

Vanessa Simões Dias

**Compatibilidade de acasalamento de populações do complexo
Anastrepha fraterculus (Diptera: Tephritidae) do Brasil**

Salvador – Ba

2012

Vanessa Simões Dias

**Compatibilidade de acasalamento de populações do complexo
Anastrepha fraterculus (Diptera: Tephritidae) do Brasil**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Federal da Bahia,
para a obtenção de Título de Mestre em
Ecologia e Biomonitoramento.

Orientadora: Dr^a Iara Sordi Joachim Bravo

Co-orientadora: Dr^a Beatriz Aguiar Jordão
Paranhos

Salvador – Ba

2012

Dias, Vanessa Simões

Compatibilidade de acasalamento de populações do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) do Brasil.

65 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia.

1. *Anastrepha fraterculus* 2. Isolamento pré-zigótico
3. Espécies crípticas I. Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Biologia.

Data da defesa: 21 de Junho de 2012

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr^a. Ruth Rufino do Nascimento
Universidade Federal de Alagoas

Prof(o). Dr. Hilton Ferreira Japyassú
Universidade Federal da Bahia

Orientadora: Prof(a). Dr^a. Iara Sordi Joachim Bravo
Universidade Federal da Bahia

Co-orientadora: Dr^a. Beatriz A. Jordão Paranhos
Embrapa Semiárido

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Ivanise e Milton, e ao meu marido, Joab,
por todo carinho, incentivo e motivação.*

*Tudo quanto te vier à mão para fazer,
faze-o conforme as tuas forças, porque
na sepultura, para onde tu vais, não há
obra nem projeto, nem conhecimento,
nem sabedoria alguma.*

Rei Salomão
(Bíblia Sagrada, Eclesiastes 9.10)

Agradecimentos

Agradeço a DEUS por ter me sustentado e abençoado com oportunidades incríveis. Você me mostrou que sempre é possível ir além de um sonho. Louvo-te Deus!

Agradeço aos meus pais, Ivanise e Milton, por todo empenho e investimento na minha formação. A toda minha família pela compreensão nos momentos de ausência.

Agradeço ao meu marido pelo incentivo e participação em todas as etapas do mestrado se mostrando um verdadeiro companheiro.

Agradeço a minha orientadora Prof.^a Iara Bravo pelas lições que extrapolam os limites da ciência. Sua confiança e conselhos sempre serão relevantes para mim.

Àquele mestrando que me apresentou o fantástico mundo dos insetos, Alberto Neto, muito obrigada.

Agradeço a todos do Laboratório de Ecologia Nutricional de Insetos, a Clariss a e Priscyla pela ajuda na criação e realização dos experimentos, pois seria impossível sem vocês; aos meus amigos Jamile e Diogo; as risadas dadas com Beatriz, Gabriel, Leide, Cristiane, Luiza, Lúcia, Kelly, Anne e Cyntia. Vocês são maravilhosos!

Ao Dr. Antonio Souza do Nascimento, muito obrigada pelo incentivo e todos os elogios que me motivaram ainda quando estava na graduação.

Sou grata a minha co-orientadora, Dr.^a Beatriz Paranhos, pela força, conselhos e companhia na Austrália. Cada indicação sua foi muito importante para mim.

Agradeço ao Dr. Aldo Malavasi por todo suporte e confiança, sua competência me motiva. As oportunidades que você me deu jamais serão esquecidas.

Agradeço ao Dr. Rui Pereira por todo incentivo dado, pela intermediação entre mim e a IAEA, bem como por todas as portas abertas.

Agradeço ao Jair Virgino pelo apoio nos testes em gaiola de campo.

Agradeço a toda equipe Moscamed que me apoiou em parte dos experimentos.

A toda equipe técnica da *Entomology Unit* (IAEA/ONU) em Seibersdorf, Viena. Jamais esquecerei o carinho do Thilak e os bons papos com o Amirul, Sohel e Viwat.

