5.79 $\pm$ 1.19 A	3.07 $\pm$ 1.49 B
	Fruit fly	5.6 $\pm$ 3.37 A	1.05 $\pm$ 1.11 B	6.5 $\pm$ 2.65 A	5.7 $\pm$ 2.21 A	3.4 $\pm$ 1.58 B	6.1 $\pm$ 2.13 A
	Pupae	9.8 $\pm$ 0.42 A	9.7 $\pm$ 0.65 A	9.8 $\pm$ 0.22 A	9.4 $\pm$ 0.82 A	9.5 $\pm$ 0.58 A	9.5 $\pm$ 0.23 A
Apple	Emerged Parasitoids	1.4 $\pm$ 2.63 B	1.4 $\pm$ 2.31 B	5.5 $\pm$ 3.42 A	0.7 $\pm$ 1.53B	1.8 $\pm$ 1.99 A	1.8 $\pm$ 1.56 A
	Parasitized pupae	3.26 $\pm$ 2.56 B	3.42 $\pm$ 1.54 B	7.42 $\pm$ 1.47 A	1.93 $\pm$ 1.07 A	4.79 $\pm$ 1.05 B	4.86 $\pm$ 1.41 B
	Fruit fly	6.0 $\pm$ 2.40 A	5.8 $\pm$ 2.18 A	1.2 $\pm$ 1.80 B	7.0 $\pm$ 1.85 A	4.4 $\pm$ 2.05 B	4.4 $\pm$ 2.27 B

Means followed by different letters within rows, in the same insect species, are significantly.

Figure 1:

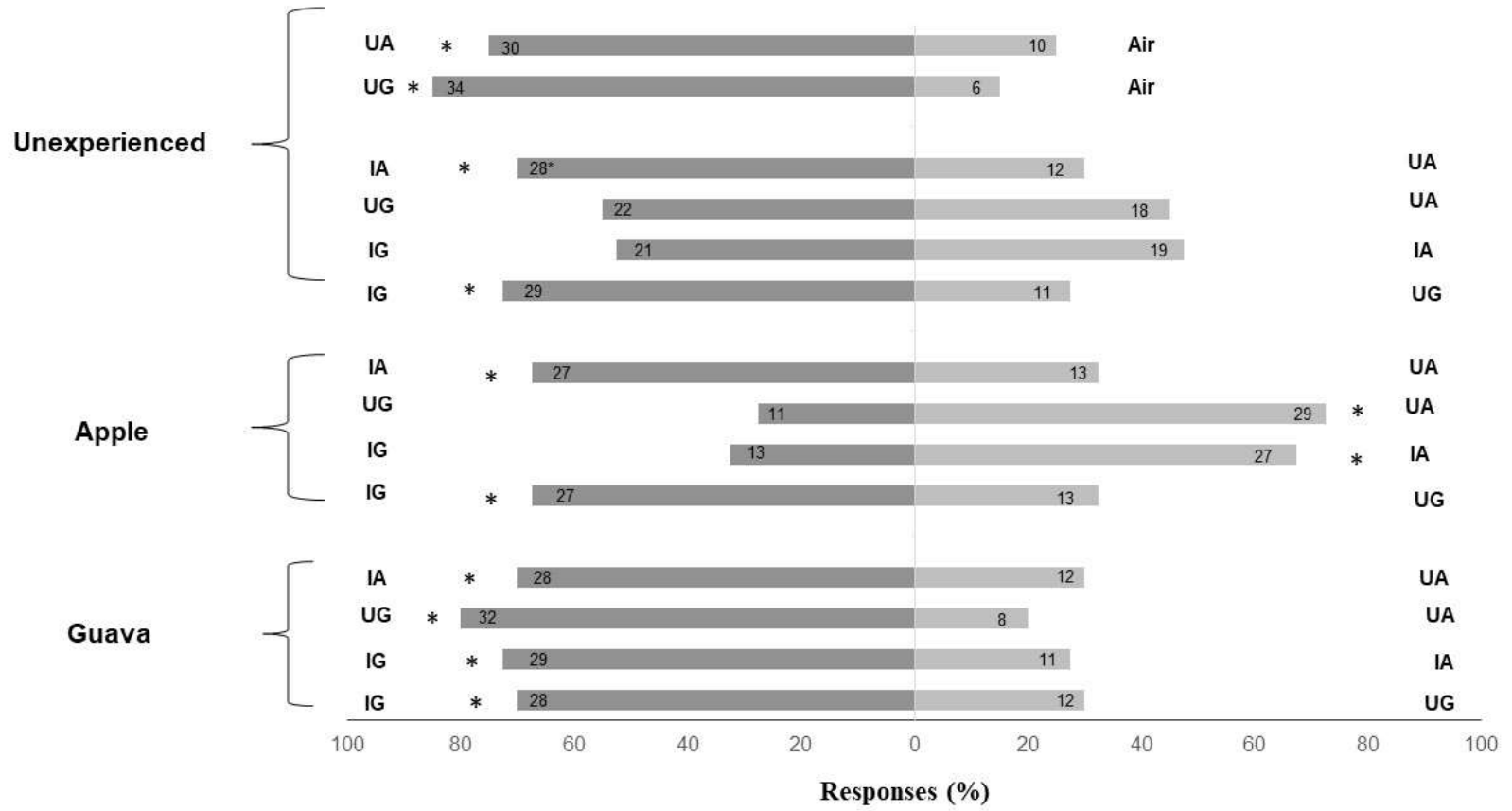
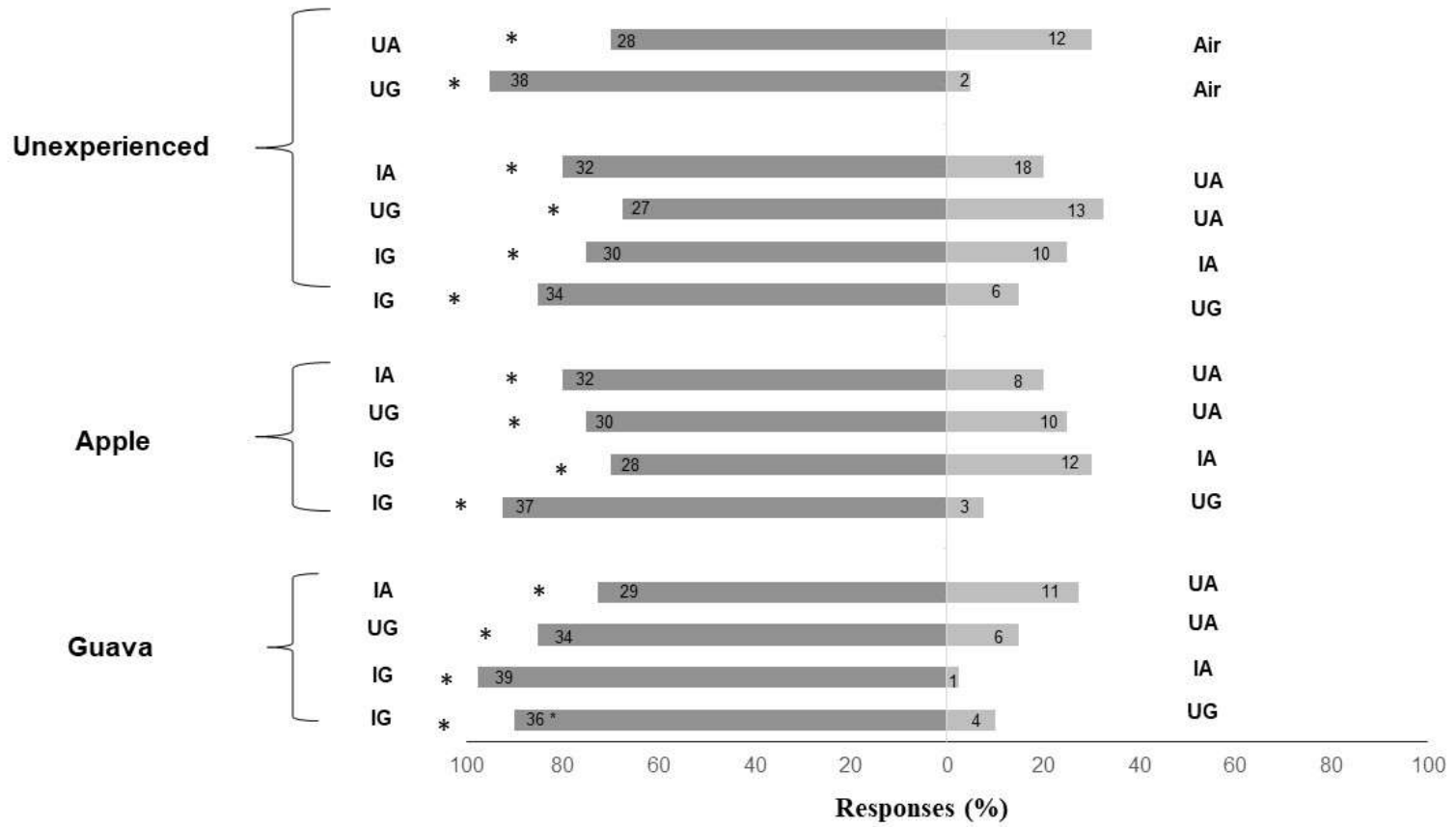


Figure 2:



## **4 ARTIGO 2**

**Chemotaxis preference of the Neotropical fruit fly parasitoid, *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae), can be change by pre-imaginal and imaginal conditioning to fruit volatiles**

Chemotaxis preference of the Neotropical fruit fly parasitoid, *Aganaspis pelleranoi* (Hymenoptera: Figitidae), can be change by pre-imaginal and imaginal conditioning to fruit volatiles

Patricia Daniela da Silva Pires, Josué Sant' Ana, Luiza Rodrigues Redaelli, Natália Alves Leite

<sup>1</sup>Department of Crop Protection, PPG-Fitotecnia, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 7712, 91540-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence:

Email address: patidpires@gmail.com

**Short Title:** Learning and memory of *A. pelleranoi* to fruits' odors

**Key words:** learning, memory, oviposition, host selection, insects

#### 4.1 Abstract

Parasitoids search behavior can be triggered by fruit volatile chemical perception and modified through pre-imaginal and/or imaginal conditioning, resulting in learning and memory. The native parasitoid *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes) (Hymenoptera: Figitidae) is an endoparasitoid of tephritids of economic impact. Despite its relevance to agroecosystems, no studies about its learning processes were ever conducted. Therefore, we carried on chemotaxic behavior and parasitism bioassays to evaluate pre-imaginal and imaginal learning, as well as memory retention of *A. pelleranoi* females to volatiles of red guava (*Psidium guajava* L.) var. Paluma, and apple (*Malus domestica* Borkh) var. Red delicious. For the pre-imaginal conditioning tests, parasitoids were obtained from *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) larvae, reared in apple or in artificial diet. The females were subjected to a choice between guava and apple fruits (infested and uninfested) in a two-choice olfactometer (Y). In the parasitism tests, we offered three units of parasitism, which consisted of *A. fraterculus* larvae brushed with water, apple pulp or guava pulp. In the olfactometer, females preferred guava volatiles regardless their pre-imaginal conditioning. When adults were conditioned (imaginal) for a period of 48 hours on apple substrate, they modified their chemotactic behavior, preferring volatiles from this fruit up to 12 hours. For the parasitism tests, females that were conditioned for 24 and 48 hours on apple volatiles, parasitized more larvae in units with this substrate. Also, the number of fruit flies that emerged was lower on apple for females conditioned for 48 hours. Therefore, we observed that imaginal conditioning for 48 hours is more suitable to modify the chemotaxis of *A. pelleranoi*. Learning and memory is a strategy used by parasitoids in host locating, optimizing foraging and parasitism. Studies of this nature might serve as a basis for using native natural enemies in fruit fly biological control programs.

## Introduction

Fruit fly parasitoids rely on chemical cues from plants in the host-seeking process, especially those induced after herbivory (HIPVs) (Khan et al., 2008; Hoedjes et al., 2011). This search behavior was already observed in braconids, such as *Diachasmimorpha kraussii* (Fullaway) (Masry et al., 2018), *Diachasmimorpha longicaudata* Ashmead (Segura et al., 2012; 2016; Zadra et al., 2018; Pires et al., 2021), *Fopius arisanus* Sonan (Monsia et al., 2019) and *Aganaspis pelleranoi* (Brèthes) (Hymenoptera: Figitidae) (Guimarães & Zucchi, 2004).

Although parasitoids have an innate preference for certain odors, some species can optimize foraging efficiency through learning (Turlings et al., 1993; Vet et al., 1995; Tognon et al., 2013; Vargas et al., 2017; Pires et al., 2021). The process of learning is known as a change in behavior that occurs as a consequence of individual experience (Matthews & Matthews, 2010) and may induce memory formation, i.e., the ability to encode, store and retrieve acquired information (Kandel, 2001; Dudai, 2002). It can occur during the immature period (pre-imaginal conditioning) (Corbet, 1985; Turlings et al., 1993; Gandolfi et al., 2003) or even in adulthood (imaginal conditioning) (Takasu & Lewis, 2003).

Learning in the immature stage is related to changes in the nervous system during larval development and it may persist into adulthood (Barron & Corbet, 1999). Rains et al. (2006) observed that olfactory stimulation to 3-octanone odor, received in the larval stage, can influence the chemotactic behavior of *Microplitis croceipes* (Cresson) (Hymenoptera: Braconidae) adults, increasing its attractiveness to this compound. Females of *Hyssopus pallidus* (Askew) (Hymenoptera: Eulophidae) were attracted to apple extract only after pre-imaginal conditioning to this odor, regardless of

the presence of its host *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae) (Gandolfi et al., 2003).

Parasitoid's learning can also occur in the adult stage (Papaj & Lewis, 1993). Bleeker et al. (2006) observed that females of *Cotesia glomerata* (L.) and *Cotesia rubecula* (Marshall) (Hymenoptera: Braconidae) after oviposition experience in larvae of *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae) associated with the odor of the plant *Tropaeolum majus* L. (Brassicales: Tropaeolaceae) (imaginal conditioning) were more attracted to the volatiles compared to inexperienced ones. Females of *C. rubecula*, as well, were attracted to buckwheat plants, *Fagopyrum esculentum* Moench (Polygonaceae), only after a previous experience on these plants (Fataar et al., 2019).

Few studies address learning to preimaginal and/or imaginal conditioning in fruit fly parasitoids. Monsia et al. (2019) observed that naive *F. arisanus* females were more attracted to banana, *Musa* sp. Diekmann (Musaceae), volatiles infested with *Bactrocera dorsalis* Hendel (Diptera: Tephritidae), while those that had experience on tomato, *Solanum lycopersicum* L., were more attracted to this Solanaceae. Also, females of *D. longicaudata* emerged from *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) larvae kept in guava or mango preferred parasitoid's units brushed with the pulp of these fruit, respectively (Zadra et al., 2018). Similarly, Pires et al. (2021) observed that *D. longicaudata* from *A. fraterculus* larvae that fed on guava or apple increased its parasitism in units where the same fruits' pulps were present. In addition, the parasitoids that emerged from larvae fed on artificial diet, did not show any preference.

There are no studies regarding to conditioning of native fruit fly parasitoids, such as *A. pelleranoi*. This species is Neotropical and an important biological control agent of tephritids, such as *A. fraterculus* and *Ceratitidis capitata* (Wiedemann)



distributed in all regions of Brazil (Guimarães et al., 1999). This wasp is frequently found in Myrtaceae orchards (Guimarães et al., 1999; Guimarães et al., 2003; Pereira-Rêgo et al., 2013; Meirelles et al., 2016). Adults search for their host larvae in fallen fruits (Ovruski et al., 2000; Ovruski & Aluja, 2002) or in small cracks due to the size of their ovipositor (Sivinski et al., 2000). Once in contact with the fruit, larval vibrations have an important role in this host-location process (Guimarães & Zucchi, 2004). Thus, *A. pelleranoi* is usually found in orchards during the final period of fruit ripening, parasitizing the larvae that somehow escaped parasitism by braconids (Guimarães & Zucchi, 2004).

Studies of learning and memory using olfactory classical conditioning of *A. pelleranoi* may provide relevant information on how this approach can be used to manipulate this parasitoid behavior and therefore improve tephritids biological control in orchards. In this sense, we evaluated pre-imaginal and imaginal learning, as well as memory of *A. pelleranoi* females to volatiles of red guava and apple, both in olfactometry and parasitism bioassays.

## **Materials and methods**

### *Parasitoid and host rearing*

Females of the original *A. pelleranoi* colony were collected in cattley guava [*Psidium cattleianum* Sabine] (Myrtaceae) infested with *A. fraterculus*, in Taquari (29°48'00"S 51°51'35"O) (RS, Brazil). *Anastrepha fraterculus* colony maintenance was carried out according to the methodology described by Meirelles et al. (2016). The fruit fly larvae were reared on artificial diet based on carrot. Insects were maintained under controlled conditions (25 ± 2 °C; 60 ± 10 % r.h.).

*Aganaspis pelleranoi* was reared in wooden cages (27 x 25 x 30 cm) with a solution of honey and distilled water (7:3), which was placed in Petri dishes filled with cotton. The third-instar larvae of *A. fraterculus* were offered daily to the parasitoids with 5 to 15 days of age. The larvae were arranged in parasitism units made of a plastic plate (4 cm of diameter), with a silicone border of 0.3 cm, wrapped in white voile, according to Rohr et al. (2019).

#### *Fruit infestation*

Guavas (*Psidium guajava* L) cv. Paluma (Myrtaceae), and apples (*Malus domestica* Borkh) cv. Red delicious (Rosaceae), were sanitized with sodium hypochlorite (0.5%) for approximately 30 min. The peel was perforated, and part of the pulp removed. Artificial infestation was performed with 50 *A. fraterculus* larvae (2nd instar - five days old) fed with artificial diet (Meirelles et al., 2016). These fruits were infested 48 hours prior to olfactometer bioassays. Artificial infestation with larvae from artificial diet was done to standardize the number and larvae age in each fruit.

