

KLEBER DE SOUSA PEREIRA

**COMPETIÇÃO LARVAL EM PARASITOIDE GREGÁRIO DE PUPAS  
EM BROCA DAS CUCURBITÁCEAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Pereira, Kleber de Sousa, 1986-

P436c  
2014            Competição larval em parasitoide gregário de pupas em  
broca das cucurbitáceas / Kleber de Sousa Pereira. – Viçosa,  
MG, 2014.

x, 32f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: José Cola Zanúncio.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Entomologia. 2. Inseto. 3. Inseto - comportamento.  
4. *Palmistichus elaeis*. 5. Inseto - Reprodução. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Entomologia. Programa de  
Pós-graduação em Entomologia. II. Título.

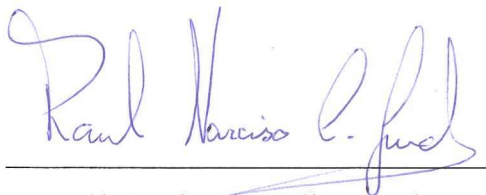
CDD 22. ed. 595.79

KLEBER DE SOUSA PEREIRA

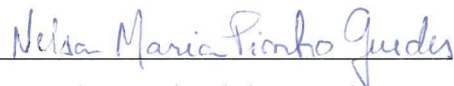
**COMPETIÇÃO LARVAL EM PARASITOIDE GREGÁRIO DE PUPAS  
EM BROCA DAS CUCURBITÁCEAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Entomologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

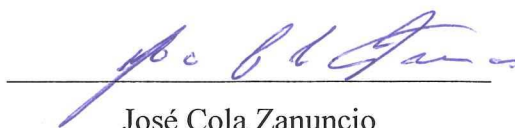
APROVADA: 17 de outubro de 2014.



Raul Narciso Carvalho Guedes  
(Coorientador)



Nelsa Maria Pinho Guedes



José Cola Zanuncio  
(Orientador)

**DEDICO**

À minha mãe, Darli Marques de Sousa;

Aos meus pais, Rubens Pereira e Givaldo Máximo dos Santos;

Às minhas avós, Carmelita Pereira e Joana;

À minha tia, Iracema.

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Darli Marques de Sousa por todo apoio, educação, paciência e força nos momentos da minha ausência.

À minha família, em especial aos meus pais Givaldo e Rubens, Maracema, Iracema, Gilson, Gilsenei e Luzi pelo apoio, incentivo e, pelos momentos felizes.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Programa de Pós-graduação em Entomologia, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade, suporte financeiro para a realização desta pesquisa e a cada cidadão brasileiro por contribuir direta ou indiretamente para a minha formação acadêmica.

Ao professor José Cola Zanuncio, pela oportunidade, incentivo, ensinamentos profissionais e contribuição com esta dissertação.

Aos professores co-orientadores Raul Narciso Carvalho Guedes e José Eduardo Serrão pelo acolhimento, confiança, incentivo, paciência, suporte técnico e valiosas sugestões durante a realização do trabalho e pelo exemplo de profissionalismo.

A Dra. Nelsa Maria Pinho Guedes pelo apoio, incentivo e pela forma gentil de me orientar durante a execução deste trabalho.

Aos professores e colegas das disciplinas que cursei no Departamento de Entomologia pela amizade e troca de conhecimentos, fundamentais à minha formação profissional.

Ao professor do curso de Pós-Graduação em Entomologia, Simon Luke Elliot pela concessão do uso de equipamento necessário em seu laboratório.

Aos funcionários Srs. Antônio e Manoel do Insetário, Sr. Paulo do BIOAGRO e Sra. Cida do Departamento de Entomologia, pela amizade simpatia no dia-dia.

Às secretárias Cláudia e Eliane do Programa de Pós-graduação em Entomologia

pela dedicação e boa vontade.

À Isabel, Germano e Henrique pela ajuda na criação dos insetos e à Caíque e Carol pela contribuição na execução dos experimentos. Agradeço também à Gabryele “Gaby” e ao Lírio pela boa vontade em ajudar em algumas circunstâncias.

Ao Júlio, Farley, Talitta e Gilberto pela ajuda e importantes informações fornecidas para a execução dos trabalhos de resposta imune. Agradeço ainda à Roberta, Conrado, Wagner e Laura pelas conversas e valiosas sugestões no delineamento experimental, nas análises estatísticas e no manuscrito.

Aos amigos do Laboratório de Ecofisiologia e Ecotoxicologia: Alice, Ancidériton, Carol, Conrado, Daiane, Gislane, Juliana, Laura, Lírio, Lucas, Marcelo, Mateus Campos, Mateus Chediak, Milaine, Roberta, Vinícius e Wagner pelos momentos maravilhosos e inesquecíveis.

Ao Dr. José Milton e aos amigos do laboratório de Controle Biológico de Insetos: Rosenilson, Isabel, Rafael Ribeiro, Rafael Guanabens, Julio, Francisco, Alexandre “Caju”, Douglas, Daniele, Ancidériton, Pedro, Wagner Calixto, Ana Flávia, Lucas e Germano, pelos bons momentos e agradável convívio.

Aos amigos da antiga república: Ivan, Luciano Pinheiro, Júlio, Jeferson, Marcelo, Heider e Eduardo e da atual república de Entomologistas: Fábio, Carlos, Luciano Mendes, Wagner e Tiago pela cooperação no dia-dia, amizade, “bobeiras” e agradáveis e felizes momentos em Viçosa.

Aos amigos distantes Adriano “Verão”, Carlos (Moçamba), Wallace, Lázaro, Francisco “Frank”, Paulo “Beço”, Edgar “Vovô” e Joeliton “Zangado” pelo apoio e incentivo.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

KLEBER DE SOUSA PEREIRA, filho de Rubens Pereira e Darli Marques de Sousa, nasceu na cidade de Valença, Bahia, Brasil, no dia 06 de fevereiro de 1986.

Toda a sua formação estudantil foi cursada na rede pública de ensino.

No ano de 2005, ingressou no curso Técnico em Agropecuária pela Escola Média de Agropecuária Regional da CEPLAC – EMARC. Foi estagiário na empresa Plantações Michelin da Bahia LTDA em janeiro de 2007. Formou em fevereiro de 2007. Atuou como supervisor técnico em atividades agropecuárias na EMARC de março a julho de 2007.

Em julho de 2007, ingressou no curso de Engenharia Agrônômica do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (CCA-UFRB) em Cruz das Almas, Bahia. Foi bolsista de Iniciação Científica no laboratório de Entomologia Aplicada da Embrapa Mandioca e Fruticultura por três anos sob a orientação do Dr. Romulo da Silva Carvalho sendo premiado nesta instituição em duas jornadas científicas nos anos de 2010 e 2011. Seu trabalho de conclusão de curso foi na área de Entomologia sob a orientação do professor entomologista Msc. Oton Meira Marques. Colou grau em Engenharia Agrônômica em novembro de 2012.

Em novembro de 2012, iniciou o curso de Mestrado em Entomologia no Programa de Pós-graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, submetendo-se a defesa de Dissertação em outubro de 2014.

## CONTEÚDO

	Página
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	4
RESULTADOS.....	8
DISCUSSÃO.....	11
CONCLUSÕES.....	16
REFERÊNCIAS.....	17

## RESUMO

PEREIRA, Kleber de Sousa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2014. **Competição larval em parasitoide gregário de pupas em broca das cucurbitáceas.** Orientador: José Cola Zanuncio. Coorientadores: Raul Narciso Carvalho Guedes e José Eduardo Serrão.

Hospedeiros parasitados são considerados de baixa qualidade e podem influenciar no número de oviposições de parasitoides, influenciando na sobrevivência da progênie, pois, a quantidade de ovos depositados afeta a resposta imune do hospedeiro. Por isso, torna-se necessário saber até quando o investimento de superparasitar é vantajoso ao ponto de suprimir a resposta imune do hospedeiro e favorecer uma ótima competição de imaturos dentro do hospedeiro. O objetivo desta pesquisa foi reconhecer a densidade ótima de posturas de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) para produção de progênie, e saber se a resposta imune do hospedeiro *Diaphania hyalinata* L. (Lepidoptera: Crambidae) ao parasitismo se relaciona a esta densidade ótima. Pupas de *D. hyalinata* foram expostas a uma, duas, três, quatro e cinco posturas por uma mesma fêmea do parasitoide. O número total de progênies, de machos e fêmeas emergidos, razão sexual, ciclo de vida, peso médio e biomassa produzida foram analisados. A velocidade de pupação, tempo entre pupa e emergência de *P. elaeisis* e a porcentagem de pupas com imaturos inviáveis deste parasitoide foram observados em pupa de *D. hyalinata* em sistema de radiografia digital. A sobrevivência de adultos de *P. elaeisis* foi avaliada diariamente. A porcentagem de emergência da progênie foi avaliada. A dinâmica hemocitária e a capacidade de encapsulação por pupas de *D. hyalinata* contra *P. elaeisis* foi avaliada mediante o número de posturas. Larvas de *P. elaeisis* empuparam mais rápido e o tempo entre o período de pupa e a emergência foi praticamente constante com três oviposições, variando para os demais tratamentos. Três oviposições proporcionou o maior número de fêmeas, total de emergidos e desempenho e, menor tempo de desenvolvimento dos parasitoides. O peso da progênie e a razão sexual foram semelhantes entre os indivíduos. Fêmeas e machos de pupas com uma oviposição sobreviveram mais que os demais tratamentos. A porcentagem de emergência de parasitoides aumentou com o número de posturas. O parasitismo foi de 100% em todos os tratamentos. Pupas com quatro e cinco oviposições não tiveram larvas inviáveis. O aumento do número de posturas reduziu o número de hemócitos totais e de granulócitos, plasmatócitos e prohemócitos circulantes na hemolinfa de pupas de

*D. hyalinata*. Oenocitóides e esferulócitos circulantes mostraram padrão aleatório entre os tratamentos. A taxa de encapsulamento e de melanização decresceram com o aumento de oviposições de *P. elaeisis*. A oviposição por três vezes maximizou a progênie, reduziu o tempo de desenvolvimento e aumentou o desempenho de *P. elaeisis*. O superparasitismo é uma estratégia em *P. elaeisis* para o aumento de sobrevivência e desempenho da prole.

## ABSTRACT

PEREIRA, Kleber de Sousa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2014. **Larval competition in a gregarious pupa parasitoid of the melonworm.** Advisor: José Cola Zanuncio. Co-advisors: Raul Narciso Carvalho Guedes and José Eduardo Serrão.