Agradeço a todos os pesquisadores do Sul que me deram suporte nas coletas e envio de pupas: Luiz Gonzaga (Epagri) que me proporcionou vários contatos, Simone Lancini (Moscamed) por tanta dedicação; Dr. Marcos Botton (Embrapa Uva e Vinho) e sua equipe adorável, a exemplo do Ruben e da Vânia; Dr. Dori Nava (Embrapa Clima Temperado) e seu grande time, destacando a Adrise (uma amiga especial) que me

acolheu carinhosamente no seu lar; Dr. Adalecio Kovaleski (Embrapa Uva e Vinho) que mesmo longe me auxiliou; e o Prof. Cláudio Franco.

Agradeço a Dr.^a Keiko Uramoto e Consuelo pela identificação dos insetos.

Agradeço também ao carinho e generosidade da Prof.^a Gleider que sempre me recebeu tão bem em nome da família Tephritidae.

Agradeço ao apoio da Prof.^a Janisete Silva Miller tanto nas coletas quanto no inglês na Austrália.

Não tenho palavras para agradecer todo o companheirismo e suporte dado pela Dr.^a Adriana Mendonça e Prof.^a Ruth Rufino.

Agradeço ao Sr. Uzeda, Mírian, Vivian, Marcondes, Prof.^a Maria Aparecida pelas pupas do Nordeste ainda que não tenha sido possível utilizá-las no meu estudo.

Agradeço ao Prof. Hilton que tão solícitamente me ajudou com a análise dos dados.

Agradeço a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Biomonitoramento da UFBA. Eu tive verdadeiros mestres.

Agradeço a todos os meus colegas da pós-graduação pelas dicas no projeto e companhia ao longo das matérias.

Agradeço a Jussara, uma pessoa tão doce e generosa que sempre esteve disposta a me auxiliar com as questões administrativas da pós-graduação.

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia pela bolsa de mestrado concedida.

Agradeço a Agência Internacional de Energia Atômica pelo apoio financeiro dado ao projeto.

E, finalmente, agradeço a esse lindo complexo *Anastrepha fraterculus* que me permitiu viver a pesquisa tão intensamente nos últimos dois anos.

SUMÁRIO

Texto de divulgação	09
 Compatibilidade de acasalamento de populações do complexo <i>Anastrepha fraterculus</i> (Diptera: Tephritidae) do Brasil	
<i>Abstract</i>	15
Resumo	16
Introdução	17
Materiais e Métodos	21
Origem das moscas	21
Avaliação do comportamento de corte através de filmagem	22
Testes de compatibilidade Sexual	25
Análise estatística	27
Resultados	29
Avaliação do comportamento de corte através de filmagem	29
Testes de compatibilidade Sexual	30
Discussão	34
Agradecimentos	41
Referências bibliográficas	42
Figuras	51
Tabelas	53
Referências do Texto de Divulgação	57
Anexos: Normas da revista	60

Texto de Divulgação

A seleção sexual pode conduzir populações ao isolamento reprodutivo pré-zigótico mediante a evolução da preferência por características sexuais específicas (Ritchie, 2007). Uma possível explicação para esse processo considera a evolução conjunta entre a preferência de acasalamento da fêmea e características secundárias do macho (Lande, 1981, 1982). Nos animais, em geral, as fêmeas podem escolher machos de melhor qualidade (*good genes sexual selection*, ver detalhes em Möller & Alatalo, 1999 e Alcock, 2011) ou mais estimulantes (seleção *runaway*, Fisher, 1930). Todavia, quando tais escolhas conduzem a uma discriminação entre espécies de um grupo aparentado (raças geográficas), elas podem contribuir para o reconhecimento das espécies (Ryan & Rand, 1993).

O reconhecimento de parceiro sexual pode ser definido como uma resposta comportamental indicando que um indivíduo considera outro como parceiro apropriado, não estando vinculado à ideia de preferência, já que não exige comparação (Ryan & Rand, 1993). A ideia de preferência, comumente associada às fêmeas, está relacionada à “vantagem que certos indivíduos têm sobre os outros do mesmo sexo e espécie unicamente em relação à reprodução” (Darwin, 1871), originalmente o conceito de seleção sexual.