#### *Pre-imaginal conditioning of parasitoids*

The fruits of apple infested with second instar *A. fraterculus* larvae were packed in plastic pots (500 ml). The pots contained sterile sand at the bottom and were covered with voile. The fruits remained there for approximately five days, until the larvae reach the third instar. After this period, the larvae were removed (with a soft tweezer, Bioquip®) from the fruits, arranged in parasitism units and exposed to *A. pelleranoi* for four hours (based on Gonçalves et al., 2016). Afterwards, it was placed in plastic pots with sand until emergence. Parasitoids (male and female) from larvae that developed in apple were kept in a wood cage (19.5 × 16.5 × 25.5 cm) after emergence. The same

methodology was used for parasitoids exposed to *A. fraterculus* that were maintained in artificial diet (inexperienced females). Females used in olfactometry, and parasitism bioassays were 5 to 7 days old.

#### *Imaginal conditioning of parasitoids*

Ten groups of 5-7 mated females (5 days old) were exposed to an apple substrate for 24 and 48 hours. Therefore, the parasitoids were 6 and 7 days old when tested in the bioassays. The substrate (hemispheric shape with 3.5 cm diameter) was a mix of agar (1.25 g), distilled water (25 ml), and 20 ml of natural apple fruit pulp (cv. Red delicious).

#### *Olfactometer bioassays*

The olfactory preference of *A. pelleranoi* females were tested using the two-choice glass olfactometer (Y) of 1 cm diameter, initial arena of 12 cm, bifurcated into 5 cm arms. The methodology used was described by Pires et al. (2021).

We evaluated the responses of *A. pelleranoi* (pre-imaginal conditioning) from *A. fraterculus* larvae reared only on artificial diet (inexperienced) or on apple, submitted to apple or guava fruit volatiles (infested or uninfested). For *A. pelleranoi* females from the imaginal conditioning on apple for 24 and 48 hours, bioassays were performed contrasting apple versus guava infested fruits. Also, to determine the duration of memory retention, for 48 hours imaginal conditioning, parasitoids were tested after one, 12 and 24 hours. They had to choose between odors of apple versus guava infested fruits.

Positive response (first choice) occurred when the insect remained for at least 30 seconds at the end of one arm. Parasitoids were considered not responsive when they

did not move or did not reach one of the two arms of the olfactometer within 5 min. Forty responsive females were tested for each comparison.

### *Parasitism bioassays*

This bioassay was conducted to observe the effects of imaginal and pre-imaginal conditioning on *A. pelleranoi* learning and memory compared to inexperienced parasitoids. It was done exposing one female in a circular plastic arena (29 × 12 cm) and given it the choice among three parasitism units. The units were brushed with fresh apple pulp, guava pulp or distilled water only (control). Each unit had 10 third instar *A. fraterculus* larvae from artificial diet. Units were offered simultaneously for 4 hours to one female of *A. pelleranoi* (Gonçalves et al., 2013). The experimental design was completely randomized with forty repetitions per treatment. The treatments were inexperienced parasitoids from artificial diet, parasitoids from pre-imaginal conditioning, and parasitoids from imaginal conditioning for 24 and 48 hours). After exposure, the larvae were placed in 50 ml plastic pots containing sand and kept in a climate chamber (25 ± 2 °C; 60 ± 10 % r.h.; under scotophase) until the emergence of parasitoids or flies. We recorded the number of *A. fraterculus* pupae, parasitized pupae (emerged parasitoids + dissected pupae with parasitoids), and emerged parasitoids and fruit flies.

### *Statistical analysis*

All data were analyzed with generalized linear models (GLMs) in the statistical software R 4.0.0 (RStudio, 2020). A binomial distribution was used for the parasitoid choice frequency in the olfactometer bioassays. The quasi-poisson distribution was used for all variables of the parasitism bioassays, and data were analysed in a factorial

scheme of four types of conditioning (inexperienced, pre-imaginal, imaginal for 24 hours, and imaginal for 48 hours) per three parasitism units (water, apple and guava). The goodness-of-fit of the model was confirmed with a half-normal plot (hnp package) (Moral et al., 2017). The means were compared using model contrasts ( $P < 0.05$ ), with the compact letter display (CLD) function (Piepho, 2004) from the packages emmeans (Russel, 2020) and multcompview (Graves et al., 2019).

## Results

### *Olfactometry*

When guava and apple fruit were offered to inexperienced *A. pelleranoi* females, it preferred volatiles from guava compared to those from apples, both infested ( $\chi^2 = 20.9$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$ ) and uninfested ( $\chi^2 = 10.0$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0.002$ ) (Figure 1). *Aganaspis pelleranoi* individuals from larvae maintained on apples (pre-imaginal conditioning) did not change their chemotactic behavior, that is, they still preferred guava volatiles of infested fruits ( $\chi^2 = 13.2$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$ ) and uninfested ( $\chi^2 = 20.9$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$ ) (Figure 1).

*Aganaspis pelleranoi* females (imaginal conditioning) exposed for 24 hours to the apple agar substrate were not attracted neither to infested guava nor to infested apple odors ( $\chi^2 = 1.8$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0.179$ ) (Figure 2). However, those exposed to apple substrate for 48 hours, were more responsive to infested apple than to infested guava ( $\chi^2 = 10.0$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0.001$ ) (Figure 2).

When *A. pelleranoi* females were exposed to apple odors for 48 hours and evaluated 1 ( $\chi^2 = 13.2$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0.001$ ) and 12 hours ( $\chi^2 = 7.3$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0.006$ ) after imaginal conditioning, they were more responsive to infested apple than to infested

guava volatiles. However, they did not distinguish these odors 24 hours ahead ( $\chi^2 = 0.2$ ;  $df = 1$ ;  $P = 0.655$ ) (Figure 3).

### *Parasitism*

There was a significant interaction between types of conditioning and parasitism units for the variables parasitized pupae of *A. fraterculus* ( $F_{6,468} = 9.95$ ,  $P < 0.001$ ) and emerged fruit flies ( $F_{6,468} = 9.65$ ,  $P < 0.001$ ).

Imaginal conditioning resulted in a higher number of parasitized pupae in units with apple, compared to water and guava. Inexperienced parasitoids parasitized more guava, while parasitoids from pre-imaginal conditioning did not distinguish between apple and guava (Table 1). The data within the apple unit, we noticed a higher number of parasitized pupae for imaginal (48 hours) and pre-imaginal conditioning, compared to inexperienced parasitoids. For imaginal conditioning for 24 hours, it did not differ from inexperienced and the others (Table 1).

The mean number of fruit flies was higher in apple only for imaginal conditioning (48 hours) (Table 1). Also, pre-imaginal conditioning reduced the number of fruit flies emerged from apple and guava compared to water. When we compared the parasitism within unit apple, the number of fruit flies was lower in imaginal conditioning for 24 and 48 hours, and the former did not differ from pre-imaginal conditioning (Table 1).

It was not observed interaction between types of conditioning and parasitism units for the variables pupae of *A. fraterculus* formed ( $F_{6,468} = 0.21$ ,  $P = 0.973$ ) and emerged parasitoids ( $F_{6,468} = 2.07$ ,  $P = 0.056$ ).

There were no differences in the number of pupae from the three types of parasitism units ( $F_{2,477} = 0.51$ ,  $P = 0.599$ ). However, it differed among types of

conditioning ( $F_{3,474} = 4.42$ ,  $P < 0.001$ ). It was lower in pre-imaginal and imaginal (48h) conditioning, though the latter did not differ from pre-imaginal (24) and inexperienced (Table 2).

The number of emerged parasitoids differed among parasitism units ( $F_{2,477} = 15.27$ ,  $P < 0.001$ ). Parasitoids' emergence was lower in the parasitism unit with water. It was also different among types of conditioning ( $F_{3,474} = 5.20$ ,  $P = 0.002$ ). Emerged parasitoids was lower in pre-imaginal conditioning and did not differ among imaginal conditioning for 24 hours, imaginal conditioning for 48 hours, and inexperienced (Table 2).

## Discussion

Inexperienced females of *A. pelleranoi* preferred guava volatiles to apple odor (infested or uninfested), in olfactometry tests. In addition, for this females the number of parasitized pupae was lower in units containing apple pulp compared to guava or distilled water.

Parasitoids searching is an adaptive process in response to environmental (Ero & Clarke, 2012; Segura et al., 2016; Yoneya et al., 2018). The greater is the parasitoid adaptation to its host-plant system, the better the perception of odors associated with these organisms, which may increase the parasitoid reproductive success (Poelman et al., 2009). *Aganaspis pelleranoi* is native of the Neotropical region (Guimarães et al., 1999), and is frequently found parasitizing tephritid larvae in Myrtaceae, which suggest a close and adaptive interaction among this parasitoid and plants from this family (Pereira-Rêgo et al., 2013; Meirelles et al., 2016). This fact might be an explanation to the positive responses (chemotaxis and parasitism tests) of inexperienced *A. pelleranoi* to treatments containing guava odors.

Females of *A. pelleranoi* when conditioned (pre-imaginal) in larvae that fed on apple did not modify their olfactory responses. According to the Chemical Legacy Theory (CLT) insects' chemosensory responsiveness depends on traces of chemical cues from hosts and/or plant odors, particularly during emergence or hatching, which will influence their searching behavior as adults (Corbet, 1985). The chemosensory responsiveness was already registered in braconid wasps such as *D. longicaudata* (Kruidhof et al., 2012; Benelli & Canale, 2013; Segura et al., 2016; Pires et al., 2021), *Aphidius ervi* (Haliday) (Gutiérrez-Ibáñez et al., 2007). However, in olfactometer bioassays we did not observed CLT in *A. pelleranoi* from larvae fed on apple. It is known that depending on the degree of specialization between the parasitoid and its host, it may be necessary contact of several generations in the same host in order to change the insect chemotactic behavior (Bernays, 2001; Jones et al., 2015; Petit et al., 2018). Thus, it is possible to assume that due to the high affinity of *A. pelleranoi* to Myrtaceae fruits, apple would impact olfactory searching behavior of *A. pelleranoi*, as long as there was a continued exposure of this parasitoid to apple-feeding larvae for more generations.

In most studies regarding to parasitoid learning, the chemical legacy was related to volatiles from the hosts, rather than host's feeding (Takemoto et al., 2009; Thiel & Hoffmeister, 2009; Jones et al., 2015; Bodino et al., 2016; Tognon et al., 2018). Host feeding effects on parasitoids' behavior were registered in a few species such as *H. pallidus* (Gandolfi et al., 2003). These authors verified that *C. pomonella* immature feeding (apple extract) intensified the responses in glass arena bioassays of its parasitoid (*H. pallidus*) to volatiles from apple fruits. This result diverged from ours, probably because in our study, unlike *C. pomonella/H. pallidus*/apple, there was not a strong trophic relation among apple, *A. pelleranoi* and *A. fraterculus*.



Unlike pre-imaginal conditioning, imaginal conditioning of *A. pelleranoi* with apple substrate for 48 hours resulted in a change of its behavior. Adult conditioning was considered by Giunti et al. (2015) to have a greater impact on parasitoids foraging behavior than the larval experience. Adult experience on host choice by *Necremnus tutae* Ribes & Bernardo (Hymenoptera: Eulophidae) on larvae of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) had a positive impact on host location behavior and oviposition, even when *Cosmopterix pulchrimella* Chambers (Lepidoptera: Cosmopterigidae) was its origin host (Bodino et al., 2016). Lentz-Ronning & Kester (2013), also observed imaginal conditioning in females of *Cotesia congregata* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) which were more responsive to odors of tomato (*Solanum lycopersicon* L.) (Solanaceae) or tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) (Solanaceae) after a period of 24 hours of experience, increasing oviposition rates and biotic potential in the plants where it was conditionate.

The imaginal conditioning may have triggered a change in the behavior of *A. pelleranoi*, altering the biosynthesis of odorous binding proteins (OBPs). These proteins are responsible for the perception of molecules of importance in the chemical communication of insects and their biosynthesis can be impacted, qualitatively and quantitatively, by both biotic and abiotic factors (Gadenne et al., 2016), including exposure to olfactory stimuli (Gols et al., 2012; Zhang et al., 2019; Picimbon, 2020). According to Reitmayer et al. (2019), the response to a stimulus gradually increases with repeated exposure. It can be repetitive (constant) and result in habituation or be unique and sufficient to induce sensitization, triggering new patterns of behavior towards a specific stimulus (Squire & Kandel, 1999). Thus, we assume that there was a sensitization process in the antennal chemotactic sensilla of *A. pelleranoi* which, in nature, would result in some adaptive advantage for this parasitoid.

In addition to chemotaxis tests, pre-imaginal conditioning of *A. pelleranoi* on apple was not enough to change its parasitism rate on this unit, which was similar to the one observed on guava, nevertheless, inexperienced parasitized more units of guava. Besides, we observed that experience on apple substrate for 24 hours was enough time to increase parasitism. These responses might be due to multimodal cues used by *A. pelleranoi* in searching strategies. For example, conditioning was perceptible in parasitism but not in chemotaxis tests, possibly because of the synergistic effect of volatiles from pulps and larvae (parasitism units), as well as interaction of odor and visual stimulus on parasitoid's attraction.

Although there was a higher number of parasitized pupae in units with pulp of apple and guava, compared to those with water, by wasps conditioned on apple-feeding larvae, it did not reflect in a higher number of emerged *A. pelleranoi*. It is important to observe that larvae fed on apple only in pre-imaginal conditioning. We suppose that the immature feeding has negatively impacted the viability of the parasitoids, as well as the number of pupae formed, and emerged flies. It is known that host's food can interfere with both the development of the flies, such *A. fraterculus* (Dias et al., 2019), *Bactrocera invadens* Drew, Tsuruta & White and *Ceratitis fasciventris* (Bezzi) (Ekesi et al., 2014) and the parasitoids as observed for *D. longicaudata* (Cicero et al., 2011; Pascacio-Villafán et al., 2020), *Doryctobracon crawfordi* (Viereck), *Opius hirtus* (Fischer) and *Utetes anastrephae* (Viereck) (Cicero et al., 2011). Thus, we believe that the apple offered to larvae for pre-imaginal conditioning has not favored the viability of either the herbivore or its natural enemy. Furthermore, it is worth emphasizing that parasitism rates of *A. pelleranoi* on *A. fraterculus* bred on artificial diet were no high (38 and 40 %), as observed by Gonçalves et al. (2016) and Rohr et al. (2019), respectively. In our bioassay we found, in unconditioned insects, that parasitism was

about 30%, with an increase in this rate (around 50%) in units containing the pulp of apple, after conditioning to this fruit's odor for 48 hours. Thus, we suppose that imaginal conditioning on fruit pulp with a close interaction, such as those of Myrtaceae, could increase, even more, the parasitism of this species when in the presence of odors previously conditioned.

To assess memory duration of *A. pelleranoi*, we conducted olfactometer bioassays with adults exposed to apple substrate for 48 hours, since in no other test we verified change in behavior after apple experience. It was observed that the females retain information from apple substrate for, at minimum, a 12-hour period. The memory retention time in insects can vary from a minute to weeks (Gandolfi et al., 2003; Tertuliano et al., 2004; Bleeker et al., 2006; Hoedjes et al., 2011; Hoedjes et al., 2014; Sant'Ana & Gregório, 2016; Bruijn et al., 2018). The process of forming long-term memory is expensive in terms of energy expenditure, as it requires protein synthesis (Mery & Kawecki, 2004; Bruijn et al., 2018). Short encounters with traces of the host or his breeding site can result in a memory process, although it results in memories that are generally less persistent (Takasu & Lewis, 2003).

Tertuliano et al. (2004) observed that females of *M. croceipes*, after training with 3-octanone (10 seconds), was able to remember this odor information for up to 24 hours. However, when this volatile was exposed for the same time, but in three sessions, memory increased (48 hours). Different from our results, Smid et al. (2007) found that only a single oviposition of *C. glomerata* or *C. rubecula* in *Pieris brassicae* (L.) (Lepidoptera: Pieridae) was enough to memory's retention from its host, for up to 24 hours. Furthermore, the chemotaxis responses of *A. ervi* females, previously conditioned to yeast odors for 24 hours, lasted 48 hours after conditioning (Sobhy et al., 2019).

It is known that depending on learning conditions (e.g., number of trails, inter stimulus and inter trial intervals, stimulus intensity, type of odor, etc) learning may encode, store, and retrieve information differently (Kandel, 2001; Dudai, 2002). Usually, the value of the host's reward determines the memory retention time (Bleeker et al., 2006; Kruidhof et al., 2012).

The biological control involving the use of parasitoids depends on their ability to find their hosts. The plasticity of the sensory systems induced by the experience can impact the survival of the parasitoids by increasing their fitness to the environment. Therefore, it is important to understand how parasitoids integrate the different chemical clues in their environment and how previous experience with these odors can optimize foraging efficiency.

Here, we showed that *A. pelleranoi* responds better to imaginal conditioning, and that when this experience lasts for 48 hours, the memory to apple odors remains longer. These findings are relevant since few studies reported the impact of the host's food in parasitoid search processes, and nothing is known about native fruit fly parasitoids, as *A. pelleranoi*. This work may serve as a basis for using native natural enemies in fruit fly biological control programs.

### **Acknowledgments**

Financial support and scholarships were provided by the Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) for first (88882.439605/2019-01) and fourth authors (88887.469188/2019-00) and National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) for the second (process n°. 303758/2018-0) and third authors (process n°. 306626/2019-5). The authors declare no conflicts of interest. We also thank the two anonymous reviewers for constructive comments.