Insect hosts that have been already parasitized are considered a low quality resource, which may affect the number of ovipositions made by other parasitoids. Since the amount of eggs laid affects the host immune response, the offspring survivorship may also be affected. For this reason, it is necessary to understand to what point the energy spent in superparasitizing is an advantage that allows suppression of host immune response and provides adequate resources for the imatures to develop within their host. This study had the objective of finding the number of ovipositions from *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) allowing optimal offspring fitness and to analyze if immune response the melonworm *Diaphania hyalinata* L. (Lepidoptera: Crambidae) is correlated with the density of posture by the parasitoid. Pupae of *D. hyalinata* received from one to five parasitoid ovipositions. The total number of offspring produced, the number of males and females emerging from the host, sex ratio, life cycle, average body mass and biomass produced per parasitized pupae were recorded for the different oviposition densities. Digital x-ray imaging of parasitized hosts were recorded to assessing the immature parasitoid developmental until adult emergence. Incidence of unviable parasitoid larvae was also recorded. The survivorship of *P. elaeisis* was daily assessed. Hemocyte dynamics and encapsulation capacity of *D. hyalinata* against *P. elaeisis* was evaluated for each number of ovipositions, from one to five. The Parasitoid developmental time decreased with increased oviposition density and three ovipositions provided higher offspring and particularly female production, and optimal larval fitness. Progeny body mass and sex ration were not affected by oviposition density. Female and male survived longer with one oviposition of the female parasitoid. Parasitoid emergence increased with the number of parasitoid ovipositions and 100% parasitism and corresponding 100% host pupa mortality were achieved with all oviposition densities. Increased number of ovipositions decreased the number of total hemocytes, and also of granulocytes, plasmatocytes and prohemocytes in the circulating host hemolymph. Oenocytes and espherulocytes were not affect by the number of parasitoid ovipositions in the host. The melanization and encapsulation rates decreased with the number of ovipositions by *P. elaeisis*. Three ovipositions by the parasitoid female

allowed optimal progeny production and parasitoid performance. Superparasitism is a strategy of *P. elaeisis* for optimal progeny fitness balancing optimal progeny performance with amelioration of host immune response.

## 1. INTRODUÇÃO

A competição de indivíduos por recursos determina a história de vida e o comportamento de animais (Smith, 1991; Alves-Costa & Knogge, 2005). Parasitoides podem ser solitários ou gregários, de acordo com o comportamento, desenvolvimento larval e quantidade de progênie produzida por hospedeiro (Gauld & Bolton, 1988). Em solitários, apenas uma larva completa seu desenvolvimento no hospedeiro devido ao comportamento agressivo das larvas, que entram em combate quando mais de um indivíduo está presente (Vinson & Hegazi 1998). Por outro lado, em espécies de parasitoides gregários muitos indivíduos se desenvolvem por hospedeiro com o compartilhamento de recurso (Tena et al., 2009; Harvey et al., 2013).

O número de descendentes de parasitoides gregários varia com a qualidade e tamanho do hospedeiro aumentando o potencial adaptativo da progênie e a exploração otimizada de recursos (Vet et al., 1993; Koppik et al., 2014). Portanto, a escolha de um hospedeiro envolve um balanço entre os custos de energia e tempo e o valor do recurso (Charnov & Skinner, 1984).

O reconhecimento do hospedeiro parasitado é um importante indicador da sua qualidade para parasitoides (Koppik et al., 2014). A discriminação do hospedeiro é a capacidade que os parasitoides têm em distinguir hospedeiros não parasitados, parasitados por coespecíficos ou parasitados por eles mesmos (Roitberg & Mangel, 1988; Montoya et al., 2012). Parasitoides gregários devem evitar o superparasitismo, pois muitas proles emergirão de uma única postura. Além disso, a carga de ovos nestes parasitoides reduz consideravelmente a cada nova oviposição (Potting et al., 1997). A incapacidade em discriminar hospedeiros parasitados em espécies gregárias (Potting et al., 1997; Gu et al., 2003; Harvey et al., 2013) pode levar ao desperdício de ovos, morte de larvas e aumento do risco de predação devido ao maior tempo de manuseio do

hospedeiro e de oviposições (Potting et al., 1997).

O superparasitismo foi considerado um erro nos animais (van Alphen & Visser, 1990; Montoya et al., 2012), mas vem sendo considerado como uma estratégia adaptativa em determinadas situações (van Alphen & Visser, 1990; White & Andow, 2008), principalmente quando a probabilidade de morte é alta (Rosenheim & Hongkham, 1996).

O encapsulamento de ovos como resposta imune do hospedeiro é a maior causa de mortalidade em endoparasitoides (Kapranas et al., 2011) e múltiplas oviposições no mesmo hospedeiro pode aumentar a probabilidade de escape da ação defensiva do hospedeiro (Tena et al., 2008; White & Andow, 2008; Andrade et al., 2010). O encapsulamento resulta da participação de diferentes tipos de hemócitos que identificam e aderem ao invasor recrutando outras células para formar uma cápsula melanizada (Gillespie et al. 1997; Strand, 2008). Nesta melanização ocorre a síntese de intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio que danificam a estrutura de proteínas e DNA levando a morte de ovos e de larvas do parasitoide por asfixia ou intoxicação por compostos tóxicos produzidos no processo (Nappi & Ottaviani, 2000; Narayanan, 2004).

Hospedeiros parasitados são considerados de baixa qualidade (Koppik et al., 2014) e, portanto, podem influenciar no número de oviposições de parasitoides que adequam o número de ovos no hospedeiro para evitar a competição por recurso (Klomp & Teerink, 1962; Zaviezo & Mills, 2000). Em contrapartida, quanto maior a quantidade de ovos depositados, menor será a resposta imune do hospedeiro, garantindo maior sobrevivência das proles (Tena et al., 2008; Andrade et al., 2010). No entanto é importante a determinação de até quando o investimento de superparasitar é vantajoso ao ponto de suprimir a resposta imune do hospedeiro e

favorecer uma ótima competição e ganho de potencial adaptativo per capita de descendentes dentro do hospedeiro.

A competição intrínseca entre parasitoides de importância agrícola tem sido pouco estudada (Harvey et al., 2013), embora sejam os inimigos naturais com o maior número de introduções e sucesso para o controle biológico aplicado (Mafi & Ohbayashi, 2010).

*Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle, 1993 (Hymenoptera: Eulophidae) é um endoparasitoide gregário generalista com potencial para controlar lepidópteros de importância econômica (Pereira *et al.* 2008; Andrade et al., 2010; Chichera et al., 2012). No entanto, ganho de desempenho desse parasitoide deve ser estudado para sua utilização em controle biológico. Fêmeas deste parasitoide podem parasitar hospedeiros parasitados por coespecíficos ou por eles mesmos (dados não publicados) sugerindo que o superparasitismo seja uma estratégia para otimização de desempenho de fêmeas ou de sua progênie, pois endoparasitoides tem que enfrentar o sistema interno de defesa de hospedeiros.

Este estudo investigou o mecanismo de competição larval de *P. elaeisis* em pupas de *Diaphania hyalinata* L. (Lepidoptera: Crambidae), buscando reconhecer a densidade ótima de posturas para produção de progênie e se a resposta imune do hospedeiro ao parasitismo se relaciona a esta densidade ótima. A nossa hipótese é que existe um número ótimo de posturas permitindo maior sobrevivência e desempenho da progênie devido ao limite de competição de imaturos por recurso e de supressão do sistema imune do hospedeiro.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Criação de *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae)

Lagartas de *D. hyalinata* foram alimentadas diariamente com folhas de chuchu (*Sechium edule*) da eclosão até a fase de pré-pupa em sala climatizada a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa e fotofase de 12 horas em potes plásticos (3.000 mL) com a tampa perfurada e vedada com organza. Pré-pupas desse inseto foram transferidas para potes plásticos (3.000mL) forrados com papel toalha até a pupação e as pupas colocadas em gaiolas de madeira (33 x 33 x 33 cm) com as laterais teladas e fechadas para emergência dos adultos que receberam uma solução nutritiva (60g de sacarose, 10,5g de mel e 1,05g de nipagin e ácido ascórbico diluídos em 1,05L de água destilada), embebida em algodão no fundo da gaiola sobre uma placa de Petri (Greene et al., 1976). Folhas de abóbora foram colocadas no interior das gaiolas e as posturas de *D. hyalinata* realizadas nas mesmas, coletadas e colocadas em potes plásticos para continuidade da criação (Pratissoli et al., 2008).

### 2.2. Criação do parasitoide *Palmistichus elaeisis*

*Palmistichus elaeisis* foi obtido da criação estoque do Laboratório de Controle Biológico de Insetos da Universidade Federal de Viçosa em Viçosa, Minas Gerais a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 14 horas. Esse parasitoide foi criado em tubos de ensaio de vidro (14 x 2,2 cm) com uma gota de mel tampado com uma bola de algodão a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa e 12 h de fotoperíodo (Zanuncio et al., 2008). Fêmeas e machos de *P. elaeisis* foram acasalados após 24 a 36 h da emergência. Pupas de *Tenebrio molitor* com 24-72 h de idade foram individualizados com seis fêmeas do parasitoide por 48 horas. Os parasitoides obtidos foram coletados e utilizados nos experimentos.

### **2.3. Competição larval de parasitoides em pupas hospedeiras**

Cada fêmea virgem de *P. elaeisis* com idade entre 76 e 96 horas, quando possuem ovócitos maduros adequados para oviposição (Andrade et al., 2010; Andrade et al., 2012), receberam uma pupa de *D. hyalinata* em arena cilíndrica de plástico transparente com 2,2cm Ø e 1,8cm de altura. Essas fêmeas foram sexadas de acordo com as características morfológicas do abdômen (Delvare & LaSalle, 1993). Pupas de *D. hyalinata* ( $114 \pm 0,08$  mg) com 24h de idade foram expostas a uma (n= 34), duas (n= 27), três (n= 27), quatro (n= 24) ou cinco posturas (n= 21) pela mesma fêmea do parasitoide, monitorados sob filmagem e gravação acoplado a um microscópio estereoscópio. Após o parasitismo, os hospedeiros foram armazenados em tubos de ensaio de vidro (14 x 2,2 cm) a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 14 horas.

A competição entre imaturos de *P. elaeisis* foi observada em diferentes números de postura por pupa hospedeira. O número de machos e fêmeas emergido e a razão sexual (nº fêmeas emergidas/nº total de indivíduos emergidos) e o tempo de desenvolvimento foram analisados. Diferença de peso de fêmeas e machos dos parasitoides entre os tratamentos foi analisada e o peso (mg) contabilizado individualmente após a emergência. A biomassa de progênie produzida por pupa com diferentes densidades de postura foi obtida com o peso total dos indivíduos. O desempenho da progênie produzida por pupa sob diferentes densidades de postura, como estimativa da qualidade produtiva do parasitismo foi obtido com o número total e o peso de indivíduos (adaptado de Wei et al., 2013).