Dentre os mecanismos pela qual a seleção sexual ocorre, a escolha de parceiro sexual (seleção intersexual) é caracterizada pelo favorecimento de caracteres em um dos sexos que atraem o outro (Krebs & Davies, 1996). Ryan e Rand (1993) descreveram inicialmente a relação entre a escolha de parceiro sexual e o reconhecimento de parceiro, ressaltando as semelhanças entre ambos os processos, afirmando que sua interação pode resultar em acasalamentos associativos dentro e entre espécies.

Algumas das possíveis causas para a ocorrência de acasalamentos associativos podem ser extraídas dos mecanismos de isolamento pré-zigótico definidos por Dobzhansky (1951) como, por exemplo, a ocupação de diferentes habitats (isolamento ecológico); diferentes horários ou estações de acasalamentos e floração (isolamento temporal); assim como a falta de atração mútua entre machos e fêmeas (isolamento sexual ou comportamental). Ainda segundo ele, há também os mecanismos pós-zigóticos de isolamento como inviabilidade, esterilidade ou desmoronamento do híbrido.

Um excelente modelo para investigar os mecanismos de isolamento reprodutivo é a *Anastrepha fraterculus*, considerada um complexo de espécies crípticas, e não uma entidade biológica singular, por estudos moleculares, genéticos, morfométricos e bioquímicos (Stone, 1942; Steck, 1991; Selivon & Perondini, 1998; Selivon et al., 2004, 2005; Cáceres et al., 2009). No Brasil, alguns desses estudos apontam para a hipótese de pelo menos três grupos diferentes desta espécie no País, denominados *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus*, *A. sp.2 aff. fraterculus* e *A. sp.3 aff. fraterculus* (Selivon & Perondini, 1998; Selivon et al., 2004, 2005).

Apesar de todos os estudos direcionados à caracterização das populações do complexo *A. fraterculus* oriundas do Brasil, pouco se sabe sobre a compatibilidade sexual das mesmas. Este conhecimento é importante para auxiliar na resolução do status taxonômico, no maior conhecimento dos fatores envolvidos no isolamento reprodutivo do complexo, bem como no seu controle, já que esta é considerada uma praga agrícola.

A urgência de métodos de controle complementares da *A. fraterculus*, como a Técnica do Inseto Estéril (TIE), é evidente diante do extensivo uso de defensivos agrícolas e das perdas significativas associadas à produção de maçã no Rio Grande do

Sul e Santa Catarina (Sugayama et al., 1997; Kovaleski et al., 1999). A TIE consiste na produção massal de insetos para posterior esterilização e liberação na natureza (Knipling, 1955). Logo, ocorrendo o acasalamento entre o macho liberado e a fêmea selvagem, a população alvo tende a diminuir.

Visando fornecer subsídios para o controle populacional da *A. fraterculus* no Brasil através da TIE (relevância prática), bem como contribuir para o entendimento da influência do comportamento sexual no isolamento reprodutivo do complexo *A. fraterculus* (relevância teórica), o presente estudo foi realizado. Para isto, a compatibilidade sexual e as frequências dos comportamentos de corte de populações do Sul (Vacaria-RS, Pelotas-RS, Bento Gonçalves-RS, São Joaquim-SC) e do Sudeste (Piracicaba-SP) do Brasil foram avaliadas através de experimentos em gaiola de campo e filmagem, respectivamente. A compatibilidade de acasalamento foi avaliada mediante os seguintes cruzamentos: Pelotas *versus* Vacaria, Vacaria *versus* São Joaquim, Vacaria *versus* Bento Gonçalves, Piracicaba *versus* Vacaria, Piracicaba *versus* Bento Gonçalves e Piracicaba *versus* São Joaquim.