## REFERENCES

- Barron AB & Corbet SA (1999) Preimaginal conditioning in *Drosophila* revisited. *Animal Behavior* 58: 621-628. doi: 10.1006/anbe.1999.1169
- Benelli G, Revadi S, Carpita A, Giunti G & Raspi A (2013) Behavioral and electrophysiological responses of the parasitic wasp *Psytalia concolor* (Szépligeti) (Hymenoptera: Braconidae) to *Ceratitis capitata*- induced fruit volatiles. *Biological Control* 64:116-124. doi: 10.1016/j.biocontrol.2012.10.010
- Bernays EA (2001) Neural limitations in phytophagous insects: implications for diet breadth and Evolution of Host Affiliation. *Annual Review Entomology* 46: 703–727. doi: 10.1146/annurev.ento.46.1.703
- Bleeker MAK, Smid HM, Steidle JLM et al. (2006) Differences in memory dynamics between two closely related parasitoid wasp species. *Animal Behaviour* 71:1343-1350. doi: 10.1016/j.anbehav.2005.09.016
- Bodino N, Ferracini C & Tavella L (2016) Is host selection influenced by natal and adult experience in the parasitoid *Necremnus tutae* (Hymenoptera: Eulophidae)? *Animal Behaviour* 112:221-228. doi: 10.1016/j.anbehav.2015.12.011
- Bruijn JAC, Vet LEM & Smid HM (2018) Coast of persisting unreliable memory: reduced foraging efficiency for free-flying parasitic wasp in wind tunnel. *Frontiers and Evolution* 8:1-9. doi: 10.3389/fevo.2018.00160
- Cicero L, Sivinski J, Rull J & Aluja M (2011) Effect of larval host food substrate on egg load dynamics, egg size and adult female size in four species of braconid fruit fly (Diptera: Tephritidae) parasitoids. *Journal of Insect Physiology* 57(11): 1471-1479. doi: 10.1016/j.jinsphys.2011.07.014
- Corbet SA (1985) Insect chemosensory responses: a chemical legacy hypothesis. *Ecology Entomology* 10:143-153. doi: 10.1111/j.1365-2311.1985.tb00543.x
- Dias NP, Nava DE, Smaniotto G et al. (2019) Rearing two fruit flies pests on artificial diet with variable pH. *Brazilian Journal of Biology* 79(1): 104-110. doi: 10.1590/1519-6984.179347
- Dudai Y. Memory from A to Z: keywords, concepts and beyond. In *Applied Cognitive Psychology*. Oxford University Press, Oxford 2002.
- Ekesi S, Mohamed SA & Chang CL (2014) A liquid larval diet for rearing *Bactrocera invadens* and *Ceratitis fasciventris* (Diptera: Tephritidae). *International Journal of Tropical Insect Science* 34(51): S90-S98. doi: 10.1017/S1742758414000113

- Ero MM & Clarke AR (2012) Host location by the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha krausii*: role of fruit fly species, life stage and host plant. *Agricultural and Forest Entomology* 14:101-110. doi: 10.1111/j.1461-9563.2011.00545.x
- Fataar S, Kahmen A & Luka H (2019) Innate and learned olfactory attraction to flowering plants by the parasitoid *Cotesia rubecula* (Marshall, 1885) (Hymenoptera: Braconidae): Potential impacts on conservation biological control. *Biological Control* 132:16-22. doi: 10.1016/j.biocontrol.2019.01.009
- Fligner MA & Killeen TJ (1976) Distribution-free two-sample tests for scale. *Journal of the American Statistical Association* 71: 210-213. doi: 10.2307/2285771
- Gadenne C, Barrozo RB & Anton S (2016) Plasticity in insect olfaction: to smell or not to smell. *Annual Review Entomology* 6: 317-333. doi: 10.1146/annurev-ento-010715-023523
- Gandolfi M, Mattiacci L & Dorn S (2003) Preimaginal learning determines adult response to chemical stimuli in a parasitic wasp. *Proceedings of the Royal Society B* 270: 2623-2629. doi: 10.1098/rspb.2003.2541
- Giunti G, Canale A, Messing RH et al. (2015) Parasitoid learning: Current knowledge and implications for biological control. *Biological Control* 90:208-219. doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.06.007
- Gols R, Veenemans C, Potting RPJ et al. (2012) Variation in the specificity of plant volatiles and their use by a specialist and a generalist parasitoid. *Animal Behavior* 83:1231-1242. doi: 10.1016/j.anbehav.2012.02.015
- Gonçalves RS, Nava DE, Pereira HC et al. (2013) Biology and fertility life table of *Aganaspis pellaranoi* (Hymenoptera: Figitidae) in larvae of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Annual Entomology Society American* 106: 791-798. doi: 10.1603/AN13044
- Gonçalves RS, Andreazza F, Lisboa H et al. (2016) Basis for the development of a rearing technique of *Aganaspis pellaranoi* (Hymenoptera: Figitidae) in *Anastrepha fraterculus* (Tephritidae: Diptera). *Journal Economic Entomology* 10:1094-1101. Doi: 10.1093/jee/tow069.
- Graves S, Piepho HP, Selzer L, Dorai-Raj S (2019). MultcompView: visualizations of paired comparisons. R package version 0.1-8. <https://CRAN.R-project.org/package=multcompView>
- Guimarães A, Zucchi RA, Diaz NB et al. (1999) Espécies de Eucoilinae (Hymenoptera: Cynipoidea: Figitidae) parasitoides de larvas de frugívoras (Diptera: Tephritidae e Lonchaiedae) no Brasil. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 28: 63-273. doi: 10.1590/S0301-80591999000200009
- Guimarães, J. A et al. (2003) Eucoilinae species (Hymenoptera: Cynipoidea: Figitidae) parasitoids of fruit-infesting dipterous in Brazil. Identity, geographical distribution and host associations. *Zootaxa* 278:23. doi: 10.11646/zootaxa.278.1.1

- Guimarães JA & Zucchi RA (2004) Parasitism behavior of three species of Eucilinae (Hymenoptera: Cynipoidea: Figitidae) fruit fly parasitoids (Diptera) in Brazil. *Neotropical Entomology* 33: 217-224. doi: 10.1590/S1519-566X2004000200012
- Gutierrez AP, Ponti L, D'Oultremont T & Ellis CK (2008) Climate change effects on poikilotherm tritrophic interactions. *Climate Change* 87(1): S167-S192. doi: 10.1007/s10584-007-9379-4
- Gutiérrez-Ibáñez C, Villagra CA & Niemeyer HM (2007) Pre-pupation behaviour of the aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Haliday) and its consequences for pre-imaginal learning. *Naturwissenschaften* 94: 595-600. doi: 10.1007/s00114-007-0233-3
- Hoedjes KM, Kruidhof HM, Huigens ME et al. (2011) Natural variation in learning rate and memory dynamics in parasitoid wasp: opportunities for converging ecology and neuroscience. *Proceedings of the Royal Society B* 278: 889-897. doi: 10.1098/rspb.2010.2199
- Hoedjes KM, Kralemann LEM, Van Vugt JJFA et al. (2014) Unravelling reward value: the effect of host value on memory retention in *Nasonia* parasitic wasps. *Animal Behavior* 96: 1-7. doi: 10.1016/j.anbehav.2014.07.013
- Jones TS, Bilton AR, Mak L, Sait SM (2015) Host switching in a generalist parasitoid: contrasting transient and transgenerational costs associated with novel and original host species. *Ecology and Evolution* 5: 459-465. doi: 10.1002/ece3.1333
- Kandel ER (2001) The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science* 294:1030-1038. doi:10.1126/science.1067020
- Khan ZR, James DG, Midega CAO & Pickett JA (2008) Chemical ecology and conservation biological control. *Biological Control* 45:210–224. doi: 10.1016/j.biocontrol.2007.11.009
- Kruidhof HM, Pashalidou FG, Fatouros NE et al. (2012) Reward Value Determines Memory Consolidation in Parasitic Wasps. *PlosOne* 7(8): e39615. doi: 10.1371/journal.pone.0039615
- Lentz-Ronning A & Kester K M (2013) Effect of sequential learning experiences on searching responses and sex ratio allocations of the gregarious insect parasitoid, *Cotesia congregata* (Say) (Hymenoptera: Braconidae). *Journal Insect Behavior* 26: 165-175. doi: 10.1007/s10905-012-9345-5
- Masry A, Clarke AR & Cunningham JP (2018) Learning influences host versus nonhost discrimination and postalighting searching behavior in the Tephritid fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha kraussii* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Economic Entomology* 111: 787-794. doi:10.1093/jee/toy033
- Meirelles RN, Redaelli LR, Jahnke SM et al. (2016) Parasitism of fruit flies (Tephritidae) in field, after the releases of *Diachasmimorpha longicaudata*

- (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) in Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Fruticultura* 38: 1-10. doi: 10.1590/0100-29452016673
- Mery F & Kawecki TJ (2004) An operating cost of learning in *Drosophila melanogaster*. *Animal Behavior* 68: 589–598. doi: 10.1016/j.anbehav.2003.12.005
- Monsia A, Mègnigbèto GSB, Gnanvossou D et al. (2019) Effect of fruit and host fly species on the associative learning by *Fopius arisanus*. *Bulletin of Entomological Research* 109(5): 649-658. Doi: 10.1017/S0007485319000038
- Moral RA, Hinde J, Demétrio CGB (2017) “Half-Normal Plots and Overdispersed Models in R: The hnp Package.” *J Stat Software* 81(10): 1-23. <https://doi.org/10.18637/jss.v081.i10>
- Ovruski SM & Aluja M (2002) Mating behavior of *Aganaspis pelleranoi* (Brethes) (Hymenoptera: Figitidae, Eucilinae), a fruit fly (Diptera: Tephritidae) larval parasitoid. *Journal Insect Behavioral* 15: 139-151. doi:10.1023/A:1014444515527
- Ovruski SM, Aluja M, Sivinski J & Wharton R. (2000) Hymenopteran parasitoids on fruit infesting Tephritidae (Diptera) in Latin America and the southern United States: Diversity, distribution, taxonomic status and their use in fruit fly biological control. *Integrated Pest Management Reviews* 5:81-107. doi: 10.1023/A:1009652431251
- Papaj DR & Lewis AC. (Eds.). *Insect Learning: ecological and evolutionary perspectives*. New York: Chapman & Hall, 1993. doi: 10.1007/978-1-4615-2814-2
- Pascacio-Villafán C, Guillén L & Aluja M. (2020) Agar and carrageenan as coast-effective gelling agents in Yeast-reduced artificial diets for mass-rearing fruit flies and their parasitoids. *Insects* 11(2):131. doi: 10.3390/insects11020131
- Pereira-Rêgo DRG, Jahnke SM, Redaelli LR & Schaffer N (2013) Variação na infestação de mosca-das-frutas (Diptera: Tephritidae) e parasitismo em diferentes fases de frutificação em mirtáceas nativas no Rio Grande do Sul. *EntomoBrasilis* 6(2):141-145. doi: 10.12741/ebrasilis.v6i2.259
- Petit C, Ahuya P, Le R & Kaiser B (2018) Influence of prolonged dietary experience during the larval stage on novel odour preferences in adults of noctuid stem borer moths (Lepidoptera: Noctuidae). *European Journal Entomology* 115: 112-116. doi: 10.14411/eje.2018.009
- Picimbon JF (2020) Interpopulational variations of odorant-binding protein expression in the Black Cutworm Moth, *Agrotis ipsilon*. *Insects* 11:1-17. doi: [10.3390/insects11110798](https://doi.org/10.3390/insects11110798)
- Piepho HP (2004) An Algorithm for a Letter-Based Representation of All-Pairwise Comparisons. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 13: 456-466. doi: 10.1198/1061860043515x
- Pires PDS, Sant’Ana J & Redaelli LR (2021) Can *Anastrepha fraterculus* larval feeding influence chemotaxis and parasitism of *Diachasmimorpha longicaudata* and



- Aganaspis pelleranoi*? *Bulletin Entomology Research* 1-8. doi: 10.1017/S0007485321000249
- Poelman EH et al. (2009) Field parasitism rates of caterpillars on *Brassica oleracea* plants are reliably predicted by differential attraction of *Cotesia* parasitoids. *Functional Ecology* 23: 951-962. doi: 10.1111/j.1365-2435.2009.01570.x
- Rains GC, Utley SL & Lewis WJ (2006) Behavioral monitoring of trained insects for chemical detection. *Biotechnology Progress* 22:2-8. doi: 10.1021/bp050164p
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical computing. Available in: <<https://www.R-project.org>> (Accessed on June 10, 2021)
- Reitmayer CM, Ryalls JMW, Farthing E et al. (2019). Acute exposure to diesel exhaust induces central nervous system stress and altered learning and memory in honey bees. *Scientific Reports* 9: 1-9. doi: 10.1038/s41598-019-41876-w
- Rohr RA (2019) Interações entre parasitoides das famílias Braconidae e Figitidae (Insect: Hymenoptera) e seus hospedeiros (Diptera: Tephritidae). Tese de doutorado. Departamento de Biologia Animal, Faculdade de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, 173p.
- Rohr RA, Jahnke SM & Redaelli LR (2019) Influence of the original host in preference of *Aganaspis pelleranoi* and *Doryctobracon aerolatus*, parasitoids of Tephritidae larvae. *Bulletin of Insectology* 72: 13-20.
- Russell L (2020). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.4.8. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
- Sant'Ana J, Gregório PLF (2016). Olfactory learning and memory in *Grapholita molesta*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 160: 40-46. doi: 10.1111/eea.12456
- Segura DF, Viscarret MM, Ovruski SM & Cladera JL (2012) Response of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* to host and host-habitat volatile cues. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 143: 164-176. doi: 10.1111/j.1570-7458.2012.01246.x
- Segura DF, Nussenbaum AL, Viscarret MM et al. (2016) Innate host habitat preference in the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata*: functional significance and modifications through learning. *PLoS ONE* 11:1-18. doi: 10.1371/journal.pone.0152222
- Shapiro SS & Wilk MB (1965) An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52: 591-611. doi: 10.2307/2333709
- Sivinski J, Pinero J & Aluja M (2000) The distributions of parasitoids (Hymenoptera) of *Anastrepha* fruit flies (Diptera: Tephritidae) along an altitudinal gradient in Veracruz, Mexico. *Biological Control* 18, 258-269. doi: 10.1006/bcon.2000.0836

- Smid HM, Wang G, Bukovinszky T et al. (2007) Species-specific acquisition and consolidation of long-term memory in parasitic wasps. *Proceedings of the Royal Society B. Biological Sci* 274: 1539-1546. doi:/10.1098/rspb.2007.0305
- Sobhy IS, Goelen T, Herrera-Malaver B et al. (2019) Associative learning and memory retention of nectar yeast volatiles in a generalist parasitoid. *Animal Behaviour* 153: 137-146. doi: 10.1016/j.anbehav.2019.05.006
- Takasu K & Lewis WJ (2003) Learning of host searching cues by the larval parasitoid *Microplitis croceipes*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 108: 77-86. doi: 10.1046/j.1570-7458.2003.00070.x
- Takemoto H, Powell W, Pickett J et al. (2009) Learning is involved in the response of parasitic wasps *Aphidius ervi* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae) to volatiles from a broad bean plant, *Vicia faba* (Fabaceae), infested by aphids *Acyrthosiphon pisum* (Harris) (Homoptera: Aphididae). *Applied Entomology and Zoology* 44(1): 23-28. doi: 10.1303/aez.2009.23
- Tertuliano M, Olson DM, Ragutins GC & Lewis WJ (2004). Influence of handling and conditioning protocol on learning and memory of *Microplitis croceipes*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 110 :165-172. doi: 10.1111/j.0013-8703.2004.00132.x
- Thiel A, Hoffmeister TS. Chapter 2. Decision-making dynamics in parasitoids of *Drosophila*. In G. Prevost (Ed.), *Advances in parasitology* (Vol. 70, pp.45e66). London, U.K.: Academic Press, 2008. Doi: 10.1016/S0065-308X (09)70002-8
- Tognon R, Sant'ana J & Jahnke SM (2013) Aprendizagem e memória de *Telenomus podisi* (Hymenoptera, Platygasteridae). *Iheringia Série Zoologia*. 103: 266-271. doi: 10.1590/S0073-47212013000300009
- Tognon R, Sant'Ana, Redaelli LR & Meyer AL (2018) Is it possible to manipulate Scelionidae wasps' preference to a target host? *Neotropical Entomology* 47: 689-697. doi: 10.1007/s13744-018-0607-6
- Turlings TCJ & Erb M (2018) Tritrophic interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: Mechanism, Ecological Relevance, and Application Potential. *Annual Review of Entomology* 63: 433-452. doi: 10.1146/annurev-ento-020117-043507
- Turlings TCJ et al. Learning of host-finding cues by hymenopterous parasitoids. In: Papaj DR.; Lewis AC. (Eds.). *Insect Learning: ecological and evolutionary perspectives*. New York: Chapman & Hall, p. 51-78, 1993. doi: 10.1007/978-1-4615-2814-2\_3
- Vargas CC, Redaelli LR, Sant'Ana J et al. (2017) Influência da idade do hospedeiro e da aprendizagem no comportamento quimiotáxico e no parasitismo de

- Trichogramma pretiosum*. *Iheringia, Série Zoologia* 107: 1-7. doi: 10.1590/1678-4766e2017015
- Vet LEM, Lewis WJ & Cardé RT. Parasitoid foraging and learning. In: Cardé, R. T.; Bell, W. J. *Chemical ecology of insects 2*. New York: Chapman & Hall, 1995. p. 65-101. doi: 10.1007/978-1-4615-1765-8\_3
- Zadra WC, Sant'ana J, Redaelli LR & Tognon R (2018) Plasticidade da aprendizagem de *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) associada a voláteis de frutos e óleos essenciais. *Iheringia, Serie Zoologia* 108: 1-9. doi : 10.1590/1678-4766e2018026
- Zhang Y, Ren Y, Wang X et al. (2019) Responses to host plant volatiles and identification of odorant binding protein and chemosensory protein genes in *Bradysia odoriphaga*. *ACS Omega* 4(2): 3800-3811. doi: 10.1021/acsomega.8b03486
- Yoneya K, Uefune M & Takabayashi J (2018) Parasitoid wasp' exposure to host-infested plant volatiles affects their olfactory cognition of host-infested plants. *Animal Cognition* 21: 79-86. doi: 10.1007/s10071-017-1141-3

FIGURE 1. Chemotactic responses of *Aganaspis pelleranoi* females (pre-imaginal conditioning) from *Anastrepha fraterculus* larvae reared (A) only on artificial diet or (B) on apple, tested in two-choice olfactometer submitted to apple (IA, UA) or guava volatiles (IG, UG) (infested or uninfested). Numbers on the bars represent the responsive insects. Bars followed by asterisks differ significantly (GLM: binomial distribution;  $P < 0.05$ ).