### **2.4. Monitoramento de imaturos do parasitoide em pupa hospedeira**

O tempo de duração ovo-pupa, o percentual de imaturos inviáveis de *P. elaeisis* em pupa de *D. hyalinata* e o sucesso do parasitismo foram observados em sistema de

radiografia digital MX-20 (Faxitron X-ray Corp, Wheeling, IL, EUA). O período de pupação foi observado com raio-x diariamente após o parasitismo com uma, duas, três, quatro e cinco posturas de *P. elaeisis*. O percentual de pupas com imaturos mortos foi contabilizado pela relação entre o número de pupas hospedeiras com larvas do parasitoide observadas em raio-x e o número de pupas com emergência de parasitoides.

A duração de ovo a pupa e o de pupa a emergência de adultos foram analisados para se avaliar se a competição por recurso afeta o tempo das fases imaturas.

## **2.5. Sobrevivência de adultos emergidos**

A sobrevivência de cada fêmea e macho de *P. elaeisis* foi avaliada diariamente em tubos de ensaio de vidro (14 x 2,2 cm), tampado com uma bola de algodão a  $25 \pm 2$  °C,  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa e 12 h de fotoperíodo e alimentados com mel.

## **2.6. Efeito da defesa imune do hospedeiro sobre imaturos**

A porcentagem de emergência de parasitoides e de pupas com imaturos inviáveis foram obtidas para se avaliar o efeito da

A defesa imune de pupas de *D. hyalinata* sobre imaturos de *P. elaeisis* com diferentes densidades de postura do parasitoide foi obtida com a porcentagem de emergência de parasitoides e de pupas com imaturos inviáveis. O percentual de pupas que emergiram parasitoides foi corrigido com a adição da mortalidade natural de *D. hyalinata*, obtida de 311 pupas sadias desse inseto durante quatro gerações.

## **2.7. Contagem de hemócitos**

Pupas de *D. hyalinata* ( $103 \pm 0,01$  mg) com 24h de idade, foram expostas a uma, duas, três, quatro ou cinco oviposições de fêmeas acasaladas de *P. elaeisis* com idade entre 72 e 96h (Pereira et al., 2009, 2010; Andrade et al., 2010, 2012) e observadas individualmente em sistema de filmagem e gravação acoplado a um microscópio estereoscópio. Após 24h, essas pupas foram lavadas com solução de hipoclorito de

sódio a 1% por cinco segundos e, a seguir, em água destilada. A hemolinfa (4  $\mu$ L) de pupas desse inseto foi coletada com micropipeta por uma pequena incisão na cabeça das mesmas e, em seguida, transferida para 20  $\mu$ L de solução anticoagulante (98 mM NaOH, 186 mM NaCl, 17 mM Na<sub>2</sub> EDTA e 41 mM de ácido cítrico, pH 4,5), para evitar a agregação dos hemócitos (Ibrahim & Kim, 2006).

Cada amostra foi corada com 4  $\mu$ L de Giemsa e duas alíquotas desta solução (8  $\mu$ L) adicionadas em cada lado da câmara de Neubauer (Linha Brilhante, New Optics). Os hemócitos totais e diferenciais foram quantificados em microscópio de luz. Cada tratamento teve dez repetições.

## **2.8. Encapsulamento**

O encapsulamento foi demonstrado pela aderência de hemócitos em filamento de náilon para se avaliar a defesa imune do hospedeiro sob o efeito de diferentes números de posturas de *P. elaeisis*. Pedacos de filamentos de náilon (2 mm x 0,2 mm  $\emptyset$ ) foram esterilizados com solução de hipoclorito de sódio a 1%, lavados em água destilada e implantados em pupas de *D. hyalinata* ( $109 \pm 0,01$  mg) com 24 horas de idade. As pupas foram individualmente parasitadas com uma (n= 13), duas (n= 10), três (n= 10), quatro (n=10) ou cinco (n=10) oviposições de fêmeas acasaladas de *P. elaeisis*. Após 48 horas, as pupas foram dissecadas e os implantes removidos. Os implantes foram fotografados em microscópio estereoscópio acoplado a uma câmera digital Axio Cam MRc5 para se analisar a capsula de melanização e a área de encapsulamento.

A resposta do encapsulamento foi medida pela camada de células ao redor do filamento de náilon (área com agregação de hemócitos), calculando-se a porcentagem de área encapsulada de todo o implante (Diamond & Kingsolver, 2011; Silva et al., 2013) com o software Axio Vision. As figuras dos implantes foram convertidas para escala de cinza com valores variando de 0 a 255 onde, sendo 0 o preto e 255 o branco

para mensurar a melanização. A média do valor cinza dos implantes foi analisado com o Software ImageJ 1.48v desenvolvido pelo US National Institutes of Health (<http://imagej.nih.gov/ij/download.html>). Os dados foram transformados para que o valor de cinza mais escuro correspondesse a mais alta taxa de melanização. A transformação dos valores observados para os implantes foi ajustada subtraindo-se o valor cinza de “fundo” (Andrade et al., 2010; de Souza et al., 2013).

## **2.9. Análise dos dados**

O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado. Os resultados dos parâmetros reprodutivos e de desenvolvimento da progênie foram submetidos a análise de regressão. A probabilidade de pupação de imaturos e do período entre pupa e a emergência de *P. elaeisis* foi obtida com a análise de Probit ( $p < 0,05$ ) pelo programa SAS. Os valores dos hemócitos, em diferentes densidades de parasitoide, foram analisados por regressão e graficamente representados usando o programa SigmaPlot 12.0 ( $p < 0,05$ ). Os valores adimensionais, para a taxa de encapsulamento, foram comparados por análise de regressão ( $p < 0,05$ ). As curvas de sobrevivência de cada sexo por pupa foram obtidas utilizando-se estimadores Kaplan-Meyer no software SAS e graficamente representadas por meio do programa SigmaPlot 12.0 ( $p < 0,05$ ). A longevidade mediana de fêmeas e machos por pupa foi submetidos à análise de regressão e representadas pelo software SigmaPlot 12.0 ( $p < 0,05$ ).

## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Competição larval de parasitoides**

O número de parasitoides emergidos de *P. elaeisis* aumentou com até três posturas apresentando número máximo de indivíduos ajustado pelo modelo quadrático ( $F_{2,51} = 8,27$ ;  $p < 0,0008$ ) (Figura 1A). O número total de fêmeas mostrou curva

semelhante ao de total de indivíduos, com maior número de fêmeas com até três oviposições ( $F_{2,51} = 9,04$ ;  $p < 0,0004$ ) (Figura 1B). O número de machos foi semelhante entre tratamentos, assim como o peso de fêmea ( $0,42 \pm 0,006$ ) e macho ( $0,17 \pm 0,004$ ) e a razão sexual ( $0,92 \pm 0,01$ ).

O desempenho de parasitoides, relação entre o número de indivíduos e peso, mostrou comportamento similar à curva do número total de indivíduos e de fêmeas, com aumento e valor máximo com três oviposições ( $F_{2,51} = 8,6$ ;  $p = 0,001$ ) (Figura 1C). A biomassa de insetos emergidos também foi maior com até três oviposições ( $F_{2,53} = 7,70$ ;  $p = 0,001$ ) (Figura 1D).

### **3.2. Monitoramento de imaturos do parasitoide em pupa hospedeira**

Larvas de *P. elaeisis* empuparam mais rápido com três oviposições desse parasitoide (Probit,  $p > 0,05$ ) com desenvolvimento médio estimado de ovo a pupa em torno de dez dias, seguida por larvas com cinco oviposições visualizados em raio-x (Figura 2A, C). O tempo entre o período de pupa e a emergência de *P. elaeisis* foi praticamente constante com três oviposições, variando para os demais tratamentos (Probit,  $p > 0,05$ ) (Figura 2B). O tempo de desenvolvimento de *P. elaeisis* (ovo-adulto) foi menor com três oviposições desse parasitoide observado pelo ajuste do modelo quadrático ( $F_{2,47} = 9,94$ ;  $p = 0,0002$ ) (Figura 2D).

### **3.3. Sobrevivência de adultos emergidos**

A sobrevivência de *P. elaeisis* difere significativamente entre os números de oviposições para fêmeas (Log-rank test,  $\chi^2 = 43,216$ , g.l. = 4,  $p < 0,001$ ) e machos (Log-rank test,  $\chi^2 = 26,9$ , g.l. = 4,  $p < 0,001$ ) (Figura 3A, 3C). Fêmeas e machos de pupas com uma oviposição sobreviveram mais que indivíduos dos demais tratamentos (Holm-Sidak,  $p < 0,05$ ) (Figura 3B, 3D). A longevidade de fêmeas ( $FI_{,57} = 6,39$ ;  $p = 0,014$ ) e machos ( $FI_{,44} = 12,46$ ;  $p = 0,0009$ ) foi maior com uma oviposição (Figura 3B, 3D).

### 3.4. Efeito da defesa imune do hospedeiro sobre imaturos

A porcentagem de emergência de *P. elaeisis* por pupa aumentou com o número de posturas desse parasitoide ( $F_{1,3} = 62,48$ ;  $p = 0,004$ ). O percentual de emergência foi de 36,8% e de 69,3 % com a menor e maior densidade de oviposição, respectivamente (Figura 4A).

Os tratamentos com uma, duas e três oviposições tiveram 40, 25 e 6,6% de pupas com imaturos mortos, respectivamente ( $F_{1,3} = 23,49$ ;  $p = 0,01$ ) (Figura 4B; Figura 4C). Pupas com quatro e cinco oviposições não tiveram larvas inviáveis. O sucesso de parasitismo foi de 100% em todos os tratamentos e a mortalidade natural de pupas de *D. hyalinata* foi de 7,4%.

### 3.5. Densidade de hemócitos

O número de hemócitos totais circulantes na hemolinfa de pupas de *D. hyalinata* reduziu de  $3,73 \times 10^6$  de células  $\text{mL}^{-1}$  com uma oviposição para  $2,29 \times 10^6$  de células  $\text{mL}^{-1}$  em pupas parasitadas cinco vezes ( $F_{1,49} = 10,86$ ;  $p = 0,001$ ) (Figura 5A).

O número de granulócitos circulantes na hemolinfa, também, decresceu linearmente com o número de oviposições do parasitoide. A variação foi quase três vezes menor, de  $1,44 \times 10^6$  de células  $\text{mL}^{-1}$  para  $0,5 \times 10^6$  de células  $\text{mL}^{-1}$  ( $F_{1,49} = 35,29$ ;  $p = 0,0001$ ), com o menor e maior número de oviposições, respectivamente (Figura 5B).