Os resultados sugerem que há compatibilidade de acasalamento entre as populações do Sul e certo grau de incompatibilidade destas quando comparadas com a população do Sudeste. Nenhuma diferenciação foi encontrada quanto ao pico de atividade sexual e formação de leks; entretanto os experimentos de filmagem mostraram que estas diferiram em relação às frequências das unidades comportamentais associadas ao sucesso de acasalamento. Houve clara distinção quanto às populações selvagens em relação às criadas em laboratório.

Nossos resultados sugerem uma possível explicação para a incompatibilidade de acasalamento encontrada entre as populações do Sul e Sudeste, servindo de alerta para

possíveis programas de liberação de insetos estéreis nessas áreas. É importante ressaltar que não basta utilizar populações classificadas no mesmo grupo dentro do complexo *A. fraterculus*, mas, acima disso, os machos das populações utilizadas em tais programas de controle devem ser aptos a competirem com os insetos selvagens para o sucesso da TIE.

Veículo pelo qual artigo será submetido:

Revista: *Entomologia Experimentalis et Applicata*

Título

Compatibilidade de acasalamento de populações do complexo *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) do Brasil

Autores

Vanessa Simões Dias^{1,3}, Beatriz Aguiar Jordão Paranhos² & Iara Sordi Joachim-Bravo¹

Endereço

1 - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Biologia, Departamento de Biologia Geral. R.

Barão do Geremoabo s/n, Campus Universitário de Ondina, Salvador, BA - Brasil. CEP 40.170-290.

2–Embrapa Semiárido, BR 428, Km 152, Zona Rural - Caixa Postal 23, Petrolina, PE - Brasil - CEP 56302-970.

Correspondência: 3 – vanessasidias@hotmail.com

Título Curto: Compatibilidade sexual de *Anastrepha fraterculus*

Palavras-Chave: isolamento pré-zigótico, espécies crípticas, seleção sexual, especiação, moscas-das-frutas, mosca sul americana.

Abstract

The evolution of reproductive isolation can lead to speciation, through pre- or post-zygotic mechanisms. Both types of isolation have been demonstrated in populations of *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). However, little is known about the sexual compatibility among different populations of this complex in Brazil, a country with the greatest variety of species from Americas. Information to clarify their taxonomic status is important for the Sterile Insect Technique (SIT) application and understanding the speciation process associated with these cryptic species. In this study, the sexual compatibility and frequencies of courtship activities displayed for populations from southern (Vacaria-RS, Pelotas-RS, Bento Gonçalves-RS, São Joaquim-SC) and southeastern (Piracicaba-SP) Brazil were evaluated throughout experiments performed on field cages and video recordings, respectively. The crosses used in the sexual compatibility tests were as follows: Pelotas *versus* Vacaria, Vacaria *versus* São Joaquim, Vacaria *versus* Bento Gonçalves, Piracicaba *versus* Vacaria, Piracicaba *versus* Bento Gonçalves, and Piracicaba *versus* São Joaquim. The results suggest that there is mating compatibility among populations from southern Brazil and a degree of isolation when these were compared with the population from southeast. No differentiation was found on the peak of sexual activity and lek formation; but the video recordings experiments showed that there are differences in the behavioral units frequencies associated with mating success. There was a clear distinction between wild and laboratory populations. Our results suggest a possible explanation for the incompatibility found between mating populations of southern and southeastern Brazil, and this it may be useful as a warning for possible sterile insects release programs in these areas. It is noteworthy, that is not enough to use populations classified in the same group within *A. fraterculus* complex, but, above that, the males used in these control programs should be able to compete with the wild insects to the success of TIE.