FIGURE 2. Chemotactic responses of *Aganaspis pelleranoi* females (imaginal conditioning) from *Anastrepha fraterculus* larvae reared on artificial diet previously exposed to apple substrate for 24 or 48 hours, tested in two-choice olfactometer. Adults were submitted to apple (IA) or guava volatiles (IG) (infested). Numbers on the bars represent the responsive insects. Bars followed by asterisks differ significantly (GLM: binomial distribution;  $P < 0.05$ ).

FIGURE 3: Chemotactic responses of *Aganaspis pelleranoi* females from *Anastrepha fraterculus* larvae reared on artificial diet, previously exposed to apple substrate for 48 hours, and tested for a period of 1, 12 and 24 hours after imaginal conditioning in two-choice olfactometer submitted to apple (IA) or guava volatiles (IG) (infested). Numbers on the bars represent the responsive insects. Bars followed by asterisks differ significantly (GLM: binomial distribution;  $P < 0.05$ ).

Table 1. Mean number ( $\pm$  SE) of parasitized pupae of *Anastrepha fraterculus* by *Aganaspis pelleranoi*, emerged parasitoid, and emergence of fruit flies in three types of parasitism units (brushed with distilled water, guava or apple pulp) offered simultaneously to the parasitoid from pre-imaginal conditioning on apple, from imaginal conditioning on apple (during 24 or 48 hours) or inexperienced (from artificial diet).

Table 2. Mean number ( $\pm$  SE) of pupae of *Anastrepha fraterculus*, and emergence of *Aganaspis pelleranoi* in four types of conditioning (inexperienced [from artificial diet], pre-imaginal conditioning on apple, and imaginal conditioning on apple [during 24 or 48 hours]), and in three types of parasitism units (brushed with distilled water, guava or apple pulp) <sup>(1)</sup>

FIGURE 1

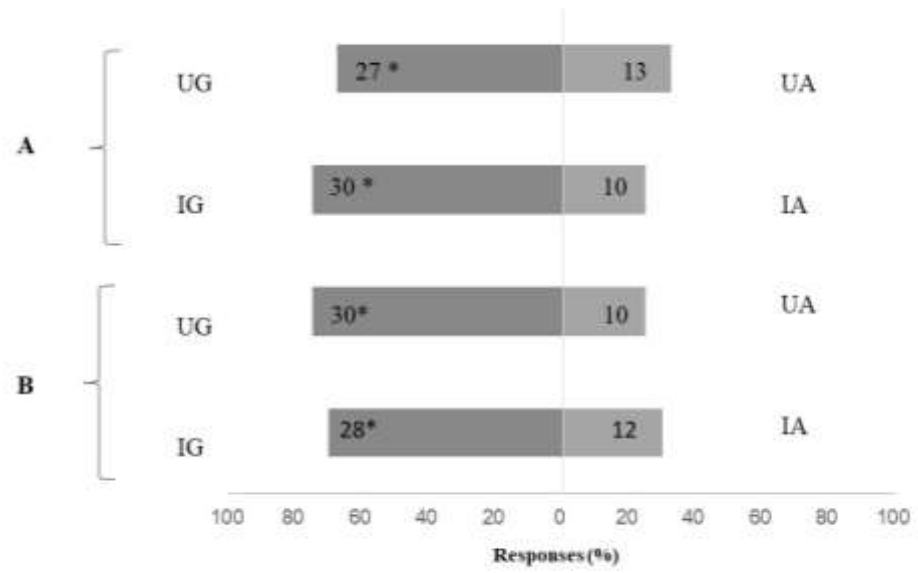


FIGURE 2

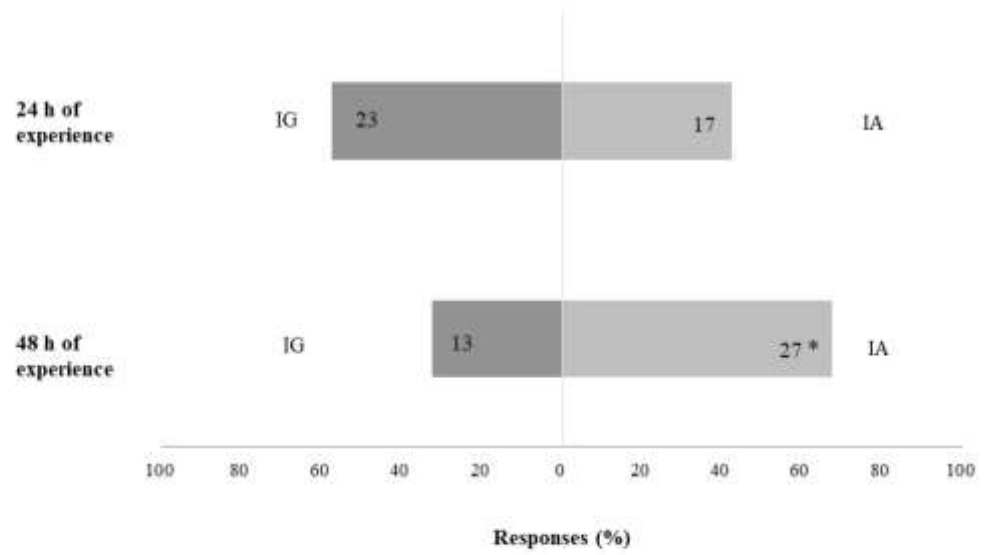


FIGURE 3

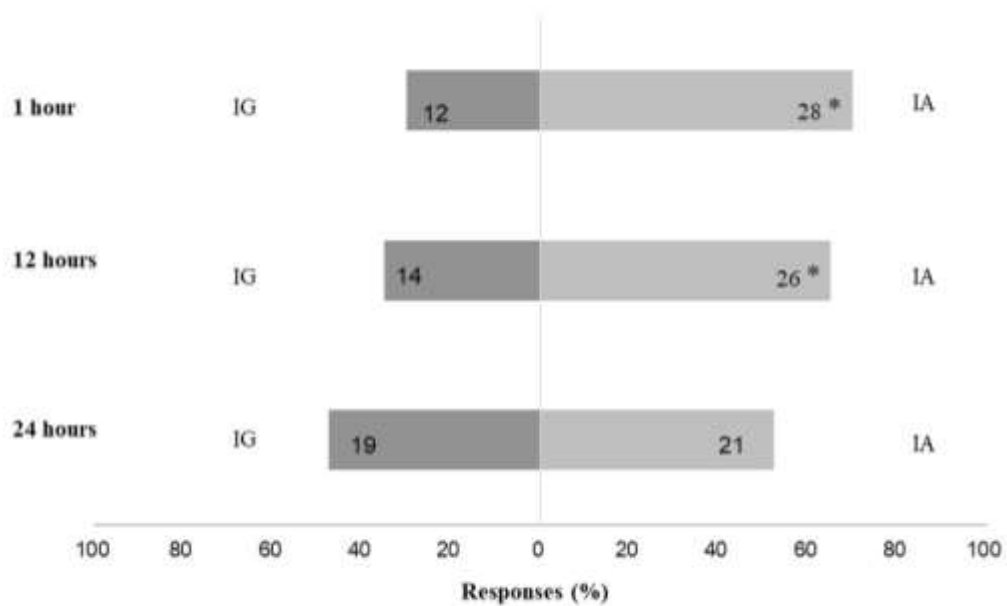


Table 1.

Type of conditioning (conditioning time in hours)	Parasitism unit		
	Water	Guava	Apple
<b>Parasitized pupae<sup>(*)</sup></b>			
Inexperienced	3.23 ± 0.270 Ba	4.95 ± 0.335 Aa	3.50 ± 0.282 Bb
Pre-imaginal	2.08 ± 0.217 Bb	4.80 ± 0.330 Aa	4.83 ± 0.331 Aa
Imaginal (24)	3.05 ± 0.263 Ba	3.27 ± 0.272 Bb	4.33 ± 0.313 Aab
Imaginal (48)	2.48 ± 0.237 Bab	3.10 ± 0.265 Bb	5.28 ± 0.346 Aa
<b>Emerged fruit flies</b>			
Inexperienced	5.88 ± 0.298 Aa	4.10 ± 0.249 Bb	5.55 ± 0.290 Aa
Pre-imaginal	6.75 ± 0.319 Aa	4.40 ± 0.258 Bb	4.38 ± 0.257 Bab
Imaginal (24)	6.15 ± 0.305 Aa	5.90 ± 0.299 ABa	5.08 ± 0.277 Bbc
Imaginal (48)	6.60 ± 0.316 Aa	5.92 ± 0.299 Aa	3.88 ± 0.242 Bc

Means followed by the same capital letter (in the same row) and lower-case letter (in the same column) do not differ statistically among themselves by contrasts generated by the model (GLM: quasipoisson distribution;  $P < 0.05$ ).

(\*) Emerged parasitoids + dissected pupae with parasitoids



Table 2.

Variable	Type of conditioning (conditioning time in hours)			
	Inexperienced	Pre-imaginal	Imaginal (24)	Imaginal (48)
Pupae	9.77 ± 0.063 A	9.47 ± 0.062 B	9.71 ± 0.063 A	9.59 ± 0.063 AB
Emerged parasitoid	2.11 ± 0.183 A	1.37 ± 0.152 B	2.33 ± 0.190 A	2.12 ± 0.187 A
	Parasitism unit			
	Water	Guava	Apple	
Pupae	9.61 ± 0.054 A	9.62 ± 0.054 A	9.68 ± 0.055 A	
Emerged parasitoid	1.32 ± 0.127 B	2.33 ± 0.165 A	2.40 ± 0.168 A	

Means followed by the same letter in the row for type of conditioning and for parasitism unit do not differ statistically among themselves by contrasts generated by the model (GLM: quasipoisson distribution;  $P < 0.05$ ).

<sup>(1)</sup> The factors type of conditioning and parasitism unit are represented separately due to the absence of interaction between them, which means that they have no effect on each other.

## 5 ARTIGO 3

Impacto do condicionamento pré-imaginal e imaginal na memória olfativa de *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) a voláteis de frutos

Impacto do condicionamento pré-imaginal e imaginal na memória olfativa de *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) a voláteis de frutos

Patricia Daniela da Silva Pires, Josué Sant'Ana, Luiza Rodrigues Redaelli, Natália Alves Leite

<sup>1</sup>Departamento de Fitossanidade, PPG-Fitotecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 7712, 91540-000 Porto Alegre, RS, Brasil.

<http://orcid.org/0000-0003-4831-591X> (Patricia)

<https://orcid.org/0000-0001-8548-5390> (Josué)

<http://orcid.org/0000-0002-6418-1176> (Luiza)

<https://orcid.org/0000-0002-5597-7076> (Natalia)

Corresponding author:

Email address: [patidpires@gmail.com](mailto:patidpires@gmail.com)

## Resumo

Parasitoides utilizam pistas químicas associadas ao hospedeiro e seu habitat durante o forrageamento. A percepção a estes odores pode ser modificada através de experiência tanto no estágio imaturo como no imago ou em ambos. Apesar de *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera, Braconidae) ser importante inimigo natural de tefritídeos, pouco se sabe sobre o impacto que o tipo de condicionamento tem em sua memória olfativa a voláteis de frutos. Este estudo investigou a influência do condicionamento pré-imaginal e imaginal na aprendizagem e memória olfativa de fêmeas de *D. longicaudata* oriundas de larvas de *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) mantidas em dieta artificial, goiaba ou maçã, assim como de adultos expostos a estes odores através de bioensaios de olfatometria e parasitismo. Fêmeas que emergiram de larvas criadas em dieta artificial e cujos adultos não tiveram contato com voláteis dos frutos, não distinguiram odores de maçã e goiaba e parasitaram as três unidades de parasitismo. Nos testes de olfatometria, fêmeas oriundas do condicionamento pré-imaginal mantiveram sua memória olfativa por até 11 dias. Nos adultos, a memória olfativa se manteve por até 24 horas, quando condicionados aos voláteis de goiaba e maçã por 72 horas. Nos testes de parasitismo, a emergência dos parasitoides foi maior quando oriundos do condicionamento pré-imaginal e testados após 4 dias nos frutos em que tiveram experiência prévia. O condicionamento pré-imaginal aos voláteis de frutos otimiza a busca de *D. longicaudata* por hospedeiros e pode ser utilizado para incrementar o controle biológico de tefritídeos no campo.

**Key words:** Hymenoptera, learning, memory, parasitoids, fruits volatiles, olfactory cues

## Introdução

A aprendizagem está associada com a capacidade dos insetos modularem a percepção química de acordo com suas interações com o habitat, aumentando as chances de sobrevivência (Gadenne et al. 2016; Little et al. 2019). De modo geral, espécies que habitam locais heterogêneos e/ou que têm uma ampla gama de hospedeiros, possuem uma maior plasticidade olfativa, ou seja, maior capacidade de modular o comportamento quimiotático em função de estímulos químicos presentes no ambiente (Gadenne et al. 2016). Contudo, a percepção química pode variar de acordo com fatores abióticos, assim como em função das características intrínsecas, como idade, alimentação, ritmo circadiano, status de acasalamento e fase de desenvolvimento do inseto, podendo também estar relacionada ao tipo, frequência e intensidade do estímulo recebido (Gadenne et al. 2016). Estes fatores, em conjunto, vão influenciar a capacidade de reter as informações adquiridas, desencadeando diferentes períodos de memória (Kandel 2001; Dudai 2002). Desta forma, a aprendizagem e a memória podem ser dependentes tanto de características fisiológicas do inseto, como de fatores ambientais (bióticos e abióticos) os quais podem induzir uma mudança de comportamento através da experiência (Gadenne et al. 2016).

O processo de busca de parasitoides compreende a percepção de uma série de estímulos associados ao hospedeiro e seu habitat e envolve pistas visuais, táteis e olfativas (Vinson 1976; Benelli et al. 2013; Canale et al. 2014). O comportamento de busca, no entanto, pode ser modificado através da experiência, podendo resultar em aprendizagem (Vet et al. 1995; Vinson 1998). Esta pode ocorrer tanto no estágio imaturo (condicionamento pré-imaginal) e manifestar-se no adulto, como no imago (condicionamento imaginal) ou mesmo em ambos (Corbet 1985; Turlings et al. 1993). A aprendizagem em braconídeos já foi constatada na fase imatura (Zadra et al. 2018; Pires et al. 2021), na emergência (Takemoto et al. 2009; 2012) e durante o período de vida adulta (Canale et al. 2014; Giunti et al. 2016; Masry et al. 2018, 2019), podendo ocorrer quando os parasitoides são submetidos a estímulos odoríferos de outras espécies, como os voláteis de plantas induzidos pela herbivoria (VPIHs) (Giunti et al. 2015; Derijk et al. 2018)

Os voláteis liberados por plantas sob o ataque de herbívoros são importantes pistas químicas utilizadas por inimigos naturais no comportamento de busca de seus hospedeiros (Aljbory e Chen 2018). Quando o inseto herbívoro consome a planta, ativa genes de defesa que são responsáveis pela produção de compostos metabólicos secundários como álcoois, aldeídos, terpenoides, voláteis de folhas verdes e

compostos aromáticos (Dicke 2009). Insetos que parasitam larvas carpófagas, como algumas espécies de braconídeos, necessitam encontrar o habitat (pomar) e na sequência o micro-habitat de seu hospedeiro (fruto), para tanto respondem a estímulos químicos e visuais da planta (Vinson 1976; Turlings et al. 199; Fatouros et al. 2005; Segura et al. 2007; 2012; 2016).

Braconídeos são considerados os mais eficazes inimigos naturais de tefritídeos (Silva et al. 2007). Dentre estes, destaca-se a *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) a qual, devido a facilidade de criação, multiplicação e pouca especificidade com o hospedeiro, tem sido utilizada em programas de controle de várias espécies de *Anastrepha* e/ou *Ceratitis capitata* (Wiedemann) em diversas regiões do mundo (Sivinski et al. 1996; Montoya et al. 2000; Alvarenga et al. 2005; Mohamed et al. 2008; Ovruski et al. 2011; Vargas et al. 2012; Suárez et al. 2019). Este parasitoide oviposita no último ínstar larval da mosca e completa seu desenvolvimento no estágio pupal do hospedeiro (Gonçalves et al. 2013).

Apesar da importância deste parasitoide no contexto agrícola, ainda são restritos os estudos associados aos fatores envolvidos na busca por hospedeiros, como o tipo de condicionamento, aprendizagem e memória olfativa. Pires et al. (2021) observaram que fêmeas de *D. longicaudata* condicionadas durante o período pré-imaginal em larvas de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) alimentadas com goiaba ou maçã foram mais responsivas a esses odores, tanto em ensaios de olfatometria, quanto de parasitismo. Resultados semelhantes foram observados por Zadra et al. (2018), os quais verificaram que indivíduos dessa mesma espécie oriundos de larvas do mesmo díptero mantidas em goiaba, foram mais atraídos a esses voláteis quando contrastado com os de manga, modificando a sua preferência inata. O condicionamento imaginal de fêmeas de *D. longicaudata* foi constatado por Segura et al. (2016). Segundo esses autores, adultos condicionados por um período de seis horas durante três dias consecutivos à polpa de maçã associada à presença de larvas de *C. capitata*, passaram a preferir esse odor em detrimento aos odores de laranja (resposta inata) por pelo menos 24 horas. Fêmeas de *D. longicaudata* também foram capazes de modificar a sua resposta olfativa a odores não relacionados ao hospedeiro ou seu habitat, ou seja, quando expostas ao óleo essencial de baunilha por um período de quatro horas foram capazes de reconhecer esse odor e mantiveram uma memória olfativa de até 24 horas (Zadra et al. 2018).