O número de plasmatócitos circulantes na hemolinfa de pupas de *D. hyalinata* se ajustou ao modelo quadrático e decresceu com o superparasitismo com até três oviposições comparado com o menor número de oviposição,  $0,7 \times 10^6$  de células  $\text{mL}^{-1}$  e  $0,3 \times 10^6$  de células  $\text{mL}^{-1}$  ( $F_{2,48} = 4,0$ ;  $p = 0,02$ ), respectivamente (Figura 5C).

O total de prohemócitos, decresceu linearmente com o aumento do número de oviposições,  $0,59 \times 10^6$  de células  $\text{mL}^{-1}$  para  $0,19 \times 10^6$  de células  $\text{mL}^{-1}$  ( $F_{1,49} = 14,64$ ;  $p < 0,0004$ ) (Figura 5D).

Oenocitóides e esferulócitos circulantes na hemolinfa mostraram padrão aleatório entre tratamentos e não diferiram entre os tratamentos (Figura 5E e F).

### **3.6. Encapsulamento**

O encapsulamento entre os diferentes números de posturas mostrou aderência e agregação de células (área totalmente escura) ao redor do filamento de náilon implantado nas pupas (Figura 6). A taxa de encapsulamento decresceu linearmente de 81,09% para 9,75% da área encapsulada, do menor para maior número de oviposições de *P. elaeisis*, respectivamente ( $F_{1,51} = 77,83$ ;  $p = 0,0001$ ) (Figura 6A, C). O aumento da densidade de oviposições pelo parasitoide decresceu a melanização ajustada pelo modelo quadrático ( $F_{2,50} = 4,28$ ;  $p = 0,01$ ) (Figura 6B, C).

## **4. DISCUSSÃO**

### **4.1. Competição larval de parasitoides**

O maior número de indivíduos e particularmente de fêmeas emergidos de pupas com três posturas indica o ponto ótimo de maior sobrevivência e competição por recursos entre parasitoides imaturos na pupa de *D. hyalinata*. Abaixo deste limiar de posturas a resposta imune do hospedeiro reduziu o número de indivíduos. A redução da progênie de *P. elaeisis* em pupas ovipositadas quatro e cinco vezes é devido à adequação no número de descendentes (Zaviezo & Mills, 2000; Jaramillo et al., 2006) em pupas de *D. hyalinata*, por consequência da capacidade do hospedeiro ter sido excedida (Keinan et al., 2012) como em *Manduca sexta* (Lepdoptera: Sphingidae) onde a sobrevivência da prole de *Cotesia congregata* (Hymenoptera: Braconidae) se aproximou de zero com o aumento de imaturos (Alleyne & Beckage, 1997).

O peso semelhante de fêmeas e de machos entre os diferentes níveis de competição pode ter sido mascarada pela quantidade de recurso consumida pelos indivíduos no hospedeiro. Os primeiros imaturos colocados no hospedeiro podem

aproveitar melhor os recursos (Dorn et al., 2007) devido ao maior intervalo entre as oviposições e, teratócitos, células injetadas durante a oviposição por parasitoides, podem fornecer nutrientes adicionais (Falabella et al., 2000; Harvey et al., 2013) como relatado para Ichneumonoidea, Platygastroidea e Chalcidoidea (Volkoff & Colazza, 1992; Mackauer & Chau, 2001; Pedata et al., 2003).

A falta de impacto do aumento de posturas na razão sexual em *P. elaeisis* deve-se ao fato da relação entre o número de imaturos ovipositados e a razão sexual variar entre os parasitoides gregários (Dorn et al., 2007). No entanto, o parasitismo aumentou o número de machos de *C. glomerata* (Gu et al., 2003) reduziu o de *N. vitripennis* e *B. hebetor* (King, 1993) e não alterou o de *T. evanescens* (van Dijken & Waage, 1987) indicando que a qualidade do hospedeiro pode regular a razão sexual (Suzuki et al., 1984; Darrouzet et al., 2008).

A maior biomassa de parasitoides em pupas com três posturas de *P. elaeisis* foi atribuído, principalmente, ao maior número de indivíduos emergidos. Isto foi devido ao compartilhamento de recursos pelas larvas, fenômeno comum em endoparasitoides gregários (Harvey et al., 2013). Abaixo e acima de três posturas, o elevado encapsulamento de imaturos e maior competição de larvas por recursos, respectivamente, reduziu a biomassa de parasitoides.

#### **4.2. Monitoramento de imaturos do parasitoide em pupa hospedeira em raios-x**

A maior competição por recursos em pupas com três posturas reduziu o período de pupação do parasitoide e, conseqüentemente, o tempo de desenvolvimento dos indivíduos. Isto indica que a competição por alimento na fase de larva, é fator determinante para o ciclo de vida de *P. elaeisis* com valor constante em dias da fase de pupa a emergência deste parasitoide com três oviposições. Por outro lado, o menor número de indivíduos em pupas com uma e duas posturas aumentou o tempo de

desenvolvimento devido a maior quantidade de recurso e do seu lento consumo pelos imaturos. O desenvolvimento mais rápido de *Oomyzus sokolowskii* (Kurdjumov, 1912) (Hymenoptera: Braconidae) no hospedeiro *Plutella xylostella* (L., 1758) (Lepidoptera: Plutellidae) também foi devido à restrição do recurso (Silva-Torres et al., 2009).

#### **4.3. Sobrevivência de adultos**

A maior sobrevivência e longevidade de fêmeas e machos em pupas com uma oviposição é devido à baixa competição por recurso (Parker & Mock, 1987; Godfray, 1995) dos indivíduos imaturos em menor número por hospedeiro. Por outro lado, a menor sobrevivência e longevidade de fêmeas e machos com duas a cinco oviposições se deve ao menor aproveitamento nutricional pela alta competição.

#### **4.4. Efeito da defesa imune celular do hospedeiro sobre imaturos**

A maior taxa de emergência de parasitoides e a ausência de imaturos mortos observados em raio-x com o aumento linear do número de oviposições, sustenta a hipótese do superparasitismo ser uma estratégia de *P. elaeisis* para suprimir a imunidade do hospedeiro e garantir uma maior proporção de imaturos sobreviventes, indicador de ganho de desempenho (Koppik et al., 2014). O parasitoide gregário *Cotesia flavipes* apresentou uma relação inversa com grande mortalidade de progênies (58%) em hospedeiro superparasitado em comparação com parasitados (16%) (Potting et al., 1997). No entanto, fêmeas deste parasitoide evitam ovipositar em hospedeiros parasitados (Potting et al., 1997) mostrando que o tipo de efeito do superparasitismo pode variar entre espécies de parasitoides (Gu et al., 2003) em função de uma estratégia adaptativa.

O sucesso do parasitismo de *P. elaeisis* em 100 % das pupas de *D. hyalinata* com diferentes números de oviposições mostrou a eficiência desse parasitoide sobre esse hospedeiro. O alto nível de parasitismo pode estar relacionado à baixa defesa

imune de pupas de *D. hyalinata* pelo seu pequeno tamanho (Silva et al., 2014), o que aumenta sua vulnerabilidade às substâncias injetadas por fêmeas durante a oviposição ou secreções de suas progênes (Harvey et al., 2013) que alterara o metabolismo (Bae & Kim, 2004) e causa a sua morte (Hoang, 2002). Pode estar ainda relacionado à toxicidade pela síntese de severos subprodutos tóxicos envolvidos na melanização (Söderhäll & Cerenius, 1998) nocivas as suas próprias células (Ashida & Brey, 1995; Söderhäll & Cerenius, 1998) por consequência da grande quantidade de energia direcionada a defesa imune (Hoang, 2002) ou ao grande número de imaturos ovipositados porque o desenvolvimento do hospedeiro depende do número de larvas no seu interior (Harvey, 2000) que exaure os recursos e causam a morte prematura do hospedeiro (Brodeur & Boivin, 2004; Kaspi et al., 2011).

#### **4.5. Densidade de hemócitos**

Os cinco tipos de hemócitos circulantes (prohemócitos, oenocitóides, plasmatócitos, granulócitos e esferulócitos) em *D. hyalinata* foram, também, observados em outros lepidópteros, mas, a sua quantidade varia com a espécie (Ribeiro & Brehélin, 2006; Zhai & Zhao, 2012; Zhang et al., 2012).

O decréscimo linear do número de hemócitos totais com o aumento do número de oviposições de *P. elaeisis* mostra que a resposta imuno-celular do hospedeiro varia com poucas posturas deste endoparasitoide, o que é importante para o controle biológico.

A redução do número de prohemócitos com o aumento do número de oviposições pode ter comprometido a reposição das demais células por serem células indiferenciadas (Lavine & Strand, 2002, Strand, 2008; James & Xu, 2012), como plasmatócitos e granulócitos circulantes, também, em menores números na hemolinfa de *D. hyalinata* com três e maiores densidades de oviposições, respectivamente.

Plasmatócitos e granulócitos, células mais abundantes em Lepidoptera (Strand & Pech, 1995; Strand, 2008), são as primeiras células a entrar em contato com os organismos invasores (Stoepler et al., 2013) para o processo de encapsulamento (Pech & Strand, 1996; Uçkan et al., 2010; Stoepler et al., 2013). A redução significativa do número de hemócitos pode ser devido a maior quantidade de ovos injetados no hospedeiro, o que leva à uma maior exaustão do sistema imune do hospedeiro (Sagarra et al. 2000) e à alterações morfológicas e indução de apoptose, com morte das células (Glatz et al., 2004; Zhang et al., 2012) por polydnaviruses (PDVs), partículas semelhantes a vírus (VLPs), venenos, teratócitos e proteínas do ovário injetadas no hospedeiro durante a oviposição e que também, podem reduzir o encapsulamento (Zhang et al., 2012; Harvey et al., 2013). Polydnaviruses são vírus simbióticos associados à Braconidae e Ichneumonidae (Bai et al., 2011; Zhang et al., 2012); teratócitos a Braconidae (Shaw & Huddleston, 1991; Mackauer & Chau, 2001; Bai et al., 2011), Scelionidae (Strand et al., 1985; Volkoff & Colazza, 1992) Ichneumonidae (Rouleux-Bonnin et al., 1999) e Aphelinidae (Pedata et al., 2003) e, venenos a Eulophidae (Uçkan et al., 2004; Bai et al., 2011).

#### **4.6. Encapsulamento**

A menor taxa de encapsulamento de implantes de náilon com maior número de oviposições de *P. elaeisis* é semelhante ao relatado para o endoparasitoide *Metaphycus flavus* (Hymenoptera: Encyrtidae) no hospedeiro *Coccus hesperidum* (Hemiptera: Coccidae) (Tena et al. 2008) e para diferentes densidades de indivíduos de *P. elaeisis* em *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) e deve-se à baixa quantidade de granulócitos e plasmatócitos circulantes. Parasitoides podem regular o ambiente interno do hospedeiro criando um local adequado para otimizar o desenvolvimento, sobrevivência e desempenho dos imaturos (Harvey et al., 2013),

incluindo a inibição da resposta celular com a morte de hemócitos responsáveis pela identificação e encapsulamento do invasor (Suzuki & Tanaka, 2006). Isto pode ter reduzido a taxa de melanização que ocorre após a formação de uma cápsula em torno do invasor por hemócitos (Marmaras & Lampropoulou, 2009). Isto explica a baixa mortalidade de imaturos de *P. elaeisis* com o aumento de oviposições por fome, asfixia e intoxicação de compostos oriundos da melanização durante a síntese de melanina, produto de reações envolvendo a via tirosina-profenoxidase (Fisher, 1963; Chen & Chen, 1995; Nappi & Ottaviani, 2000).