Resumo

A evolução do isolamento reprodutivo pode conduzir a especiação, seja por meio de mecanismos pré ou pós-zigóticos. Ambos os tipos de isolamento foram demonstrados em populações do complexo *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). No entanto, pouco se sabe sobre a compatibilidade de acasalamento das populações deste complexo no Brasil, país com a maior variedade de espécies das Américas. Informações visando esclarecer seu *status* taxonômico são importantes para a aplicação da Técnica do Inseto Estéril (TIE) e entendimento do processo de especiação associado a essas espécies crípticas. Neste estudo, a compatibilidade sexual e as frequências dos comportamentos de corte de populações do sul (Vacaria-RS, Pelotas-RS, Bento Gonçalves-RS, São Joaquim-SC) e do sudeste (Piracicaba-SP) do Brasil foram avaliadas através de experimentos em gaiola de campo e filmagem, respectivamente. Os cruzamentos utilizados nos testes de compatibilidade sexual foram os seguintes: Pelotas *versus* Vacaria, Vacaria *versus* São Joaquim, Vacaria *versus* Bento Gonçalves, Piracicaba *versus* Vacaria, Piracicaba *versus* Bento Gonçalves e Piracicaba *versus* São Joaquim. Os resultados sugerem que há compatibilidade de acasalamento entre as populações do sul e certo grau de incompatibilidade destas quando comparadas com a população do sudeste. Nenhuma diferenciação foi encontrada quanto ao pico de atividade sexual e formação de leks; entretanto os experimentos de filmagem mostraram que estas diferiram em relação às frequências das unidades comportamentais associadas ao sucesso de acasalamento. Houve clara distinção quanto às populações selvagens em relação às criadas em laboratório. Nossos resultados sugerem uma possível explicação para a incompatibilidade de acasalamento encontrada entre as populações do sul e sudeste, servindo de alerta para possíveis programas de liberação de insetos estéreis nessas áreas. É importante ressaltar que não basta utilizar populações classificadas no mesmo grupo dentro do complexo *A. fraterculus*, mas acima disso os machos das populações utilizadas em tais programas de controle devem ser aptos a competirem com os insetos selvagens para o sucesso da TIE.

Introdução

A seleção sexual pode conduzir populações ao isolamento reprodutivo pré-zigótico mediante a evolução da preferência por características sexuais específicas (Ritchie, 2007). Dentre os mecanismos pela qual a seleção sexual ocorre, a escolha de parceiro sexual (seleção intersexual) é caracterizada pelo favorecimento de caracteres em um dos sexos que atraem o outro (Krebs & Davies, 1996).

Ryan e Rand (1993) descreveram inicialmente a relação entre a escolha de parceiro sexual e o reconhecimento de parceiro, ressaltando as semelhanças entre ambos os processos, afirmando que sua interação pode resultar em acasalamentos associativos dentro e entre espécies.

Algumas das possíveis causas para a ocorrência de acasalamentos associativos, conhecidas como mecanismos de isolamento pré-zigótico, foram definidas por Dobzhansky (1951) como, por exemplo, a ocupação de diferentes habitats (isolamento ecológico); diferentes horários ou estações de acasalamentos e floração (isolamento temporal); assim como a falta de atração mútua entre machos e fêmeas (isolamento sexual ou comportamental). Ainda segundo ele, há também os mecanismos pós-zigóticos de isolamento como inviabilidade, esterilidade ou desmoronamento do híbrido.

O gênero *Anastrepha* é um amplo táxon com mais de 230 espécies distribuídas pelas Américas, muitas delas consideradas pragas agrícola devido os prejuízos causados à fruticultura (Norrbon et al., 1999; Norrbom & Korytkowski, 2009; Norrbom & Korytkowski, 2011). Deste gênero pode ser extraída uma excelente espécie modelo para investigar os mecanismos de isolamento em moscas-das-frutas, a *A. fraterculus*, considerada um complexo de espécies crípticas e não uma entidade biológica singular (Stone, 1942; Steck, 1991; Selivon & Perondini, 1998; Selivon et al., 2004, 2005; Cáceres et al., 2009).

Uma abordagem morfométrica multivariada utilizando 32 populações de *A. fraterculus*, de diferentes regiões das Américas, apontou para a existência de sete morfotipos distintos dentro do complexo (Hernández-Ortiz et al., 2012). Essa informação corrobora resultados anteriores obtidos mediante estudos genéticos (Steck, 1991; Smith-Caldas et al., 2001) e comportamentais (Vera et al., 2006; Cáceres et al., 2009) com as populações de *A. fraterculus* da América Latina.