A plasticidade olfativa associada à aprendizagem e memória faz parte das estratégias de sobrevivência dos parasitoides a qual aumenta a aptidão destes organismos ao meio. As mudanças comportamentais de acordo com o tipo de condicionamento (pré-imaginal e/ou imaginal) têm sido

investigadas em alguns grupos de insetos parasitoides (Benelli e Canale 2012; Canale et al. 2014; Tognon et al. 2018; Monsia et al. 2019), inclusive em *D. longicaudata* (Segura et al. 2016; Zadra, et al. 2018; Pires et al. 2021). No entanto, pouco se sabe sobre o impacto do tipo de condicionamento na memória olfativa de parasitoides, principalmente os de larvas carpófagas. O aumento do conhecimento de fatores envolvidos no processo de busca desses insetos pode auxiliar estratégias de controle através do condicionamento olfativo de parasitoides em programas de controle biológico, ampliando o impacto positivo destes organismos em agroecossistemas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi comparar a influência do condicionamento pré-imaginal e imaginal e avaliar o impacto destes na memória olfativa de *D. longicaudata* a voláteis de goiaba vermelha (*Psidium guajava* L.) e de maçã (*Malus domestica* Borkh) em bioensaios de olfatosmetria e parasitismo.

## **Material e métodos**

### **Criação do hospedeiro e do parasitoide**

As criações de *A. fraterculus* e *D. longicaudata* foram realizadas conforme metodologia descrita por Pires et al. (2021), em ambiente controlado ( $25 \pm 1$  °C;  $60 \pm 10$  % UR; 14L:10E). As larvas de moscas foram mantidas em dieta artificial contendo cenoura (500 g), farinha de milho (300 g), açúcar (250 g), gérmen de trigo (50 g), ácido cítrico (7,2 g), benzoato de sódio (2,2 g), nipagin (2,2 g) e água destilada (350 mL) (Meirelles et al. 2016).

Diariamente, foram oferecidas unidades de parasitismo contendo aproximadamente 100 larvas de terceiro ínstar de *A. fraterculus* por cerca de meia hora. As unidades de parasitismo foram preparadas utilizando uma tampa de Gerbox com abertura circular protegida por voile de acordo com metodologia descrita por Meirelles et al. (2016).

### **Condicionamento pré-imaginal de *D. longicaudata***

Goiabas (*P. guajava*) cv. Paluma (Myrtaceae) e maçãs (*M. domestica*) cv. Red delicious (Rosaceae) foram utilizadas para criar as larvas hospedeiras a serem ofertadas ao parasitoide. As frutas foram higienizadas com hipoclorito de sódio (0,5%) por aproximadamente 30 min. As cascas foram perfuradas e parte das polpas removidas. As frutas foram infestadas com 50 larvas de *A. fraterculus* de

2º ínstar (cinco dias de idade) oriundas de dieta artificial. Após, foram colocadas em potes plásticos (500 mL), recobertos com tecido voile, onde permaneceram até atingirem o 3º ínstar (48 horas) em ambiente controlado ( $25 \pm 1$  °C;  $60 \pm 10$  % UR; sem fotofase). Essa infestação artificial foi realizada para padronizar o número e a idade larval do hospedeiro. As larvas foram retiradas e expostas a *D. longicaudata* em unidades de parasitismo por uma hora. Posteriormente, as larvas foram acondicionadas em potes plásticos com areia até a emergência dos parasitoides ou das moscas. As moscas foram descartadas e os parasitoides que emergiram das larvas que se alimentaram desses frutos foram mantidos com dieta à base de mel e água até as fêmeas serem utilizados nos testes de olfatométrica e parasitismo.

#### **Condicionamento imaginal de *D. longicaudata***

Para o condicionamento dos adultos, utilizou-se um substrato hemisférico (3,5 cm de diâmetro) confeccionado com ágar (1,25 g), água destilada (25 mL) e polpa de fruta (20 mL) (goiaba ou maçã), adaptado de Gregório et al. (2015). Foram separados grupos de seis casais (três dias após emergência) de *D. longicaudata* oriundos da criação do hospedeiro em dieta artificial. Os insetos foram colocados em contato com dois substratos de mesma polpa (goiaba ou maçã), sobre uma placa de Petri de vidro (5 cm de diâmetro) por 24, 48 e 72 horas em ambiente controlado ( $25 \pm 1$  °C;  $60 \pm 10$  % UR; 14L:10E), sendo posteriormente mantidos com dieta à base de mel e água até o início dos bioensaios.

#### **Bioensaios de olfatométrica**

Foram avaliadas as respostas quimiotáticas de *D. longicaudata*, após os condicionamentos imaginal e pré-imaginal, a odores de maçã infestada com 50 larvas de *A. fraterculus* versus goiaba infestada nas mesmas condições. Ambos os frutos foram utilizados nos bioensaios 48 horas após a infestação artificial com o herbívoro. Nos testes de condicionamento imaginal (por 24, 48 e 72 horas), as respostas de *D. longicaudata* foram registradas 1, 24 e 48 horas após cada tempo de condicionamento. O condicionamento pré-imaginal foi avaliado em fêmeas de diferentes idades, ou seja, 4-6, 8, 9, 10, 11 e 12 dias após a emergência. Como controle, foram utilizadas fêmeas (4-6 dias de idade) inexperientes, ou seja, provenientes de larvas de *A. fraterculus* que se alimentaram de dieta artificial e não tiveram contato com os odores de frutas.

Todos os bioensaios foram conduzidos com olfatômetro de dupla escolha do tipo “Y”, o qual consistia em um tubo de vidro de 6,5 cm de diâmetro, 21 cm de arena inicial e 10 cm em cada braço



acoplado a uma câmara de vidro (29,5 cm altura x 12,5 cm diâmetro). Um fluxo de ar, previamente filtrado com carvão ativo, foi conduzido para dentro do sistema com o auxílio de uma bomba de ar conectada a um fluxímetro e um umidificador, a uma taxa de 0,6 L/min. A posição dos braços do olfatômetro contendo os estímulos foram alteradas a cada cinco repetições para evitar vieses posicionais. O olfatômetro, a câmara de vidro e os frutos foram trocados a cada dez repetições, lavados com detergente neutro, álcool etílico e água destilada e secos em estufa de esterilização a 150 °C. Antes do início dos experimentos as fêmeas foram individualizadas, aclimatadas por 30 minutos na sala de testes e inseridas individualmente na arena. A permanência dos parasitoides em um dos braços por pelo menos 30 segundos foi considerada como “primeira escolha”. Insetos que não escolheram nenhum dos braços em 5 min foram registrados como não responsivos. Cada parasitoide foi usado apenas uma vez para evitar o aprendizado associativo. Os bioensaios foram conduzidos em sala climatizada ( $25 \pm 1$  °C,  $70 \pm 10\%$  UR e luz incandescente acesa 60 W, luminância 290 lux) entre às 10 e 15 horas. Os testes foram realizados até se obter 40 fêmeas responsivas/tratamento.

### **Parasitismo**

Nos bioensaios associados ao condicionamento imaginal foram utilizadas fêmeas de *D. longicaudata* de quatro (24 horas de condicionamento em goiaba) e cinco dias de idade após a emergência, todas as fêmeas foram testadas uma hora após o período de condicionamento. Para os parasitoides oriundos do condicionamento pré-imaginal (em goiaba e maçã) foram usadas fêmeas com idades de 4-6 e 12 dias após a emergência. Essas escolhas de idade e tempo de exposição, tiveram como base o tempo mínimo em que foi observada uma mudança de comportamento nos testes de olfatometria para cada tipo de condicionamento. Também foram avaliadas fêmeas com quatro dias de idade provenientes de larvas de *A. fraterculus* que se alimentaram de dieta artificial e não tiveram contato com os odores de frutas (tanto na fase jovem, como na adulta), sendo essas consideradas o tratamento controle.

As fêmeas foram expostas individualmente em uma arena plástica (29 x 12 cm) vedada com tecido voile, com chance de escolha a três unidades de parasitismo (Meirelles et al. 2016) pinceladas com polpa fresca de maçã ou goiaba, ou somente água destilada. Em cada unidade foram colocadas 10 larvas de *A. fraterculus* de 3º ínstar, oriundas de dieta artificial e em seguida uma fêmea de *D. longicaudata* de cada tratamento foi liberada e permaneceu neste sistema por 1 hora, conforme metodologia de Altafini et al. (2013). Após este período, as larvas foram colocadas em potes plásticos de 50 mL contendo areia e

mantidos em câmara climatizada ( $25 \pm 1$  °C;  $60 \pm 10$  % UR; sem fotofase), até a emergência de parasitoides ou moscas. O delineamento do bioensaio foi inteiramente casualizado e cada fêmea (inexperiente ou condicionada) foi exposta ao conjunto de três unidades de parasitismo, sendo realizadas 40 repetições/tratamento. Foi registrado o número de pupas formadas de *A. fraterculus*, pupários parasitados (parasitoides emergidos + pupário dissecado com presença de parasitoides) e parasitoides e moscas que emergiram.

### **Análises Estatísticas**

Todas as análises foram feitas utilizando Modelos Lineares Generalizados (MLGs) no software R 4.0.0 (RStudio 2020). Nos bioensaios de olfatométrica, a frequência de escolha do parasitoide em cada braço do olfatômetro foi considerada uma variável resposta binomial. Os dados de todas as variáveis dos bioensaios de parasitismo se ajustaram à distribuição de quase-poisson. Os dados dos parasitoides que tiveram experiência em goiaba e maçã, dos bioensaios de parasitismo, foram analisados em esquema fatorial de três tipos de condicionamento (pré-imaginal com quatro dias, pré-imaginal com 12 dias e imaginal) por três unidades de parasitismo (água, goiaba e maçã). Para avaliar a qualidade do ajuste do modelo aos dados, foi utilizado um envelope simulado meio normal (pacote hnp) (Moral et al. 2017). As médias foram comparadas por contrastes do modelo escolhido ( $P < 0,05$ ), utilizando a função CLD (compact letter display) (Piepho 2004) dos pacotes emmeans (Russel 2020) e multcompView (Graves et al. 2019).

## **Resultados**

### **Olfatométrica**

A quimiotaxia de fêmeas inexperientes de *D. longicaudata* foi semelhante quando submetidas ao contraste entre os voláteis de goiaba (52, 5%) e os de maçãs infestadas (47,5%) ( $\chi^2_{1,78} = 0,05$ ;  $P = 0,823$ ). Contudo, as oriundas de larvas que se desenvolveram na goiaba (condicionamento pré-imaginal) passaram a preferir odores deste fruto infestado e não modificaram este comportamento até o 11º dia de vida, quando não mais diferenciaram estes odores (Fig. 1A). Fêmeas oriundas de larvas de *A. fraterculus* que se alimentaram de maçã, foram mais responsivas aos voláteis deste fruto até os 11 dias de idade, não os diferenciando dos de goiaba no 12º dia de vida (Fig. 1B).

As fêmeas de *D. longicaudata* oriundas de larvas criadas em dieta artificial, condicionadas por 24, 48 e 72 horas nos substratos de goiaba foram mais atraídas pelos voláteis da goiaba infestada (Fig. 2A). Esse comportamento foi constatado por até 24 horas após o condicionamento imaginal, não havendo mais distinção entre os dois odores (maçã e goiaba) a partir de 48 horas (Fig. 2A). As fêmeas experientes em substratos artificiais de maçã por um período de 24 horas, não distinguiram entre os voláteis de frutos de goiaba e maçã infestados (Fig. 2B). Quando o tempo de exposição foi de 48 horas, estas foram mais atraídas para os voláteis de maçã, voltando ao seu comportamento inato após 24 horas (Fig. 2B). A exposição deste parasitoide a este substrato por 72 horas aumentou a memória olfativa para até 24 horas (Fig. 2B).

### Parasitismo

Para fêmeas inexperientes de *D. longicaudata*, o número de pupários parasitados ( $F_{2,117} = 0,563$ ,  $P = 0,571$ ) e parasitoides emergidos ( $F_{2,117} = 0,104$ ,  $P = 0,901$ ) foi semelhante entre as unidades de parasitismo pinceladas com água, polpa de maçã ou goiaba. O número de pupas formadas ( $F_{2,117} = 0,144$ ,  $P = 0,866$ ) e moscas emergidas ( $F_{2,117} = 0,735$ ,  $P = 0,482$ ) também não diferiu entre as unidades (Fig. 3).

Para os insetos condicionados em goiaba houve interação entre os tipos de condicionamento e as unidades de parasitismo para as variáveis pupários parasitados ( $F_{4,351} = 10,02$ ,  $P < 0,001$ ), parasitoides emergidos ( $F_{4,351} = 9,04$ ,  $P < 0,001$ ) e moscas emergidas ( $F_{4,351} = 23,73$ ,  $P < 0,001$ ). Contudo, não houve interação para as pupas de *A. fraterculus* formadas ( $F_{4,351} = 0,183$ ,  $P = 0,947$ ). Assim, o número médio de pupas não diferiu entre as unidades de parasitismo ( $F_{2,357} = 0,026$ ,  $P = 0,974$ ) e foi em média ( $\pm$  EP) de 9,73 ( $\pm 0,052$ ) na água, 9,74 ( $\pm 0,052$ ) na goiaba e 9,72 ( $\pm 0,052$ ) na maçã. O número médio de pupas também não diferiu entre os tipos de condicionamentos ( $F_{2,355} = 0,313$ ,  $P = 0,731$ ), sendo de 9,72 ( $\pm 0,052$ ) no condicionamento pré-imaginal com quatro dias da emergência, de 9,77 ( $\pm 0,052$ ) no pré-imaginal com 12 dias da emergência e de 9,72 ( $\pm 0,052$ ) no imaginal. O número de pupários parasitados foi maior em goiaba para os insetos com condicionamento pré-imaginal (4) e imaginal e não diferiu entre goiaba e água no pré-imaginal (12) (Tabela 1). Comparando dentro da unidade de parasitismo goiaba, o número de pupários parasitados foi maior no condicionamento pré-imaginal (4), contudo o número de parasitoides emergidos não diferiu entre esse e o imaginal (Tabela 1). O número de moscas emergidas foi menor nas unidades com polpa de goiaba, tanto no condicionamento pré-imaginal (4) como no imaginal e não diferiu entre as unidades do pré-imaginal (12). O número de moscas, dentro da unidade

goiaba, foi menor no condicionamento pré-imaginal (4) e maiores no pré-imaginal (12) e no imaginal (Tabela 1).

Para os insetos condicionados em maçã houve interação entre os tipos de condicionamento e as unidades de parasitismo para as variáveis pupários parasitados ( $F_{4,351} = 10,21$ ,  $P < 0,001$ ), parasitoides emergidos ( $F_{4,351} = 10,41$ ,  $P < 0,001$ ) e moscas emergidas ( $F_{4,351} = 17,23$ ,  $P < 0,001$ ). Entretanto, não houve interação para as pupas de *A. fraterculus* formadas ( $F_{4,351} = 0,532$ ,  $P = 0,713$ ). Assim, o número de pupas não diferiu entre as unidades de parasitismo ( $F_{2,357} = 0,129$ ,  $P = 0,879$ ) e foi em média ( $\pm$  EP) de 9,78 ( $\pm 0,048$ ) na água, 9,75 ( $\pm 0,048$ ) na goiaba e 9,76 ( $\pm 0,048$ ) na maçã. O número médio de pupas também não diferiu entre os tipos de condicionamentos ( $F_{2,355} = 0,070$ ,  $P = 0,933$ ), sendo de 9,77 ( $\pm 0,048$ ) no condicionamento pré-imaginal com quatro dias da emergência, de 9,77 ( $\pm 0,048$ ) no pré-imaginal com 12 dias da emergência e de 9,75 ( $\pm 0,048$ ) no imaginal. O número de pupários parasitados e o número de parasitoides emergidos foi maior em maçã para os insetos com condicionamento pré-imaginal (4) e imaginal e não diferiu entre as unidades no pré-imaginal (12) (Tabela 2). Comparando dentro da unidade de parasitismo maçã, o número de pupários parasitados foi maior nos condicionamentos pré-imaginal (4) e imaginal, porém o número de parasitoides emergidos somente foi maior no condicionamento pré-imaginal (4) (Tabela 2). O número de moscas emergidas foi menor nas unidades com polpa de maçã tanto no condicionamento pré-imaginal (4) como no imaginal e não diferiu entre as unidades no pré-imaginal (12). Todavia, dentro da unidade maçã, esse número foi maior no pré-imaginal (12), seguido do imaginal e menor no pré-imaginal (4) (Tabela 2).

### **Discussão**

Fêmeas inexperientes de *D. longicaudata* não distinguiram os voláteis de frutos de maçã e goiaba nos bioensaios de olfatométria e parasitismo. Os resultados possivelmente estão associados ao comportamento generalista deste parasitoide o qual utiliza voláteis de uma variedade frutos para localização de larvas de tefritídeos, como constatado para laranja, manga, goiaba, maçã, preferindo frutos infestados aos não infestados (Silva et al. 2007; Segura et al. 2012; Zadra et al. 2018; Harbi et al. 2019, Pires et al. 2021). Segundo Vet et al. (1992), quanto mais o estímulo estiver associado à presença do hospedeiro, maior a sua confiabilidade e, conseqüentemente, mais utilizado será pelo parasitoide, resultando em maiores taxas de sobrevivência.