## 5. CONCLUSÕES

A oviposição por três vezes maximizou a progênie, reduziu o tempo de desenvolvimento e aumentou o desempenho de *P. elaeisis*. Isto mostra a redução ou supressão da defesa imune celular e humoral do hospedeiro com o ajuste do número de competidores por recurso.

O superparasitismo é uma estratégia em *P. elaeisis* para o aumento de sobrevivência e desempenho da prole.

## REFERÊNCIAS

- Alves-Costa C, Knogge C (2005) Larval competition in weevils *Revena rubiginosa* (Coleoptera: Curculionidae) preying on seeds of the palm *Syagrus romanzoffiana* (Arecaceae). *Naturwissenschaften* 92: 265–268.
- Andrade GS, Serrão JE, Zanuncio JC, Zanuncio TV, Leite GLD, Polanczyk RA (2010) Immunity of an alternative host can be overcome by higher densities of its parasitoids *Palmistichus elaeisis* and *Trichospilus diatraeae*. *PLoS ONE* 5: e13231. doi:10.1371/journal.pone.0013231
- Andrade GS, Sousa AH, Santos JC, Gama FC, Serrão JE, Zanuncio JC (2012) Oogenesis pattern and type of ovariole of the parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). *An Acad Bras Ciênc* 84: 767–774.
- Alleyne M, Beckage NE (1997) Parasitism-induced effects on host growth and metabolic efficiency in tobacco hornworm larvae parasitized by *Cotesia congregata*. *J Insect Physiol* 43: 407 – 424.
- Ashida M, Brey PT (1995) Role of the integument in insect defense: pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1068–1072.
- van Alphen, JJM Visser ME (1990) Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. *Annu Rev Entomol* 35: 59–79.
- Bae S, Kim Y (2004) Host physiological changes due to parasitism of a braconid wasp, *Cotesia plutellae*, on diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 138: 39–44.
- Bai S, Li X, Chen X, Cheng J, He J (2011) Interspecific competition between two endoparasitoids *Cotesia vestalis* (Hymenoptera: Braconidae) and *Oomyzus sokolowskii* (Hymenoptera: Eulophidae). *Arch Insect Biochem* 76: 156–167.
- Brodeur J, Boivin G (2004) Functional ecology of immature parasitoids. *Annu Rev*

- Entomol 49: 27–49.
- Charnov EL, Skinner SW (1984) Evolution of host selection and clutch size in parasitoid wasps. Fla Entomol 67: 5–21.
- Chen CC, Chen CS (1995) *Brugia pahangi*: Effects of melanization on the uptake of nutrients by microfilariae in vitro. Exp Parasitol 81: 72–78.
- Chichera RA, Pereira FF, Kassab SO, Barbosa RH, Pastori PL, Rossoni C (2012) Capacidade de busca e reprodução de *Trichospilus diatraeae* e *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) em pupas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). Interciência 37: 1–5.
- Darrouzet E, Boivin G, Chevrier C (2008) Sex allocation decision under superparasitism by the parasitoid wasp *Eupelmus vuilleti*. J Insect Behav 21: 181–191.
- Delvare G, LaSalle JA (1993) New genus of Tetrastichinae (Hymenoptera: Eulophidae) from the neotropical region, with the description of a new species parasitica on key pests of oil palm. J Nat Hist 27: 435–444.
- de Souza DJ, Lenoir A, Kasuya MCM, Ribeiro MMR, Devers S, Couceiro JdC, Lucia TMC (2013) Ectosymbionts and immunity in the leaf-cutting ant *Acromyrmex subterraneus subterraneus*. Brain Behav Immun doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2012.11.014>
- Diamond SE, Kingsolver JG (2011) Host plant quality, selection history and trade-offs shape the immune responses of *Manduca sexta*. Proc R Soc B 278: 289 – 297.
- van Dijken MJ, Waage JK (1987) Self and conspecific superparasitism by the egg parasitoid *Trichogramma evanescens*. Entomol Exp Appl 43: 183 – 192.
- Dorn S, Beckage NE. 2007. Superparasitism in gregarious hymenopteran parasitoids: ecological, behavioural and physiological perspectives. Physiol Entomol 32:199

- Falabella P, Tremblay E, Pennacchio F (2000) Host regulation by the aphid parasitoid *Aphidius ervi*: the role of teratocytes. *Entomol Exp Appl* 97: 1 – 9.
- Fisher RC (1963) Oxygen requirements and the physiological suppression of supernumary insect parasitoids. *J Exp Biol* 38: 605–658.
- Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T (1997) Biological mediators of insect immunity. *Annu Rev Entomol* 42: 611–643.
- Glatz RV, Asgari S, Schmidt O (2004) Evolution of polydnviruses as insect immune suppressors. *Trends Microbiol* 12: 545–554.
- Godfray HCJ (1995) Evolutionary theory of parent-offspring conflict. *Nature* 376: 133–138.
- Greene GL, Leppla NC, Dickerson WA (1976) Velvetbean caterpillar: A rearing procedure and artificial diet. *J Econ Entomol* 69: 487–488.
- Gu H, Wang Q, Dorn S (2003) Superparasitism in *Cotesia glomerata*: response of hosts and consequences for parasitoids. *Ecol Entomol* 28: 422–431
- Guedes RNC, Guedes NMP, Smith RH (2007) Larval competition within seeds: from the behaviour process to the ecological outcome in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. *Austral Ecol* 32: 697–707.
- Harvey JA (2000) Dynamic effects of parasitism by an endoparasitoid wasp on the development of two host species: implications for host quality and parasitoid fitness. *Ecol Entomol* 25: 267–78.
- Harvey JA, Poelman EH, Tanaka T (2013) Intrinsic inter- and intraspecific competition in parasitoid wasps. *Annu Rev Entomol* 58: 333–51.
- Hoang A (2002) Physiological consequences of immune response by *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae) against the parasitoid *Asobara tabida*

- (Hymenoptera: Braconidae). *J Evol Biol* 15: 537–543.
- Ibrahim AMA, Kim Y (2006) Parasitism by *Cotesia plutellae* alters the hemocyte population and immunological function of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *J Insect Physiol* 52: 943–950.
- James RR, Xu J (2012) Mechanisms by which pesticides affect insect immunity. *J Invert Pathol* 109: 175–182.
- Jaramillo J, Borgemeister C, Setamou M (2006) Field superparasitism by *Phymastichus coffea*, a parasitoid of adult coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. *Entomol Exp Appl* 119: 231 – 237.
- Kaspi R, Yuval B, Parrella MP. 2011. Anticipated host availability increases parasitoid host attack behaviour. *Anim Behav* 82:1159 –1165.
- Kapranas A, Hardy ICW, Morse JG, Luck RF (2011) Parasitoid developmental mortality in the field: patterns, causes and consequences for sex ratio and virginity. *J Anim Ecol* 80: 192–203.
- Keinan Y, Kishinevsky M, Segoli M, Keasar T (2012) Repeated probing of hosts: an important component of superparasitism. *Behav Ecol* 23: 1263 – 1268.
- King BH (1993) Sequence of offspring sex production in the parasitoid wasp, *Nasonia vitripennis*, in response to unparasitized versus parasitized hosts. *Anim Behav* 45: 1236 – 1238.
- Klomp H, Teerink BJ (1962) Host selection and number of eggs per oviposition in the egg parasite *Trichogramma embryophagum* Htg. *Nature* 195: 1020–1021.
- Koppi, M, Thiel A, Hoffmeister TS (2014) Adaptive decision making or differential mortality: what causes offspring emergence in a gregarious parasitoid? *Entomol Exp Appl* 150: 208–216.
- Lavine, MD, Strand MR (2002) Insect hemocytes and their role in cellular immune

- responses. *Insect Biochem Molec* 32: 1295–1309.
- Mackauer M, Chau A (2001) Adaptive self superparasitism in a solitary parasitoid wasp: the influence of clutch size on offspring size. *Funct Ecol* 15: 335–343.
- Mafi S, Ohbayashi N (2010) Biology of *Chrysocharis pentheus*, an endoparasitoid wasp of the citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* stainton. *J Agr Sci Tech* 12: 145–154.
- Marmaras VJ, Lampropoulou M (2009) Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cellular Signalling* 21: 186–195.
- Montoya P, Pérez-Lachaud G, Liedo P (2012) Superparasitism in the fruit fly parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae) and implications for mass rearing and augmentative release. *Insects* 3: 900–911.
- Narayanan K (2004) Insect defence: its impact on microbial control of insect pests. *Curr Sci India* 86: 800–814.
- Nappi AJ, Ottaviani E (2000) Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. *BioEssays* 22: 469–480.
- Parker GA, Mock DW (1987) Parent-offspring conflict over clutch size. *Evol Ecol* 1: 161–174.
- Pech LL, Strand MR (1996) Granulocytes are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *J Cell Sci* 109: 2053–2060.
- Pedata P, Garonna AP, Zabatta A, Zeppa P, Romani R, et al. (2003) Development and morphology of teratocytes in *Encarsia berlesei* and *Encarsia citrina*: first record for Chalcidoidea. *J Insect Physiol* 49:1063–71.
- Pereira FF, Zanuncio TV, Zanuncio JC, Pratisoli D, Tavares MT (2008) Species of Lepidoptera defoliators of eucalypt as new hosts for the polyphagous parasitoid *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). *Braz Arch Biol Techn* 51:

259–262.