No Brasil, análises de isoenzimas, cariótipo, morfologia do ovo e morfometria relacionadas à *A. fraterculus*, apontam para a hipótese de pelo menos três grupos diferentes desta espécie no País, denominados *Anastrepha* sp.1 *aff. fraterculus*, *A. sp.2 aff. fraterculus* e *A. sp.3 aff. fraterculus* (Selivon & Perondini, 1998; Selivon et al., 2004, 2005). Algumas situações peculiares envolvendo tais morfotipos brasileiros podem ser destacadas, como a existência de regiões de simpatria das três formas no estado de São Paulo (Selivon et al., 2004) e áreas cujos morfotipos em simpatria compartilham o mesmo hospedeiro (*A. sp.1 aff. fraterculus* e *A. sp.2 aff. fraterculus* em São Sebastião; *A. sp.1 aff. fraterculus* e *A. sp.3 aff. fraterculus* em Vacaria) (Selivon et al., 2004, 2005). Já no nordeste, as poucas caracterizações realizadas indicam a predominância da *A. sp.2 aff. fraterculus* (Selivon et al., 2005).

Apesar de todos os estudos direcionados à caracterização das populações de *A. fraterculus* oriundas do Brasil, pouco se sabe sobre a compatibilidade sexual entre as mesmas. Este conhecimento é importante para auxiliar na resolução do *status* taxonômico deste possível complexo de espécies crípticas e poder contribuir para o maior conhecimento dos fatores envolvidos no isolamento reprodutivo do complexo *fraterculus*.

Quanto ao repertório do comportamento sexual de *A. fraterculus*, estudos tem mostrado que ele é complexo, heterogêneo e com alta plasticidade fenotípica (Aluja et al., 1999; Cendra

et al. 2011). Sabe-se que seu sistema de acasalamento é baseado em “leks” (Malavasi et al., 1983), que são agregados de machos nas folhas de uma árvore com o objetivo de atrair (através da liberação de feromônio sexual), cortejar (a partir de um repertório comportamental caracterizado por estímulos visuais e acústicos) e copular com a fêmea (Field et al. 2002; Segura et al. 2007).

Para muitas espécies de *Anastrepha* ainda há pouca informação disponível sobre os fatores envolvidos na escolha da fêmea e sobre o comportamento dos machos, o que dificulta a interpretação dos comportamentos descritos e, inclusive, a utilização desses dados em aplicações práticas, como o controle desses insetos por meio da Técnica do Inseto Estéril (TIE) (Sciurano et al., 2007; Segura et al., 2007). Esta técnica consiste em liberar machos estéreis na natureza com o objetivo de reduzir a população da espécie praga (Knipling, 1955).

Uma prerrogativa para o sucesso do da TIE é que machos estéreis acasalem com fêmeas selvagens resultando em uma diminuição da população (Boake et al., 1996; Hendrichs et al., 2002; Robinson et al., 2002). Contudo, isto só será possível para populações de *A. fraterculus* do Brasil se elas forem sexualmente compatíveis. Em decorrência das incertezas relativas a este aspecto, atualmente não é realizado o controle populacional de *A. fraterculus* por meio da TIE no País.

Alguns estudos de compatibilidade sexual utilizando populações da América do Sul (Tucumán e Concordia – Argentina, La Molina – Peru, Piracicaba - Brasil e Ibagué - Colômbia) sugerem certo grau de incompatibilidade entre elas (Vera et al., 2006; Cáceres et al., 2009), o que inviabilizaria o uso de uma única linhagem para criação massal e aplicação da TIE no continente. Em contrapartida, considerando populações da Argentina (Tucumán) e sul do Brasil (Pelotas e Vacaria), verificou-se que há compatibilidade sexual pré e pós-

zigótica entre elas, indicando o possível uso de uma única linhagem de *A. fraterculus* para aplicação da TIE nessas áreas (Rull et al., 2012).