A percepção aos voláteis de frutos está relacionada a um sistema sensorial sofisticado dos insetos constituído por proteínas de ligação hidrossolúveis, tais como as odoríferas de ligação (POLs), que transportam moléculas até os receptores ligados à membrana dos neurônios sensoriais, o que geralmente resulta na geração de potenciais de ação, desencadeando respostas comportamentais dos insetos (Leal 2013). Wulff et al. (2021) identificaram diferentes proteínas que atuam no sistema sensorial de *D. longicaudata*, ou seja, quatorze tipos diferentes de POLs, sete de proteínas quimiorreceptoras e quatro do tipo NPC2. Desta forma, do ponto de vista fisiológico, a similaridade de respostas entre fêmeas inexperientes observadas neste estudo, pode estar associada tanto à diversidade de proteínas odoríferas, as quais têm afinidade com diversos voláteis de plantas induzidos pela herbivoria (VIPHs), quanto pela similaridade de VIPHs emitidos por maçã e goiaba (Bengtsson et al. 2001; Quijanoy e Pino 2007). Além destes fatores, as respostas semelhantes nas taxas de parasitismo também podem ter ocorrido em decorrência da habilidade de fêmeas de *D. longicaudata* em detectar voláteis de larvas de tefritídeos, sem a presença de substrato de alimentação, indicando que esses odores também servem como pistas químicas a curtas distâncias ou mesmo por contato (Biancheri et al. 2019).

A busca do hospedeiro pelo parasitoide ocorre de maneira inata, mas pode ser modificada através do condicionamento (experiência) podendo resultar em uma aprendizagem (Vinson 1998), a qual otimiza a eficiência de forrageamento (Dukas e Bernays 2000). Neste trabalho observamos que *D. longicaudata* foi capaz de modificar sua quimiotaxia e intensificar as taxas de parasitismo após o condicionamento pré-imaginal em larvas de *A. fraterculus* que se desenvolveram tanto em frutos de goiaba, quanto nos de maçã, mantendo a memória a estes odores por até 11 dias.

Os parasitoides podem aprender a reconhecer pistas químicas associadas com a planta hospedeira tanto durante o condicionamento larval (experiência pré-imaginal) ou mesmo na fase adulta (experiência imaginal) (Rojas e Wyatt 1999). O princípio de seleção de hospedeiro de Hopkins (PSHH) sugere que experiências durante a fase larval podem afetar as respostas comportamentais aos sinais químicos na fase adulta (Hopkins 1917; Denker et al. 2010). Esta retenção da memória está relacionada a preservação de neurônios larvais responsáveis pela percepção de odores durante a metamorfose, os quais irão intervir no comportamento dos adultos (Lee et al. 1999; Oswald et al. 2015; Eichler et al. 2017).

A aprendizagem através do condicionamento pré-imaginal (PSHH) já foi observada em diversos grupos, tais como, moscas (Gregório et al. 2015), mariposas (Sant'Ana e Gregório 2016), coleópteros (Chen et al. 2019), neurópteros (De Oliveira et al. 2019) e himenópteros (Gandolfi et al. 2003; Tognon

et al. 2016; 2017). Contudo, poucos estudos registraram o efeito da dieta do hospedeiro em relação ao comportamento desta espécie. Dentre estes, o trabalho conduzido por Zadra et al. (2018), fêmeas de *D. longicaudata* oriundas de larvas de *A. fraterculus* que se desenvolveram em goiaba e manga não diferenciaram estes odores após o condicionamento pré-imaginal nestes frutos, entretanto, ao contrário do nosso estudo, os autores não avaliaram a resposta do parasitoide a frutos infestados e sim a pedaços de frutos sem a presença do hospedeiro. Fêmeas de *D. longicaudata* oriundas de larvas mantidas em maçã e goiaba também se direcionaram para odores de frutos infestados associados a dieta larval da qual emergiram (Pires et al., 2021). Segundo os autores, o parasitismo de *D. longicaudata* foi maior em unidades que continham a polpa do fruto no qual as larvas do hospedeiro se alimentaram, sendo que este mesmo fator não impactou as respostas de *A. pelleranoi*, parasitoide nativo de *A. fraterculus*.

As alterações comportamentais nas fêmeas após o condicionamento pré-imaginal provavelmente interferiram na produção de POLs e de outras proteínas associadas à percepção química de odores. De acordo com Tang et al. (2020), *D. longicaudata* apresenta genes que expressam diferentes proteínas (como as POLs) associadas ao olfato destes parasitoides, as quais podem ser quali e quantitativamente diferentes quando as vespas são oriundas de larvas de mosca-das-frutas que se alimentaram de goiaba, manga ou carambola. Os autores enfatizaram que este é um indicativo que algumas transcrições codificam POLs específicas, as quais têm a capacidade de discriminar diferentes odores em função do tipo de estímulo recebido.

Nossos resultados também evidenciaram que fêmeas de *D. longicaudata* com idade entre quatro e seis dias também modificam o seu comportamento ao serem condicionadas durante a fase adulta. Dados semelhantes foram obtidos com fêmeas de *Diachasmimorpha kraussii* (Fullaway) (Hymenoptera: Braconidae) expostas aos voláteis de nectarinas (*Prunus persica* (var. *nucipersica*) infestadas com larvas de *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera: Tephritidae), as quais foram mais eficazes na localização do hospedeiro do que as que não tiveram contato com o fruto (Masry et al. 2018). Também observamos que o estímulo recebido pelo contato ao substrato de maçã, ao contrário do de goiaba, não foi suficiente para que o inseto adulto processasse estas informações e mudasse de comportamento após 24 horas de condicionamento. A memória adquirida na fase adulta, independentemente do tipo de estímulo recebido, durou menos que 72 horas. Da mesma forma do verificado no condicionamento pré-imaginal, a mudança no comportamento de *D. longicaudata* exposta aos odores na fase adulta pode ter alterado a biossíntese de proteínas odoríferas. Em insetos holometábolos, os circuitos olfativos do adulto são estabelecidos,

principalmente, na fase pré-imaginal, mas também podem ocorrer alterações após a emergência (Arenas et al. 2012; Golovin e Broadie 2016).

A aprendizagem através do condicionamento de adultos já foi registrada em *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae), *Fopius arisanus* Sonan (Hymenoptera: Braconidae) (Vargas et al. 2017; Monsia et al. 2019), incluindo *D. longicaudata*. De acordo com Segura et al. (2016), fêmeas inexperientes de *D. longicaudata* foram mais atraídas aos voláteis de laranja do que aos de maçã, contudo, quando previamente condicionadas ao odor do segundo, passaram a preferir esse odor em detrimento aos do fruto de laranja. As fêmeas de *D. longicaudata* também foram capazes de aprender odores não relacionados ao seu habitat, como registrado por Zadra et al. (2018), os quais observaram que estas apresentaram uma resposta positiva aos voláteis emitidos pelo óleo de baunilha, mantendo este comportamento por até 24 horas após a exposição.

Observamos que o odor exposto (maçã ou goiaba), assim como o tipo e o período de condicionamento interferiram na aprendizagem e na memória de fêmeas de *D. longicaudata*, tanto nos testes de olfatométrica como nos de parasitismo. Também constatamos que o número de pupários parasitados foi maior em unidades contendo polpa de goiaba e maçã para os parasitoides com condicionamento pré-imaginal (avaliados após quatro dias) e imaginal, respectivamente, na presença destes frutos e não diferiram para fêmeas de *D. longicaudata* avaliadas 12 após o condicionamento pré-imaginal. Além disso, o número de pupários parasitados foi sempre menor no condicionamento pré-imaginal (12), do que nos outros tipos de condicionamento na unidade de parasitismo em que o parasitoide foi submetido.

Estes resultados vão ao encontro do constatado nos testes de olfatométrica, ou seja, foi observado um comportamento quimiotático positivo para os odores dos frutos quatro a seis dias após o condicionamento pré-imaginal, assim como após 24 (goiaba) e 48 horas (maçã) de exposição do adulto aos substratos contendo estes frutos, respectivamente. Sabe-se que a aprendizagem está diretamente relacionada a forma como o estímulo é exposto, podendo ser repetitivo e resultar em “habituação”, bloqueando a percepção, ou mesmo em “sensibilização”, ou seja, quando o período de exposição é suficiente para induzir a mudança de comportamento (Squirre e Kandel 1999; Matthews e Matthews 2010). Sendo assim, para *D. longicaudata* nós observamos que o condicionamento que resultou em maior sensibilização, gerando um maior tempo de memória, maiores taxas de parasitismo e maior emergência de parasitoides foi com insetos de quatro dias de idade condicionados na fase pré-imaginal.

A memória em insetos pode ser classificada como curta, média e longa, podendo existir simultaneamente (Menzel 1999). De acordo com o autor, a consolidação da memória pode ocorrer em diferentes períodos, isto dependerá das experiências a que o inseto é submetido e das vantagens adaptativas associadas a aprendizagem frente a um novo estímulo. Em espécies de *Drosophila*, o processo de memória apresenta cinco fases temporais distintas: aquisição ou aprendizagem; memória de curta duração, a qual decai 30 minutos após o treino; memória de média duração, a qual persiste, por aproximadamente 3 horas; memória de anestesia, que decai no prazo de quatro dias e memória de longa duração que se mantêm por mais de uma semana (Dubnau e Tully 1998). Comparando-se os resultados observados em drosófilas, poderíamos categorizar a memória de *D. longicaudata* como sendo de anestesia para o condicionamento imaginal (até 24 horas) e de longa duração, para o pré-imaginal (11 dias).

Para outras vespas parasitoides, um único evento de treinamento resultou em memória que durou algumas horas (Smid et al. 2007). Os autores observaram que fêmeas de *Cotesia glomerata* L. (Hymenoptera: Braconidae) condicionadas após um único evento aos odores de açúcar em associação aos voláteis de plantas de *Brassica oleracea* passaram a reconhecer esse odor e mantiveram esse comportamento por 24 horas. *Telenomus podisi* Ashmead (Hymenoptera: Scelionidae) condicionados aos voláteis de capim limão durante toda fase imatura alteraram a sua preferência quimiotóxica por até 72 horas (Tognon et al. 2013). Sobhy et al. (2019) ao avaliarem as respostas de fêmeas de *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae) previamente condicionadas a odores de leveduras por 24 horas, observaram que essas respostas desapareciam 48 horas após o condicionamento. Resultado semelhante ao tempo de memória de *D. longicaudata* após o condicionamento imaginal, obtido em nosso estudo, foi registrado para fêmeas de *Nasonia vitripennis* Walker (Hymenoptera: Pteromalidae), as quais após o condicionamento aos odores de canela, na presença do hospedeiro, memorizaram esse odor por até 24 horas (Schurmann et al. 2015).

Este é um dos poucos trabalhos que compara o impacto do condicionamento imaginal e pré-imaginal na aprendizagem e na memória olfativa de insetos e o primeiro realizado, neste sentido, com *D. longicaudata*. Os dados obtidos neste estudo comprovaram que é possível aumentar a percepção química de fêmeas de *D. longicaudata* a odores da planta que abriga seu hospedeiro e que, principalmente o aprendizado na fase pré-imaginal associado ao menor tempo entre o condicionamento e a liberação, pode favorecer significativamente as taxas de parasitismo, diminuindo a emergência de moscas.



A atividade quimiotática e o parasitismo em resposta ao aprendizado em diferentes fases do desenvolvimento de *D. longicaudata* estão provavelmente associados a uma vantagem adaptativa, que resultará em uma melhor aptidão e, conseqüentemente, a uma melhor performance reprodutiva e sobrevivência da espécie. Sendo assim, sugerimos que a aprendizagem de parasitoides, deva ser levada em consideração nas estratégias de criação massal em biofábricas. Investigações futuras poderão confirmar, em condições de semicampo ou campo, se esses resultados de laboratório possibilitarão o uso do condicionamento de *D. longicaudata* a odores associados a seus hospedeiros como estratégia para incrementar o controle biológico de tefritídeos.

### Agradecimentos

Nós agradecemos aos estudantes de graduação Geluse Medrado Caldasso e Nicolas Marotti Della Casa pela assistência na criação dos insetos. O apoio financeiro e as bolsas foram concedidas pela Agência Federal de Apoio e Avaliação da Pós-Graduação (CAPES) para o primeiro autor (88882.439605 / 2019-01) e quarto autor (88887.469188/2019-00) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) para o segundo (processo nº. 303758) / 2018-0) e terceiro autores (processo nº. 306626 / 2019-5). Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

### Referências

- Aljbory Z, Chen M-S (2018) Indirect plant defense against insect herbivores: a review. *Insect Sci* 25 (1): 2-23. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12436>
- Altafini DL, Redaelli LR, Jahnke SM (2013) Superparasitism of *Ceratitis capitata* and *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by *Diachasmimorpha longicaudata*. *Fla Entomol* 96 (2): 391-395. <https://doi.org/10.1653/024.096.0201>
- Arenas A, Giurfa M, Sandoz JC et al. (2012). Early olfaction experience induces structural changes in the primary olfactory center of an insect brain. *Eur J Neurosci* 35:682-690. <https://doi: 10.1111/j.1460-9568.2012.07999.x>
- Alvarenga CD, Brito ES, Lopes EM et al. (2005) Introdução e recuperação do parasitoide exótico *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae) em pomares comerciais de goiaba no norte de Minas Gerais. *Neotrop Entomol* 34 (1): 133-136. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2005000100020>
- Benelli G e Canale A. (2012) Learning of visual cues in the fruit fly parasitoid *Psytalia concolor* (Szepligeti) (Hymenoptera: Braconidae). *Biol Control* 57: 767-777. <https://doi.org/10.1007/s10526-012-9456-0>
- Benelli G, Revadi S, Carpita A et al. (2013) Behavioral and electrophysiological responses of the parasitic wasp *Psytalia concolor* (Szepligeti) (Hymenoptera: Braconidae) to *Ceratitis capitata*- induced fruit volatiles. *Biol Control* 64: 116-124. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.10.010>

- Bengtsson M, Bäckman A-C, Liblikas I et al. (2001) Plant odor analysis of apple: antennal response of codling moth females to apple volatiles during phenological development. *J Agric Food Chem* 49: 3736-3741. <https://doi.org/10.1021/jf0100548>
- Biancheri MJB, Suárez LC, Bezdjian LP et al. (2018). Response of two parasitoid species (Hymenoptera: Braconidae, Figitidae) to tephritid host and host food substrate cues. *J Appl Entomol* 1-13. <https://doi.org/10.1111/jen.12595>
- Canale A, Geri S, Benelli G. (2014) Associative learning for host-induced fruit volatiles in *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae), a koinobiont parasitoid of tephritid flies. *Bull Entomol Res* 104: 774-780. <https://doi.org/10.1017/S0007485314000625>
- Chen J, Stout MJ, Beuzelin J et al (2019) Host preference of sweetpotato weevil, *Cylas formicarius elegantulus* (Summers): an example of Hopkins' host-selection principle. *Arthropod Plant Interact* 13: 779-786. <https://doi.org/10.1007/s11829-019-09704-0>
- Corbet SA (1985). Insect chemosensory responses: a chemical legacy hypothesis. *Ecol Entomol* 10 (2): 143-153. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.1985.tb00543.x>
- Denker M, Finke R, Schaupp F, Grun S, Menzel R (2010) Neural correlates of odor learning in the honeybee antennal lobe. *Eur J Neurosci* 31: 119-133 <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.07046.x>
- De Oliveira M, Pallini A, Bernardo AMG et al. (2019) Associative learning in immature lacewings (*Ceraeochrysa cubana*). *Entomol Exp Appl* 167:775-783. <https://doi.org/10.1111/eea.12821>
- De Rijk M, Cegarra Sánchez V, Smid HM et al. (2018) Associative learning of host presence in non-host environments influences parasitoid foraging. *Ecol. Entomol.* 43: 318-325. <https://doi.org/10.1111/een.12504>
- Dicke M (2009) Behavioural and community ecology of plants that cry for help. *Plant Cell Environ* 32: 654-665. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01913.x>
- Dubnau J; Tully T (1998) Gene discovery in *Drosophila*: new insights for learning and memory. *Annu Rev Neur* 21:407-444. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.21.1.407>.
- Dudai Y. *Memory from A to Z: keywords, concepts and beyond*. Oxford University Press, Oxford 2002.
- Dukas R, Bernays EA (2000) Learning improves growth rate in grasshoppers. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2637-2640. <https://doi.org/10.1073/pnas.050461497>
- Eichler K, Li F, Litwin-Kumar A et al. (2017) The complete connectome of a learning and memory centre in an insect brain. *Nature* 548: 175-182. <https://doi.org/10.1038/nature23455>
- Fatouros NE et al. (2005) Oviposition-induced plant cues: do they arrest trichogramma wasps during host location? *Entomol Exp Appl* 115: 207–215. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2005.00245.x>
- Gadenne C, Barrozo RB, Anton S (2016) Plasticity in Insect Olfaction: To Smell or not to smell? *Annu Rev Entomol* 61: 317-333. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023523>
- Gandolfi M, Mattiacci L, Dorn S (2003) Preimaginal learning determines adult response to chemical stimuli in a parasitic wasp. *Proc R Soc Lond B* 270: 2623-2629. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2541>
- Giunti G, Canale A, Messing RH et al. (2015) Parasitoid learning: Current knowledge and implications for biological control. *Biol Control* 90: 208-219. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.06.007>
- Giunti G, Benelli G, Messing RH, Canale A (2016) Early adult learning affects host preferences in the tephritid parasitoid *Psytalia concolor* (Hymenoptera: Braconidae). *J Pest Sci* 89:529-537. <https://doi.org/10.1007/s10340-015-0715-6>