- Pereira FF, Zanuncio JC, Serrão JE, Oliveira HN, Fávero K, Grance ELV (2009) Progenie de *Palmistichus elaeisis* Delvare & LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) parasitando pupas de *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae) de diferentes idades. *Neotrop Entomol* 38: 660–664.
- Pereira FF, Zanuncio JC, Serrão JE, Zanuncio TV, Pratisoli D, Pastori PL (2010) The density of females of *Palmistichus elaeisis* Delvare and LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae) affects their reproductive performance on pupae of *Bombyx mori* L. (Lepidoptera: Bombycidae). *An Acad Bras Ciênc* 82: 323–331.
- Potting RPJ, Snellen HM, Vet LEM (1997) Fitness consequences of superparasitism and mechanism of host discrimination in the stemborer parasitoid *Cotesia flavipes*. *Entomol Exp Appl* 82: 341–348.
- Pratisoli D, Polanczyk RA, Holtz AM, Tamanhoni T, Celestino FN, Borges Filho RC (2008) Influence of nutritional substrates on the development of *Diaphania hyalinata* L. (Lepidoptera: Crambidae). *Neotrop Entomol* 37: 361–364.
- Ribeiro C, Brehélin M (2006) Insect haemocytes: what type of cell is that? *J Insect Physiol* 52: 417–429.
- Roitberg BD, Mangel M (1988) On the evolutionary ecology of marking pheromones. *Evol Ecol* 2: 289–315.
- Rosenheim JA, Hongkham D (1996). Clutch size in an obligately siblicidal parasitoid wasp. *Anim Behav* 51: 841–852.
- Rouleux-Bonnin F, Renault S, Rabouille A, Periquet G, Bigot Y (1999) Free serosal cells originating from the embryo of the wasp *Diadromus pulchellus* in the pupal body of parasitized leekmoth *Acrolepiosis assectella*. Are these cells teratocytes-like? *J Insect Physiol* 45: 479–484.

- Sagarra LA, Peterkin DD, Vincent C, Stewart RK (2000) Immune response of the hibiscus mealybug, *Maconellicoccus hirsutus* Green (Homoptera: Pseudococcidae), to oviposition of the parasitoid *Anagyrus kamali* Moursi (Hymenoptera: Encyrtidae). *J Insect Physiol* 46: 647–653.
- Silva FWS, Viol DL, Faria SV, Lima E, Valicente FH, Elliot SL (2013) Two's a crowd: phenotypic adjustments and prophylaxis in *Anticarsia gemmatalis* e larvae are triggered by the presence of Conspecifics. *Plos one* 8(4): e61582. doi:10.1371/journal.pone.0061582
- Silva IM, Zanuncio TV, Pereira JMM, Wilcken CF, Pereira FF, Serrão JE, Zanuncio, JC (2014) Density of *Trichospilus diatraeae* (Hymenoptera: Eulophidae) Parasitizing *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae) Pupae. *Ann Entomol Soc Am* 107: 826–831.
- Silva-Torres CSA, Ramos Filho IT, Torres JB, Barros R (2009) Superparasitism and host size effects in *Oomyzus sokolowskii*, a parasitoid of diamondback moth. *Entomol Exp Appl* 133: 65–73.
- Söderhäll K, Cerenius L (1998) Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol* 10: 23–28.
- Slansky FJr (1986) Nutritional ecology of endoparasitic insects and their hosts: an overview. *J Insect Physiol* 32: 255–261.
- Slansky FJr (1978) Utilization of energy and nitrogen by larvae of the imported cabbageworm, *Pieris rapae*, as affected by parasitism by *Apanteles glomeratus*. *Environ Entomol* 7: 179–185.
- Smith, R. H. 1991. Genetic and phenotypic aspects of life-history evolution in animals. *Adv Ecol Res* 21: 63–120.
- Strand MR, Quarles JM, Meola SM, Vinson SB (1985) Cultivation of teratocytes of the

- egg parasitoid *Telenomus heliothidis* (Hymenoptera: Scelionidae). In vitro Cell Dev Biol - Plant 21: 361–367.
- Strand, M.R., Pech, L.L., 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid–host relationships. Annu. Rev. Entomol. 40, 31–56.
- Strand MR (2008) The insect cellular immune response. Insect Sci 15: 1–14.
- Stoepler TM, Castillo JC, Lill JT, Eleftherianos I (2013) Hemocyte density increases with developmental stage in an immune-challenged forest caterpillar. PLoS ONE 8(8): e70978. doi:10.1371/journal.pone.0070978
- Suzuki, Y, Tsuji H, Sasakawa M (1984) Sex allocation and effects of superparasitism on secondary sex ratios in the gregarious parasitoid, *Trichogramma chilonis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). Anim Behav 32:478–84.
- Suzuki M, Tanaka T (2006) Virus-like particles in venom of *Meteorus pulchricornis* induce host hemocyte apoptosis. J Insect Physiol 52: 602–613.
- Tena A, Kapranas A, Garcia-Marí F, Luck, RF (2009) Larval cannibalism during the late developmental stages of a facultatively gregarious encyrtid endoparasitoid. Ecol Entomol 34: 669–676.
- Tena A, Kapranas A, Garcia-Mari F. Luck RF (2008) Host discrimination, superparasitism, and infanticide by a gregarious endoparasitoid. Anim Behav 76: 789–799.
- Uçkan F, Er A, Ergin E (2010) Levels of encapsulation and melanization in (Lepidoptera: Pyralidae) parasitized and envenomated by *Pimpla turionellae* (Hymenoptera: Ichneumonidae). J Appl Entomol 134: 718–726.
- Uçkan F, Sinan S, Savasci S, Ergin E (2004) Determination of venom components from the endoparasitoid wasp *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). Ann Entomol Soc Am 97: 775–780.

- Vet LEM, Datema A, Welzen K van Snellen H (1993). Clutch size in a larval-pupal endoparasitoid. 1. Variation across and within host species. *Oecologia* 95: 410–415.
- Vinson SB, Hegazi EM (1998) A possible mechanism for the physiological suppression of conspecific eggs and larvae following superparasitism by solitary endoparasitoids. *J Insect Physiol* 44:703–712.
- Volkoff N, Colazza S, (1992) Growth patterns of teratocytes in the immature stages of *Trissolcus basalis* (Woll.) (Hymenoptera: Scelionidae), an egg parasitoid of *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). *Int J Insect Morphol Embryol* 21: 323–336.
- Zanuncio JC, Pereira FF, Jaques GC, Tavares, MT, Serrao JE (2008) *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera: Tenebrionidae), a new alternative host to rear the pupae parasitoid *Palmistichus elaeisis* Delvare and LaSalle (Hymenoptera: Eulophidae). *Coleopta Bull* 62: 64–66.
- Zaviezo T, Mills N (2000) Factors influencing the evolution of clutch size in a gregarious insect parasitoid. *J Anim Ecol* 69: 1047–1057.
- Zhai X, Zhao XF (2012) Participation of haemocytes in fat body degradation via cathepsin L expression. *Insect Mol Biol* 21: 521–534.
- Zhang Qian-Qian; Huang Jia; Zhu Jia-Ying, Ye Gong-Yin (2012) Parasitism of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) by the endoparasitic wasp *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae): Effects of parasitism on differential hemocyte counts, micro- and ultra-structures of host hemocytes. *Insect Sci* 19: 485–497.
- Wei K, Tang Y-L, Wang X-Y, Cao L-M, Yang Z-Q (2013) The developmental strategies and related profitability of an idiobiont ectoparasitoid *Sclerodermus pupariae* vary with host size. *Ecol Entomol* 39: 101–108.

White JA, Andow DA (2008) Benefits of self-superparasitism in a polyembryonic parasitoid. *Biol Control* 46: 133 –139.

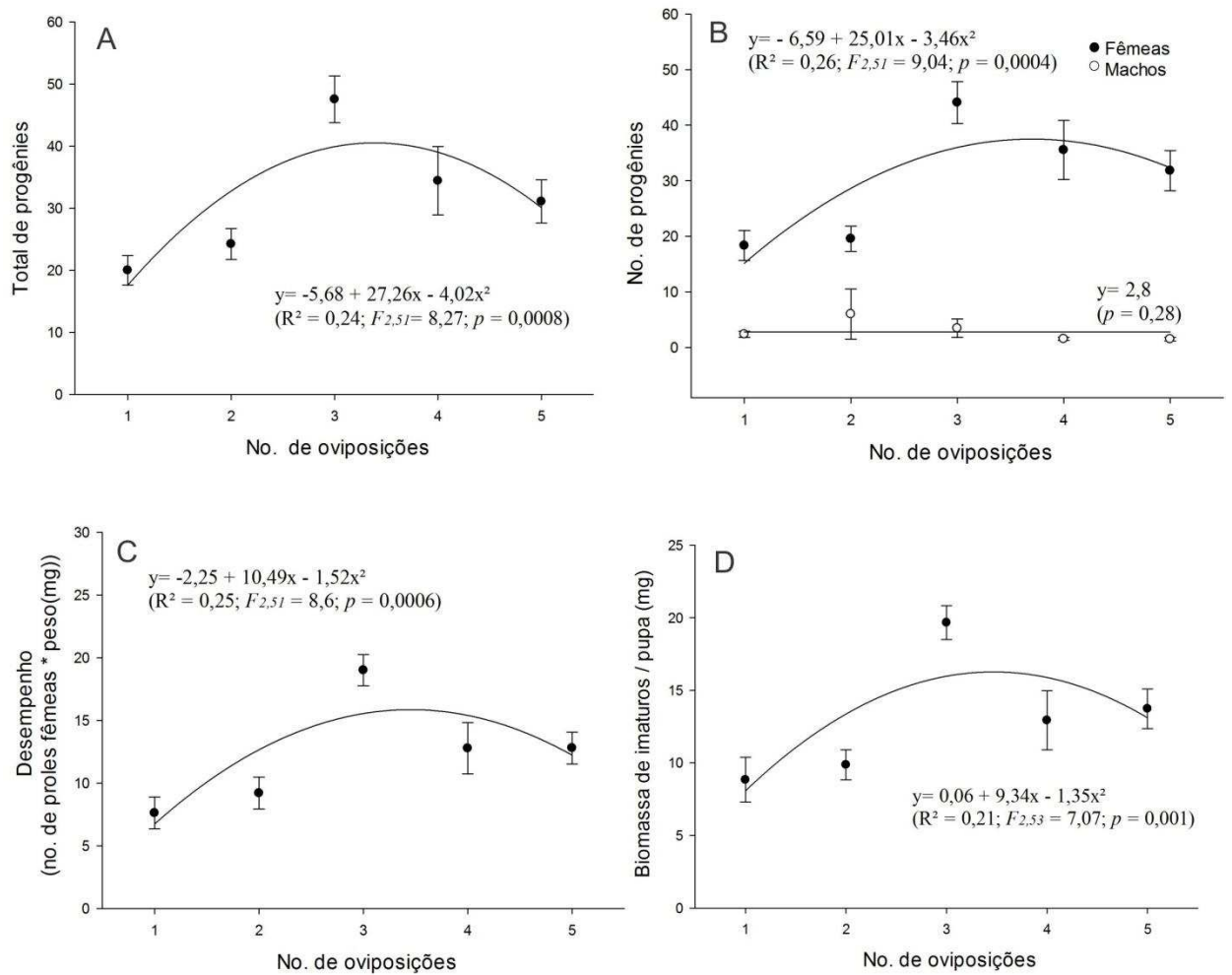


Figura1. (A) Total de parasitoides emergidos. (B) número de machos e fêmeas de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) por pupa. (C) Desempenho (relação entre número e peso de parasitoides) de progênie de *P. elaeisis*. (D) biomassa de indivíduos emergidos por pupa de *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae) com acréscimo de oviposições do parasitoide.