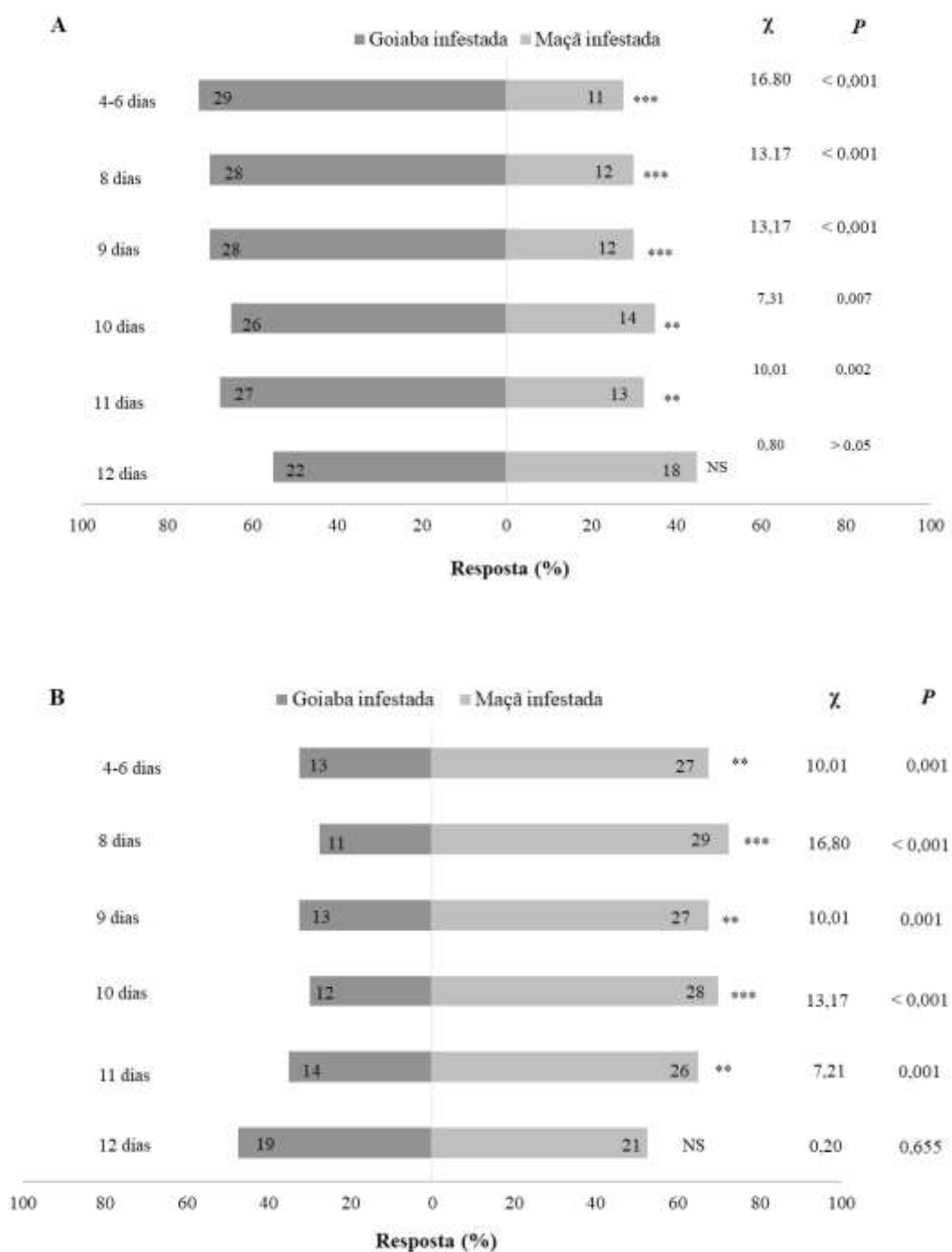
- Golovin RM, Broadie K (2016). Developmental experience-dependent plasticity in the first synapse of the *Drosophila* olfactory circuit. *J Neurophysiol* 116:2730-2738. <https://doi.org/10.1152/jn.00616.2016>
- Gonçalves RS et al. (2013) Biology and fertility life table of *Aganaspis pellaranoi* (Hymenoptera: Figitidae) in larvae of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Ann Entomol Soc American* 106(6): 791-798. <https://doi.org/10.1603/AN13044>
- Graves S, Piepho HP, Selzer L, Dorai-Raj S (2019). MultcompView: visualizations of paired comparisons. R package version 0.1-8. <https://CRAN.R-project.org/package=multcompView>
- Gregório PLF, Sant'Ana J, Pires PD (2015) Behavioral analysis of learning and memory in *Anastrepha fraterculus*. *Entomol Exp Appl* 154: 146-153. <https://doi.org/10.1111/eea.12265>
- Harbi A, Pedro L, Ferrara FAA (2019) *Diachasmimorpha longicaudata* parasitismo response to medfly host fruit infestation age. *Insect* 10:211. <https://doi.org/10.3390/insects10070211>
- Hopkins A.D. (1917) A discussion of C. G. Hewitt's Paper on "Insect Behaviour". *J Econ Entomol* 10:92-93. <https://doi.org/10.1023/A:101303332535>
- Kandel ER (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Sci* 294: 1030–1038. <https://doi.org/10.1126/science.1067020>
- Lee T, Lee A, Luo L (1999) Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* 126: 4065-4076. <https://doi.org/10.1242/dev.126.18.4065>
- Little CM, Chapman TW, Hillier NK (2019) Considerations for Insect Learning in Integrated Pest Management. *J Insect Sci* 19(4):1-14. <https://doi.org/10.1093/jisesa/iez064>
- Masry A, Clarke AR, Cunningham P. (2018). Learning influences host versus nonhost discrimination and postlighting searching behavior in the Tephritid fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha kraussii* (Hymenoptera: Braconidae). *J Econ Entomol* 111 (2): 787-794. doi: 10.1093/jee/toy033.
- Masry A, Cunningham P, Clarke AR (2019) From laboratory to the field: consistent effects of experience on host location by the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha kraussii* (Hymenoptera: Braconidae). *Insect Sci* 26(5): 863-872. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12587>
- Matthews RW, Matthews JR. *Insect behavior*. New York: John Wiley & Sons, 2010. 514 p.
- Meirelles RN, Redaelli LR, Ourique CB, Jahnke SM (2016) Parasitismo de *Anastrepha fraterculus* por *Diachasmimorpha longicaudata* em condições de semicampo. *Rev Brasil Cien Agrárias* 11(3): 204-209. <https://doi.org/10.5039/agraria.v11i3a5387>
- Menzel R (1999) Memory dynamics in the honeybee. *J of Comp Physiol A* 185: 323–340. <https://doi.org/10.1007/s003590050392>
- Mohamed SA, Ekesi S, Hanna R (2008). Evaluation of the impact of *Diachasmimorpha longicaudata* on *Bactrocera invadens* and five African fruit fly species. *J Appl Entomol* 132:789-797. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0418.2008.01350.x>
- Monsia A, Mègnigbèto GSB, Gnanvossou D, Karlsson MF (2019) Effect of fruit and host fly species on the associative learning by *Fopius arisanus*. *Bull Entomol Res* 109: 649-658. <https://doi.org/10.1017/S0007485319000038>
- Montoya P, Liedo P, Benrey B et al. (2000) Biological control of *Anastrepha* spp. (Diptera: Tephritidae) in mango orchards through augmentative releases of *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). *Biol Control* 18: 216-224. <https://doi.org/10.1006/bcon.2000.0819>
- Moral RA, Hinde J, Demétrio CGB (2017) "Half-Normal Plots and Overdispersed Models in R: The hnp Package." *J Stat Software* 81(10): 1-23. <https://doi.org/10.18637/jss.v081.i10>

- Ovruski SM, Bezdjian LP, Van Nieuwenhove GA et al. (2011) Host preference by *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) reared on larvae of *Anastrepha fraterculus* and *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). Fla Entomol 94: 195–200. <https://doi.org/10.1653/024.094.0211>
- Owald D, Felsenberg J, Talbot CB et al. (2015). Activity of defined mushroom body output neurons underlies learned olfactory behavior in *Drosophila*. Neuron 86: 417-427. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.025>
- Piepho HP (2004). An algorithm for a letter-based representation of all-pairwise comparisons. J Comput. Graph Stat. 13(2): 456-466. <https://doi.org/10.1198/1061860043515>
- Pires PDS, Sant' Ana J, Redaelli L (2021). Can *Anastrepha fraterculus* larval feeding influence chemotaxis and parasitism of *Diachasmimorpha longicaudata* and *Aganaspis pelleranoi*? Bull Entomol Res, 1-8. <https://doi.org/10.1017/S0007485321000249>
- Quijano CE, Pino JA (2007) Characterization of volatile compounds in guava (*Psidium guajava* L.) varieties from Colombia. Rev Cenic Cienc Quim 38(3)1-5.
- Rojas JC, Wyatt T (1999). The role of pre- and post-imaginal experience in the host-finding and oviposition behaviour of the cabbage moth. Physiol Entomol 24:83-89. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3032.1999.00117.x>
- Russell L (2020). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.4.8. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
- Sant' Ana J, Gregório PLF (2016) Olfactory learning and memory in *Grapholita molesta*. Entomol Exp Appl 160: 40-46. doi: <https://doi.org/10.1111/eea.12456>
- Segura DF, Viscarret MM, Carabajal LZ et al. (2007) Role of visual information and learning in habitat selection by a generalist parasitoid foraging for concealed hosts. Anim. Behav. 74:131-142. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2006.12.005>
- Segura DF, Viscarret MM, Ovruski SM, Cladera JL (2012) Response of the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* to host and host-habitat volatile cues. Entomol Exp Appl 143:164-176. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2012.01246.x>
- Segura DF, Nussenbaum AL, Viscarret MM et al. (2016) Innate host habitat preference in the Parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata*: functional significance and modifications through learning. PLOS One 11(3): e0152222. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152222>
- Schurmann D, Kugel D, Steidle JLM (2015) Early memory in the parasitoid wasp *Nasonia vitripennis*. J Comp Physiol A 201: 375-383. <https://doi.org/10.1007/s00359-015-0989-4>
- Silva JWP, Bento JMS, Zucchi RA (2007) Olfactory response of three parasitoid species (Hymenoptera: Braconidae) to volatiles of guavas infested or not with fruit fly larvae (Diptera: Tephritidae). Biol Control 41: 304-311. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2007.03.005>
- Sivinski JM, Calkins CO, Baranowski R et al. (1996). Suppression of a caribbean fruit fly (*Anastrepha suspensa* (Loew)) (Diptera: Tephritidae) population through augmentative releases of the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae). Biol Control 16:177–185. <https://doi.org/10.1006/BCON.1996.0022>
- Smid HM et al. (2007) Species specific acquisition and consolidation of long-term memory in parasitic wasps. Proc R Soc B. Biol Sci 274: 1539-1546. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0305>.
- Sobhy IS, Goelen T, Herrera-Malaver B et al. (2019) Associative learning and memory retention of nectar yeast volatiles in a generalist parasitoid. Anim. Behav. 153:137-146. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2019.05.006>

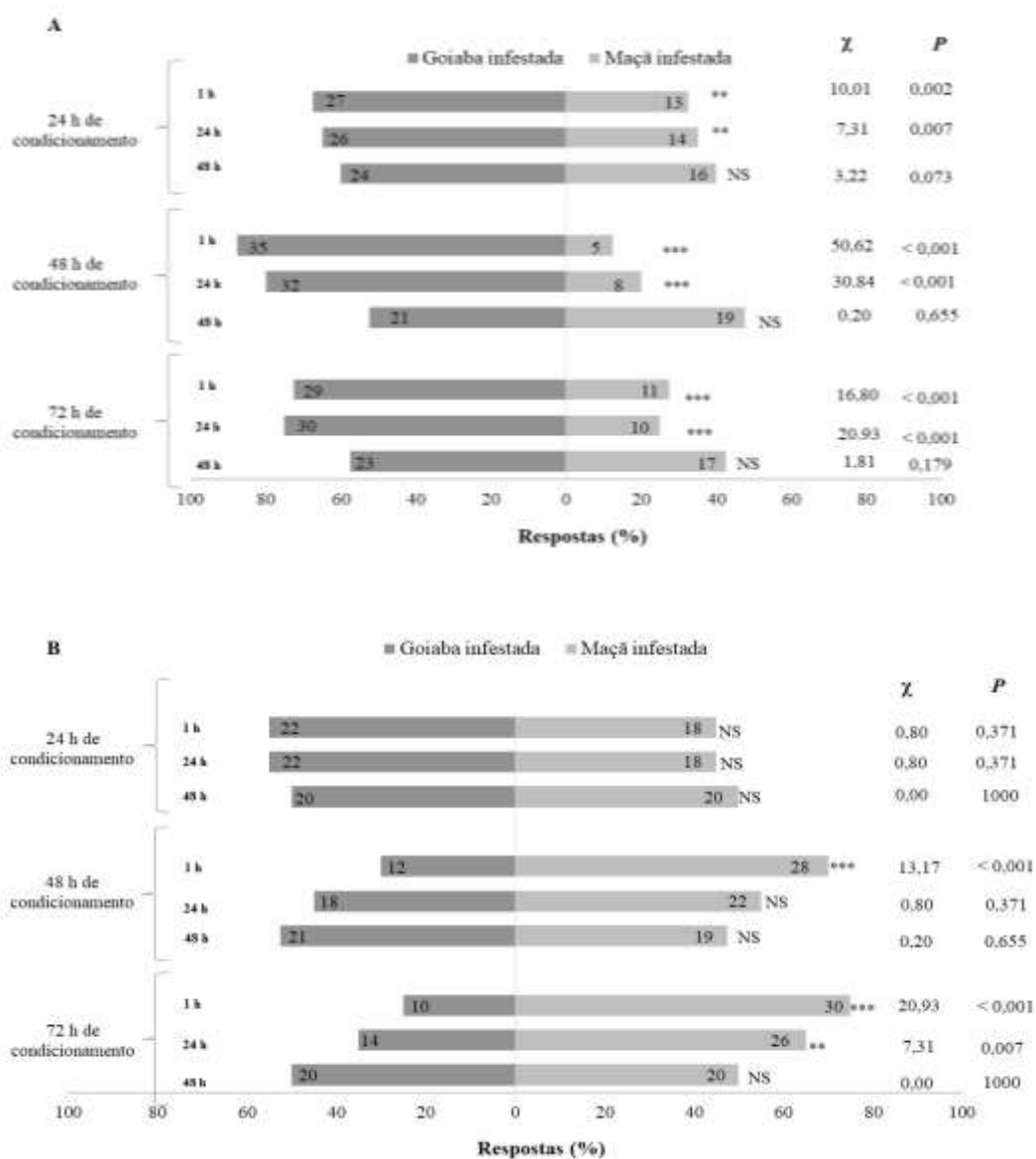
- Squire LR., Kandel ER Memory: from mind to molecules. Gordonsville: W H Freeman & Co, 1999. 254 p.
- Suárez L, Biancheri MJB, Sánchez G et al. (2019) Effects of releasing two *Diachasmimorpha longicaudata* population lines for the control of *Ceratitis capitata* infesting three key host fruit species. Biol Control 133: 58-65 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.03.011>
- Takemoto H, Powell W, Pickett et al. (2009) Learning is involved in the response of parasitic wasps *Aphidius ervi* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae) to volatiles from a broad bean plant, *Vicia faba* (Fabaceae), infested by aphids *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Homoptera: Aphididae). Appl Entomol Zool 44:23-28. doi:10.1303/aez.2009.23
- Takemoto H, Powell W, Pickett et al. (2012) Two-step learning involved in acquiring olfactory preferences for plant volatiles by parasitic wasps. Anim Behav 83 (6):1491-1496. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2012.03.023>
- Tang L, Liu J, Liu L et al. (2020) De novo transcriptome identifies olfactory genes in *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead). Genes 11(2): 144. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.03.005>
- Tognon R, Aldrich JR, Buffington ML et al. (2017) *Halymorpha halys* (Heteroptera: Pentatomidae) egg surface chemicals inhibit North American *Telenomus* and *Trissolcus* (Hymenoptera: Scelionidae) parasitism. Biol Control 114:39-44 <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.07.014>
- Tognon R, Sant'Ana J, Jahnke SM (2013) Aprendizagem e memória de *Telenomus podisi* (Hymenoptera, Platygasteridae). Iheringia 103:266-271. <https://doi.org/10.1590/S0073-47212013000300009>
- Tognon R, Sant'Ana J, Zhang QE et al. (2016) Volatiles mediating parasitism of *Euschistus conpersus* and *Halymorpha halys* eggs by *Telenomus podisi* and *Trissolcus erugatus*. J Chem Ecol 43:1-12. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0754-3>
- Tognon R, Sant'Ana J, Redaelli LR et al. (2018) Is It Possible to Manipulate Scelionidae Wasps? Preference to a Target Host? Neotrop Entomol 47:1-9. <https://doi.org/10.1007/s13744-018-0607-6>
- Turlings TCJ, Waeckers F, Vet LEM, Lewis WJ, Tumlinson JH (1993) Learning of host-finding cues by hymenopterous parasitoids. In Insect Learning: Ecological and Evolutionary Perspectives, eds. D. R. Papaj & A. Lewis, pp. 51-78. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2814-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2814-2_3)
- Vargas RI, Leblanc L, Putoa R et al. (2012) Population dynamics of three *Bactrocera* spp. fruit flies (Diptera: Tephritidae) and two introduced natural enemies, *Fopius arisanus* (Sonan) and *Diachasmimorpha longicaudata* (Ashmead) (Hymenoptera: Braconidae), after an invasion by *Bactrocera dorsalis* (Hendel) in Tahiti. Biol Control 60: 199-206. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.10.012>
- Vargas CC, Redaelli LR, Sant'Ana J et al. (2017) Influência da idade do hospedeiro e da aprendizagem no comportamento quimiotáxico e no parasitismo de *Trichogramma pretiosum*. Iheringia 107:1-7. <https://doi.org/10.1590/1678-4766e2017015>
- Vet LEM; Dicke M (1992) Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. Annu Rev Entomol 37(1): 141-172. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37010192.001041>
- Vet LEM, Lewis WJ, Cardé RT (1995) Parasitoid foraging and learning. In: CARDÉ, R. T.; BELL, W. J. Chemical ecology of insects 2. New York: Chapman & Hall, 1995. P. 65-101. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1765-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1765-8_3)
- Vinson SB (1976). Host selection by insect parasitoids. Annu Rev Entomol 21: 109-133. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.21.010176.000545>
- Vinson SB (1998) The general host selection behavior of parasitoid Hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and Oophagous species. Biol Control 11: 79-96. <https://doi.org/10.1006/bcon.1997.0601>

Wulff JP, Segura DF, Devescovi F et al. (2021) Identification and characterization of soluble binding proteins associated with host foraging in the parasitoid wasp *Diachasmimorpha longicaudata*. PlosOne. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252765>

Zadra WC, Sant'Ana J, Redaelli LR, Tognon R (2018) Plasticidade de aprendizagem de *Diaschasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) associada a voláteis de frutos e óleos essenciais. Iheringia, 108: e2018026. <https://doi.org/10.1590/1678-4766e2018026>.