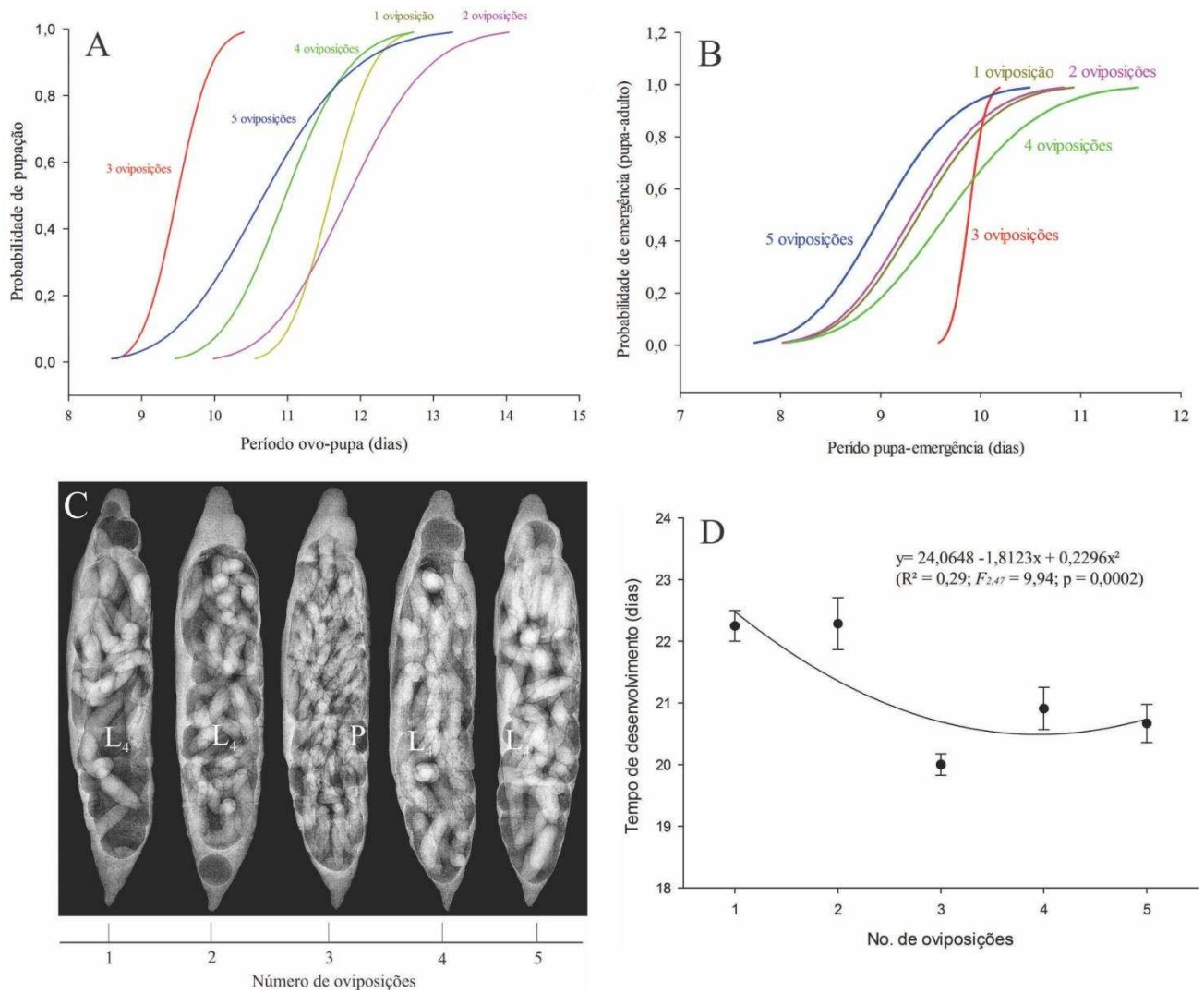


Fig 2. Competição de imaturos de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) com diferentes números de oviposições na velocidade de desenvolvimento. (A) Probabilidade da velocidade de pupação (desenvolvimento de ovo – pupa) em dias entre diferentes níveis de competição. (B) Probabilidade de tempo de emergência (pupa-adulto). (C) Pupação antecipada de *P. elaeisis* com alta densidade de imaturos deste parasitoide em pupa de *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae) com três oviposições após dez dias de parasitismo em raio-x. O estágio de desenvolvimento (se larva ou pupa) é indicado (L ou P, respectivamente; L<sub>4</sub> – estágio larval). (D) Tempo de desenvolvimento (ovo a adulto).

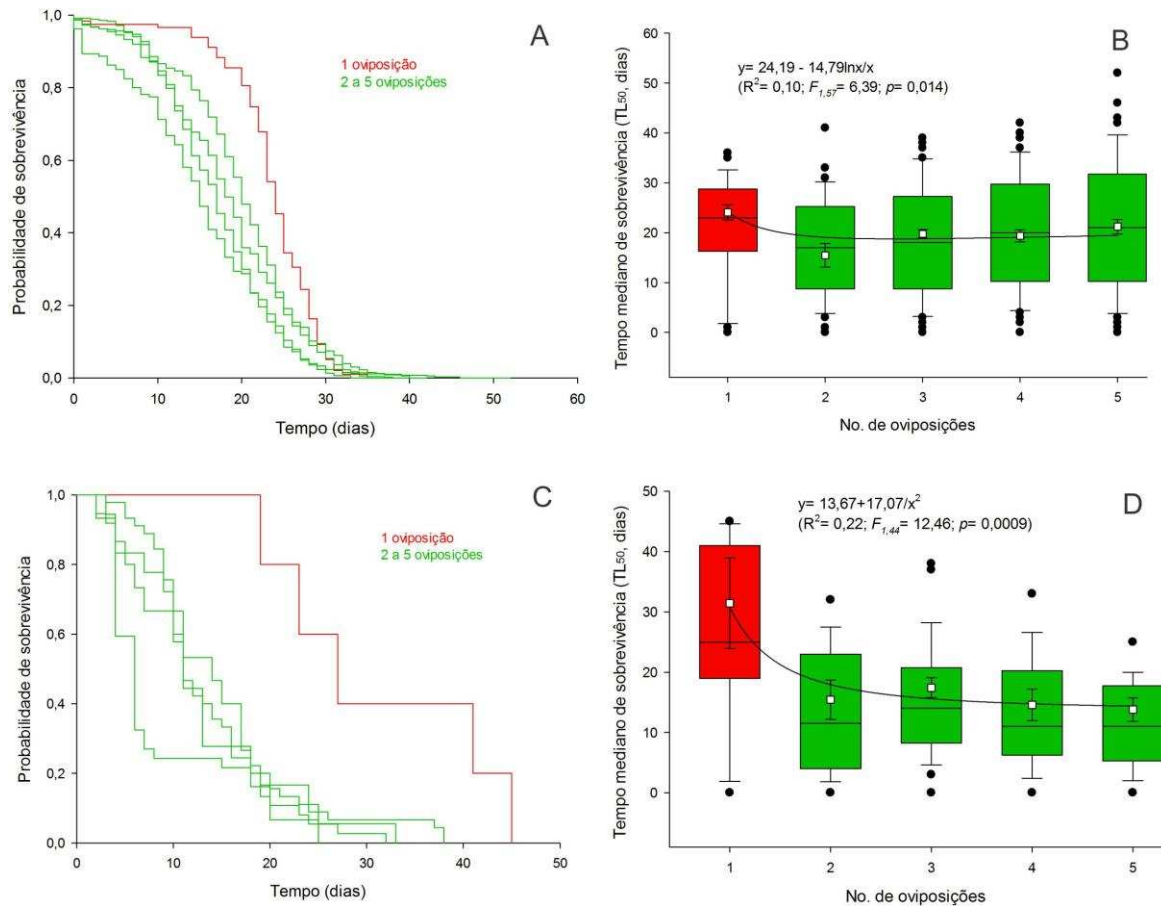


Figura 3. Curvas de sobrevivência de fêmeas (A) e machos (C) de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae) originados de pupas de *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae) parasitadas e superparasitadas utilizando Log-rank test,  $\chi^2$  test ( $p > 0,05$ ). Curvas de sobrevivência agrupadas por linha de mesma cor, não diferem pelo teste Holm-Sidak ( $p < 0,05$ ). Box plot do tempo mediano letal estimado (LT<sub>50</sub>) de fêmeas (B) e de machos (D) do parasitoide em pupas com diferentes números de oviposições. Cores semelhantes representam semelhanças entre tratamentos. Linhas de regressões sobrepostas sobre box plot indicam a longevidade mediana de fêmeas (B) e machos (D) adultos em cada pupa de *D. hyalinata*.