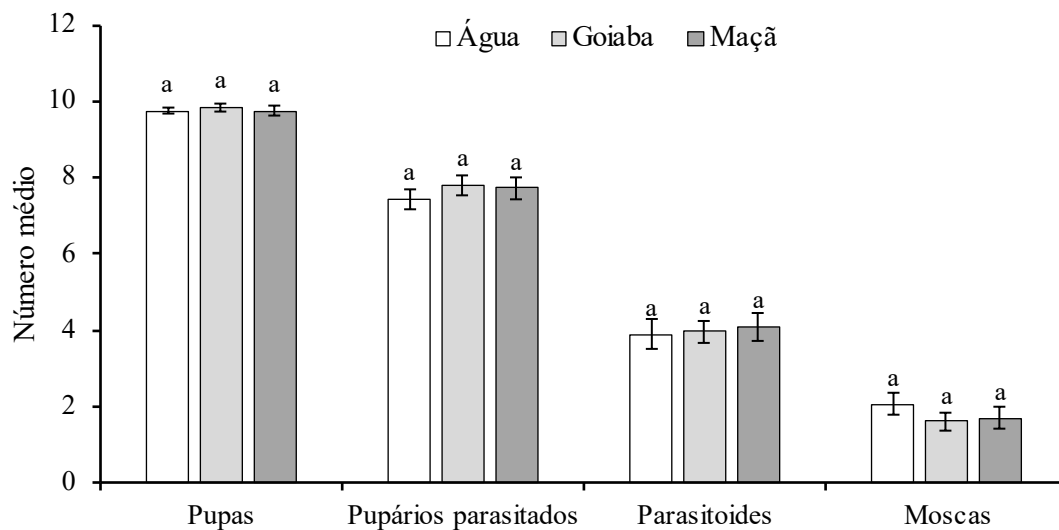


**Fig. 1** Respostas quimiotáticas de fêmeas de *Diachasmimorpha longicaudata* oriundas de larvas de *Anastrepha fraterculus* mantidas (A) em goiaba ou (B) maçã (condicionamento pré-imaginal), testadas em olfatômetro de dupla escolha em diferentes idades, submetidas aos voláteis de goiaba infestada ou maçã infestada. Números dentro das barras representam o número de insetos responsivos. Barras seguidas de asteriscos diferem significativamente por contrastes do modelo escolhido (MLG: distribuição binomial) ( $P < 0,05$ ). NS = Não significativo.



**Fig. 2** Respostas quimiotáticas de fêmeas de *Diachasmimorpha longicaudata* oriundas de larvas de *Anastrepha fraterculus* mantidas em dieta artificial, previamente expostas ao substrato de (A) goiaba e (B) maçã por 24, 48 e 72 horas (condicionamento imaginal) e testadas por um período de 1, 24 e 48 horas após o condicionamento em olfatômetro de dupla escolha submetidas aos voláteis de goiaba ou maçã infestada. Números dentro das barras representam o número de insetos responsivos. Barras seguidas de asteriscos diferem significativamente por contrastes do modelo escolhido (MLG: distribuição binomial) ( $P < 0,05$ ). NS = Não significativo.





**Fig. 3** Número médio de pupas formadas e pupários parasitados (parasitoide emergido + pupários com parasitoides) de *Anastrepha fraterculus*, de adultos de parasitoides *Diachasmimorpha longicaudata* e de mosca-das-frutas emergidas, a partir da exposição de fêmeas do parasitoide (com 4 dias de emergência) oriundas de larvas da mosca que se alimentaram de dieta artificial. As fêmeas foram submetidas, simultaneamente, a três unidades de parasitismo (água destilada, polpa de goiaba e polpa de maçã). Barras ( $\pm$  EP) seguidas pelas mesmas letras dentro de cada variável não diferem entre si por contrastes do modelo escolhido (MLG: distribuição quase-poisson) ( $P < 0,05$ ).

Tabela 1. Número médio ( $\pm$  EP) de pupários de *Anastrepha fraterculus* parasitados, de adultos de *Diachasmimorpha longicaudata* e de mosca-das-frutas que emergiram de três unidades de parasitismo (na presença de água destilada, polpa de goiaba ou de maçã), oferecidas simultaneamente ao parasitoide após diferentes tipos de condicionamento em polpa de goiaba.

Tipo de condicionamento (idade em dias) <sup>(a)</sup>	Unidade de parasitismo		
	Água destilada	Goiaba	Maçã
<b>Pupários parasitados<sup>(b)</sup></b>			
Pré-imaginal (4)	3,6 $\pm$ 0,35 Bab	8,3 $\pm$ 0,54 Aa	2,7 $\pm$ 0,30 Bb
Pré-imaginal (12)	3,9 $\pm$ 0,37 Aa	4,3 $\pm$ 0,39 Ac	4,0 $\pm$ 0,37 Aa
Imaginal	2,6 $\pm$ 0,32 Bb	6,0 $\pm$ 0,49 Ab	3,6 $\pm$ 0,38 Bab
<b>Parasitoides</b>			
Pré-imaginal (4)	1,9 $\pm$ 0,28 Bb	6,1 $\pm$ 0,49 Aa	1,1 $\pm$ 0,21 Cb
Pré-imaginal (12)	3,3 $\pm$ 0,36 Aa	4,1 $\pm$ 0,40 Ab	3,5 $\pm$ 0,37 Aa
Imaginal	1,6 $\pm$ 0,31 Bb	4,5 $\pm$ 0,51 Aab	1,9 $\pm$ 0,33 Bb
<b>Moscas</b>			
Pré-imaginal (4)	5,6 $\pm$ 0,40 Aab	1,1 $\pm$ 0,16 Bc	6,5 $\pm$ 0,40 Aa
Pré-imaginal (12)	5,1 $\pm$ 0,40 Ab	4,6 $\pm$ 0,34 Aa	5,0 $\pm$ 0,35 Ab
Imaginal	6,7 $\pm$ 0,43 Aa	3,5 $\pm$ 0,31 Bb	5,9 $\pm$ 0,40 Aab

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si por contrastes do modelo escolhido (MLG: distribuição quase-poisson) ( $P < 0,05$ ).

<sup>(a)</sup>Os parasitoides do tipo de condicionamento pré-imaginal (com 4 e 12 dias de emergência) foram oriundos de larvas que se alimentaram de polpa de goiaba; os oriundos do condicionamento imaginal foram condicionados com polpa de goiaba (por 24 h) e testados com quatro dias de emergência.

<sup>(b)</sup>Parasitoides que emergiram dos pupários + pupários dissecados com a presença de parasitoides.

Tabela 2. Número médio ( $\pm$  EP) de pupários de *Anastrepha fraterculus* parasitados, de adultos de *Diachasmimorpha longicaudata* e de mosca-das-frutas que emergiram de três unidades de parasitismo (na presença de água destilada, polpa de goiaba ou de maçã), oferecidas simultaneamente ao parasitoides após diferentes tipos de condicionamento em polpa de maçã.

Tipo de condicionamento (idade em dias) <sup>(a)</sup>	Unidade de parasitismo		
	Água destilada	Goiaba	Maçã
<b>Pupários parasitados<sup>(b)</sup></b>			
Pré-imaginal (4)	3,3 $\pm$ 0,29 Ba	3,4 $\pm$ 0,30 Ba	7,4 $\pm$ 0,44 Aa
Pré-imaginal (12)	3,3 $\pm$ 0,29 Aa	4,1 $\pm$ 0,32 Aa	3,5 $\pm$ 0,30 Ab
Imaginal	3,6 $\pm$ 0,31 Ba	3,9 $\pm$ 0,32 Ba	6,1 $\pm$ 0,40 Aa
<b>Parasitoides</b>			
Pré-imaginal (4)	1,5 $\pm$ 0,26 Bb	1,4 $\pm$ 0,25 Bb	5,4 $\pm$ 0,50 Aa
Pré-imaginal (12)	3,3 $\pm$ 0,39 Aa	4,1 $\pm$ 0,43 Aa	3,5 $\pm$ 0,40 Ab
Imaginal	1,6 $\pm$ 0,30 Bb	1,4 $\pm$ 0,29 Bb	3,7 $\pm$ 0,5 Ab
<b>Moscas</b>			
Pré-imaginal (4)	6,0 $\pm$ 0,39 Aa	5,8 $\pm$ 0,385 Aa	1,8 $\pm$ 0,22 Bc
Pré-imaginal (12)	5,1 $\pm$ 0,36 Aa	4,6 $\pm$ 0,344 Aa	5,0 $\pm$ 0,36 Aa
Imaginal	6,0 $\pm$ 0,39 Aa	5,7 $\pm$ 0,377 Aa	3,4 $\pm$ 0,29 Bb

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha e letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente entre si por contrastes do modelo escolhido (MLG: distribuição quase-poisson) ( $P < 0,05$ ).

<sup>(a)</sup>Os parasitoides do tipo de condicionamento pré-imaginal (com 4 e 12 dias de emergência) foram oriundos de larvas que se alimentaram de polpa de maçã; os oriundos do condicionamento imaginal foram condicionados com polpa de maçã (por 48 h) e testados com cinco dias de emergência.

<sup>(b)</sup>Parasitoides que emergiram dos pupários + pupários dissecados com a presença de parasitoides.

## 6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo e nas condições em que o trabalho foi realizado, é possível tecer as conclusões expostas abaixo.

### ARTIGO 1

- Fêmeas inexperientes de *D. longicaudata* e *A. pelleranoi* percebem os odores de goiaba e maçã não infestadas quando contrastados com o ar.
- Fêmeas inexperientes de *D. longicaudata* expostas simultaneamente aos voláteis de goiaba e maçã não respondem a estes; as de *A. pelleranoi* preferem os de goiaba.
- Fêmeas de *D. longicaudata* oriundas de larvas de *A. fraterculus* mantidas em goiaba ou maçã são atraídas para o fruto no qual seu hospedeiro foi mantido; as de *A. pelleranoi* oriunda do mesmo hospedeiro alimentado com maçã, preferem os odores de goiaba.
- Fêmeas de *D. longicaudata* oriundas de larvas de *A. fraterculus* mantidas em goiaba ou maçã parasitam mais larvas na presença da polpa no qual seu hospedeiro se alimentou; as de *A. pelleranoi*, oriundas do mesmo hospedeiro, alimentado com os mesmos frutos, não diferenciam ou preferem as unidades de goiaba.
- O condicionamento pré-imaginal teve maior influência no comportamento quimiotático e parasitismo de *D. longicaudata* do que de *A. pelleranoi*.

## ARTIGO 2

- Fêmeas inexperientes de *A. pelleranoi* são mais perceptíveis aos voláteis de goiaba quando comparados com os de maçã e parasitam mais as unidades contendo polpa de goiaba.
- Fêmeas de *A. pelleranoi* oriundas de larvas de *A. fraterculus* mantidas em maçã, preferem os odores de goiaba.
- Fêmeas de *A. pelleranoi* oriundas de larvas de *A. fraterculus* mantidas em maçã (condicionamento pré-imaginal) parasitam, de forma igual, larvas com a presença de polpa de maçã e goiaba.
- Fêmeas de *A. pelleranoi* condicionadas ao substrato artificial contendo polpa de maçã, durante 48 horas, é mais atraída para voláteis deste fruto em comparação com os de goiaba e mantém a memória olfativa por até 12 horas.
- Fêmeas de *A. pelleranoi* condicionadas ao substrato artificial contendo polpa de maçã durante 24 e 48 horas parasitam mais as unidades contendo polpa deste fruto.

## ARTIGO 3

- Fêmeas inexperientes de *D. longicaudata* não diferenciam os voláteis de goiaba dos de maçã.
- Fêmeas de *D. longicaudata* oriundas de larvas de *A. fraterculus* mantidas em goiaba ou maçã são mais atraídas para o fruto no qual seu hospedeiro se alimentou e mantêm esse comportamento por, pelo menos, 11 dias.
- Fêmeas de *D. longicaudata* condicionadas durante 24 horas ao substrato artificial contendo polpa de goiaba são mais atraídas aos voláteis de goiaba.

- Fêmeas de *D. longicaudata* condicionadas no período imaginal durante 24, 48 ou 72 horas ao substrato artificial contendo polpa de goiaba modificam o seu comportamento mantendo por pelo menos 24 horas.
- Fêmeas de *D. longicaudata* condicionadas no período imaginal durante 24 horas ao substrato artificial contendo polpa de maçã não diferenciam entre os voláteis de goiaba e dos de maçã.
- Fêmeas de *D. longicaudata* condicionadas no período imaginal durante 48 horas ao substrato artificial contendo polpa de maçã são mais atraídas para os voláteis de maçã e mantêm esse comportamento por pelo menos 1 hora.
- Fêmeas de *D. longicaudata* condicionadas no período imaginal durante 72 horas ao substrato artificial contendo polpa de maçã são mais atraídas para os voláteis de maçã mantendo esse comportamento por pelo menos 24 horas.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho apresenta dados inéditos e de caráter inovador a respeito do impacto do condicionamento pré-imaginal e imaginal no comportamento quimiotático e parasitismo de duas espécies de parasitoides de mosca-das-frutas. Este foi o primeiro estudo que constatou o aprendizado e a memória química de parasitoide a compostos de frutos os quais seus hospedeiros tiveram contato. Da mesma forma, pela primeira vez foi avaliada e comparada a influência da exposição desses voláteis em duas fases de desenvolvimento de duas espécies, sendo uma exótica, o braconídeo, *D. longicaudata*, e outra nativa, o figítídeo *A. pelleranoi*.

Como já comentado, *D. longicaudata* tem registro para controle de moscas-das-frutas em países da América Latina, inclusive no Brasil. Nosso estudo comprovou que este inseto pode ser condicionado a reconhecer odores de frutos nos quais estão seus hospedeiros, resultando em aumento nas taxas de parasitismo. Entretanto, será que este aumento no parasitismo tem relação ao menor tempo de busca do parasitoide condicionado em relação ao não experiente? Os dados de parasitismo obtidos em laboratório seriam semelhantes quando conduzidos em ambientes mais amplos, como em semicampo?

Investigações realizadas por nós durante o doutorado, as quais não estão presentes neste documento, visaram responder estas questões através de testes em túnel de vento e de parasitismo em condições de semicampo. Nestes bioensaios avaliamos as respostas de fêmeas *D. longicaudata* em duas idades diferentes condicionadas ou não a substratos

artificiais de goiaba e verificamos que o tempo médio de deslocamento até o fruto de goiaba infestado foi menor para fêmeas de *D. longicaudata* com cinco dias de idade condicionadas aos voláteis de goiaba ( $66,9 \pm 1,10s$ ) em relação as não condicionadas a este odor (inexperientes) ( $162 \pm 2,71s$ ) ( $P < 0,0001$ ). Resultado semelhante foi observado para as fêmeas de 15 dias de idade, ou seja,  $61,3 \pm 1,02s$  (experientes) e  $163,2 \pm 2,72s$  (inexperientes) ( $P < 0,0001$ ). A idade não influenciou o comportamento quimiotáxico de fêmeas com ( $P = 0,6414$ ) e sem ( $P = 0,6242$ ) experiência com goiaba. Desta forma, constatamos que, independentemente da idade, o condicionamento imaginal em goiaba diminuiu o tempo de busca de fêmeas de *D. longicaudata* a este fruto.

Nos bioensaios de semicampo, em gaiolas de  $8 m^3$ , fêmeas de *D. longicaudata* de ambas as idades (5 e 15 dias) condicionadas ao substrato contendo a polpa de goiaba, parasitaram um número maior de larvas presentes nas unidades pinceladas com a polpa desta fruta do que as que receberam apenas água, após 30 e 60 minutos de exposição ( $P < 0,05$ ), o que também resultou em um maior número de parasitoides emergidos ( $P < 0,05$ ). Para fêmeas inexperientes, não houve diferença em relação ao parasitismo e emergência de parasitoides e moscas entre as unidades pinceladas com água destilada e goiaba ( $P > 0,05$ ). Com estes resultados foi possível demonstrar que a aprendizagem de fêmeas durante a fase adulta torna-as mais rápidas e eficientes na localização das pistas emitidas pelos frutos, aumentando as taxas de parasitismo em larvas de *A. fraterculus*, mesmo em ambientes em semicampo.

Sabe-se que a resposta ao aprendizado está associada a uma vantagem adaptativa, que resultará em uma melhor aptidão ao ambiente e, conseqüentemente, a uma melhor performance reprodutiva e sobrevivência da espécie. Conhecer a plasticidade olfativa de parasitoides de mosca-das-frutas expostas a voláteis de frutos e



avaliar quando e como ocorre a mudança de comportamento, bem como o tempo de memória em relação a esta aprendizagem, poderá ser uma relevante ferramenta a ser utilizada futuramente na manipulação comportamental de parasitoides.

Desta forma, o condicionamento de fêmeas de *D. longicaudata* ou mesmo de *A. pelleranoi* (em caso de registro) aos odores das plantas nas quais seus hospedeiros se desenvolvem, deve ser levado em consideração nas estratégias de criação massal em biofábricas, visando o incremento da ação destes importantes inimigos naturais em pomares comerciais. Entretanto, ainda são necessários estudos que avaliem as mudanças comportamentais desses parasitoides em pomares, onde a diversidade química é muito maior e a presença de outras espécies de parasitoides pode aumentar a competição pelo recurso (larvas de mosca-das-frutas).