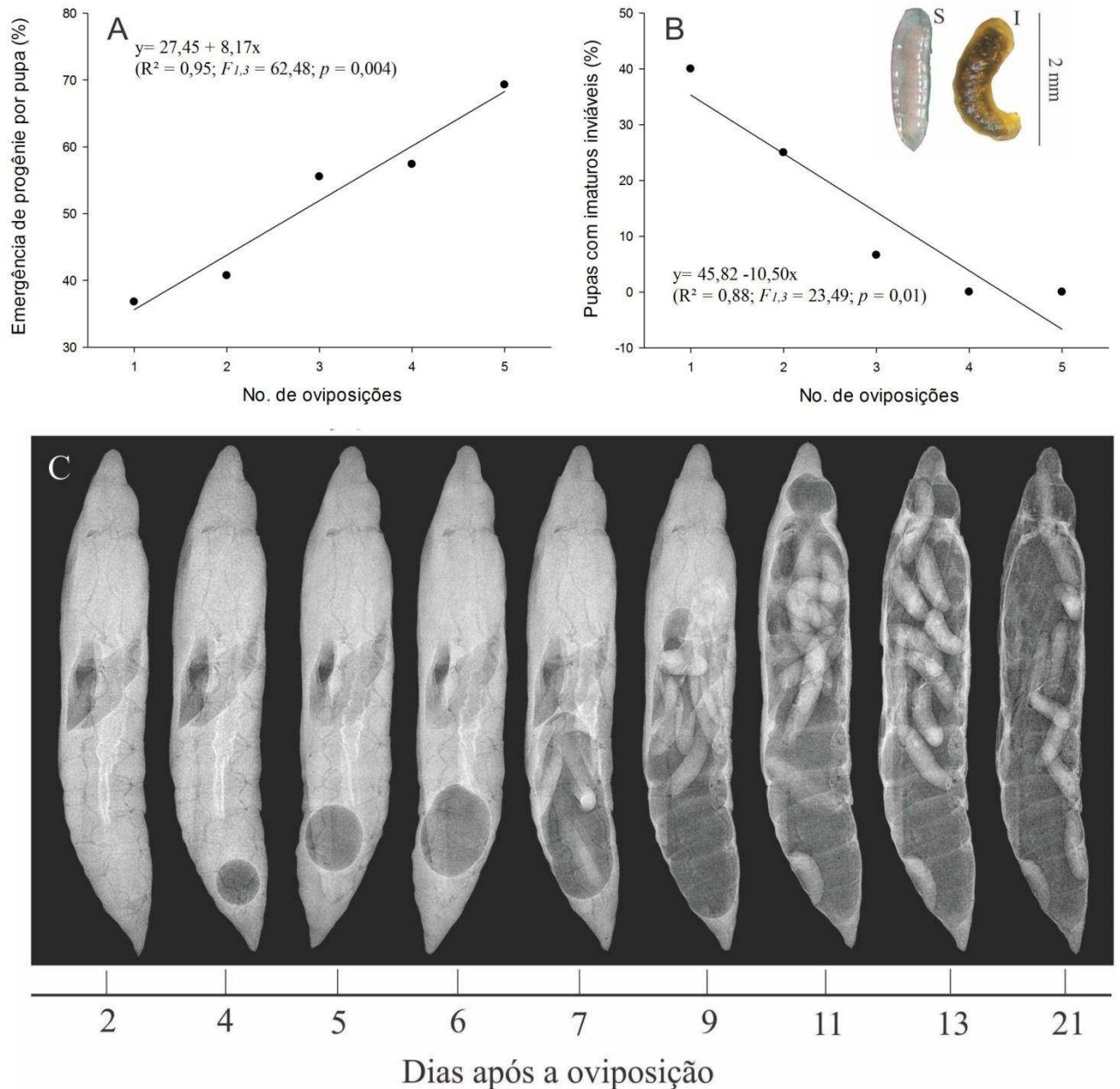


Figura 4. Defesa imune de pupas de *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae) sobre imaturos de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). (A) Taxa de emergência de proles por pupa. (B) Percentual de pupas com imaturos mortos inviáveis (S- larva sadia, I- larva inviável). (C) Sequência de desenvolvimento de imaturos inviáveis de *P. elaeisis* dentro de pupa de *D. hyalinata*.

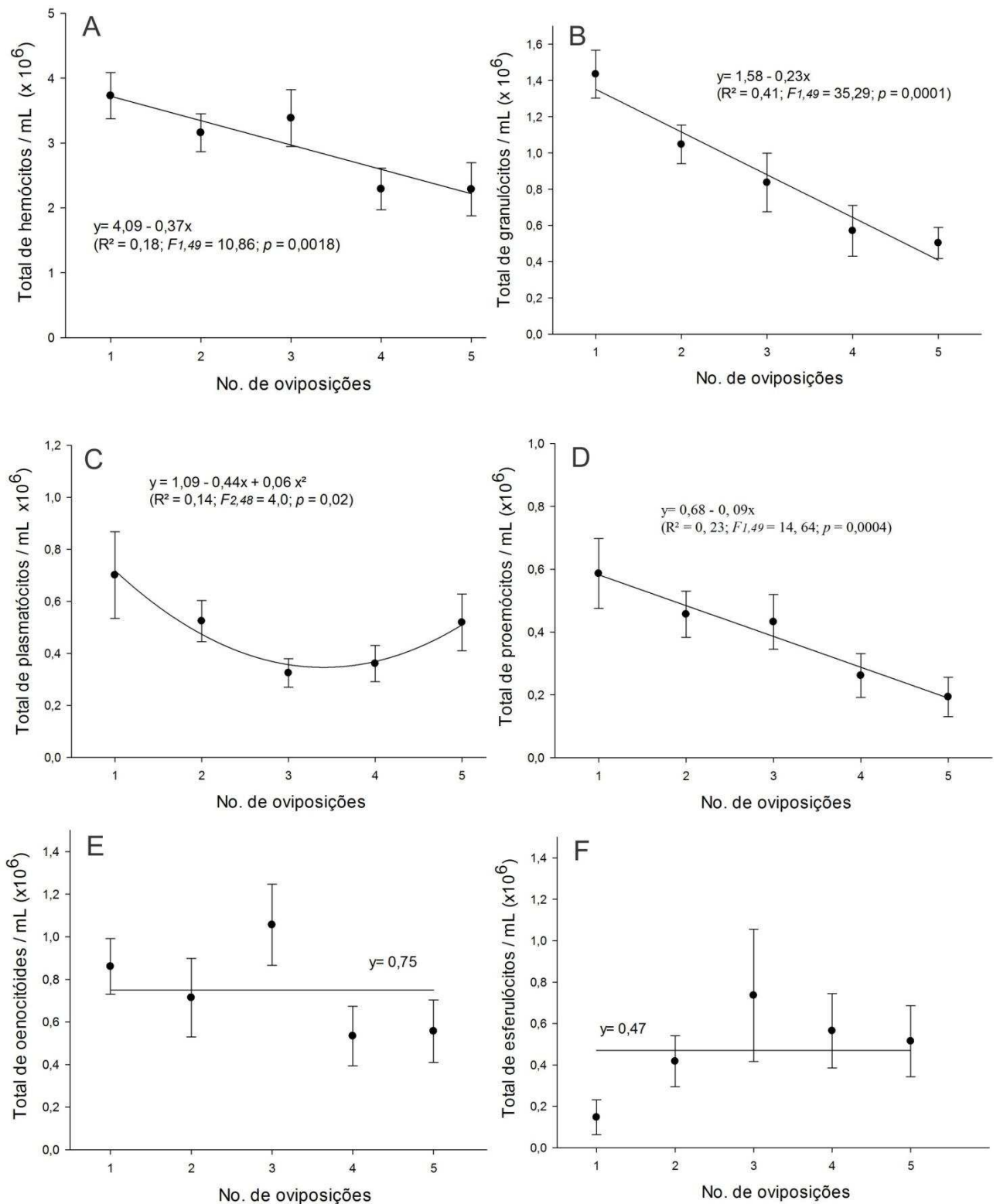


Figura 5. Hemócitos circulantes na hemolinfa de pupas de *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae) exposta aos diferentes números de oviposições de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). (A) total de hemócitos, (B) granulócitos, (C) plasmatócitos, (D) proemócitos, (E) oenocitóides, e (F) esferulócitos.

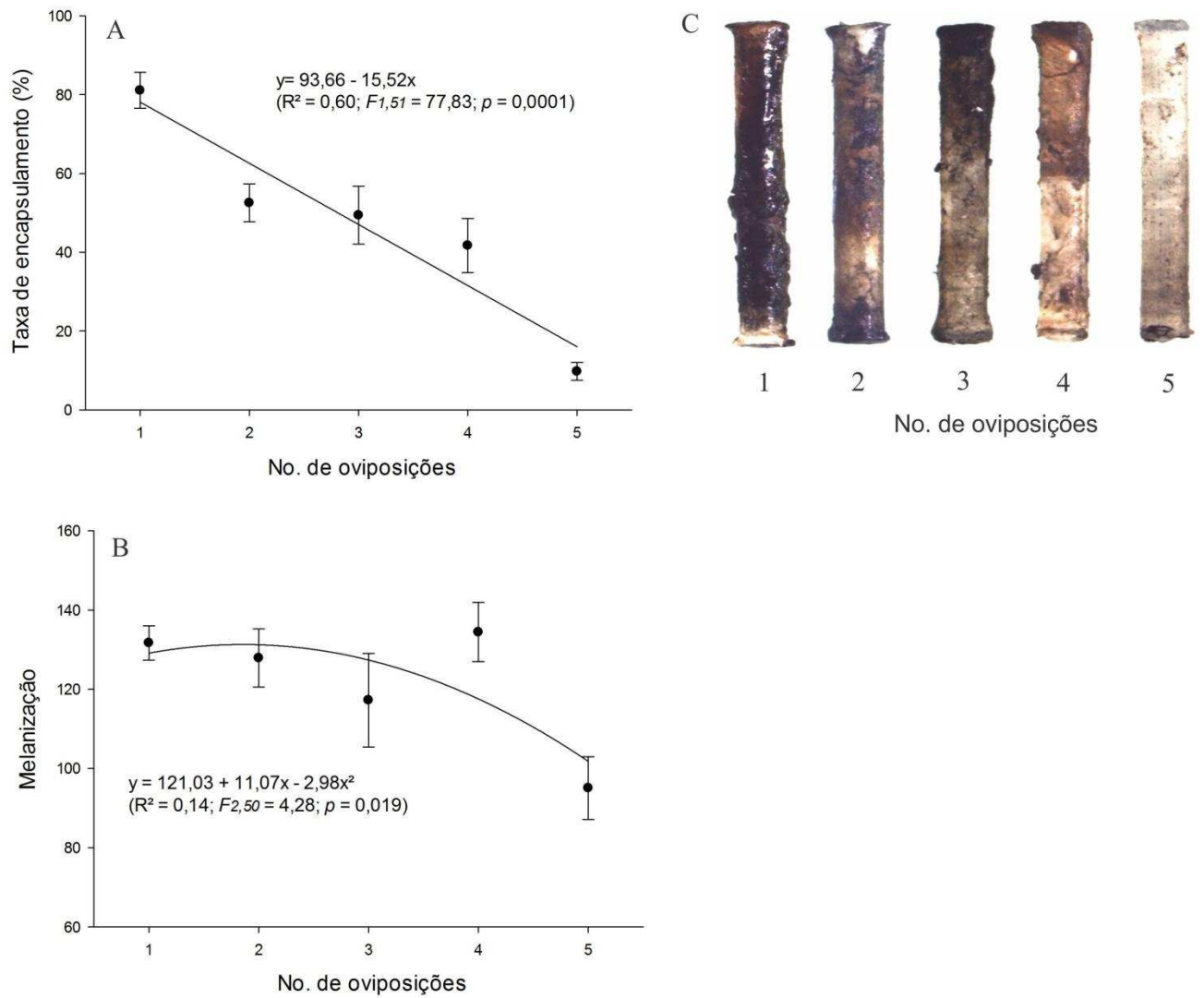


Figura 6. (A) taxa de encapsulamento (valores em porcentagem de área coberta por células) e (B) melanização (valores estimados por unidade arbitrária de implantes escuros) de pupas de *Diaphania hyalinata* (Lepidoptera: Crambidae) parasitadas por diferentes densidades de oviposições de *Palmistichus elaeisis* (Hymenoptera: Eulophidae). (C) Implantes de náilon retirados de pupas de *D. hyalinata* parasitada e superparasitadas pelo parasitoide.