Todos esses resultados evidenciam a importância de estudos comportamentais que envolvam aspectos da seleção sexual na aplicação de estratégias de manejo de pragas, conforme indicado por vários autores (Shelly & Kaneshiro, 1996; Hendrichs et al., 2002; Robinson et al., 2002). Ampliá-los, utilizando populações de *A. fraterculus* originárias do Brasil torna-se prioritário, considerando que tal país detém a maior variedade de grupos que compõem o complexo *fraterculus* (Hernández et al., 2012).

A urgência para se encontrar métodos de controle complementares para *A. fraterculus* é evidente diante do extensivo uso de defensivos agrícolas e das perdas significativas associadas à produção de maçã no Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Sugayama et al., 1997; Kovaleski et al., 1999). Entre 2001 e 2008 a venda de defensivos agrícolas no País aumentou de US\$ 2 bilhões para mais de US\$ 7 bilhões (Londres, 2011), tornando o brasileiro o maior mercado consumidor mundial de venenos (Dominguez, 2010). Fala-se em mais de 1 milhão de toneladas de agrotóxicos aplicados só em 2009 (Londres, 2011).

Visando fornecer subsídios para o controle populacional da *A. fraterculus* no Brasil através da SIT (relevância prática), bem como contribuir para o entendimento da influência do comportamento sexual no isolamento reprodutivo do complexo *fraterculus* (relevância teórica), o presente estudo foi realizado. Para isto, as seguintes hipóteses foram testadas: (1) a origem do macho de *A. fraterculus* influencia a frequência dos comportamentos de corte e (2) há diferença entre os acasalamentos homotípicos e heterotípicos envolvendo populações de *A. fraterculus* do Sul e Sudeste do Brasil.

Material e Métodos

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Ecologia Nutricional de Insetos do Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia e na Biofábrica Moscamed Brasil, em Juazeiro – Bahia - Brasil.

Origem das moscas

Em todos os experimentos foram utilizadas cinco populações de *A. fraterculus* provenientes de diferentes localidades do Sul (Vacaria, Bento Gonçalves, Pelotas e São Joaquim) e Sudeste (Piracicaba) do Brasil (Tabela 1), obtidas a partir de algumas espécies de mirtáceas (Tabela 1). No entanto, na ocasião da realização dos testes, a população de Piracicaba estava sendo criada em condições semi-massiva no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) com o uso de dieta artificial (Salles, 1992) há aproximadamente 50 gerações; e a população de São Joaquim, estava sendo criada há 14 anos em mamão papaia (*Carica papaya*) com inserção periódica de moscas selvagens. As demais populações utilizadas nos testes variaram entre parentais à oitava geração.

Como recurso de oviposição para manutenção das colônias foi oferecido mamão papaia (*C. papaya*). Os procedimentos de criação estão de acordo com Machota et al. (2010), exceto em relação à frequência de troca dos frutos, realizada duas vezes por semana. As colônias foram mantidas à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

Após a emergência das moscas, água e uma dieta à base de proteína hidrolisada e açúcar (1:3) (Silva-Neto et al., 2012) foram fornecidos *ad libitum*. Os indivíduos utilizados em todos os experimentos estavam com idades entre 16 a 22 dias (Vacaria, Pelotas, Bento Gonçalves), exceto Piracicaba e São Joaquim, utilizados com idades entre 10 a 15 dias. A maturação

precoce dessas últimas deve-se, provavelmente, a seleção artificial resultante do processo de criação em laboratório. Usar moscas de diferentes idades não compromete os resultados, desde que essa diferença seja justificada pela variação do período ideal de maturação sexual (aquele onde há o maior número de moscas propensas a acasalar). Fora isto, sabe-se que o efeito da senescência e a imaturidade sexual podem influenciar o número de acasalamento das moscas (Silva-Neto et al., 2009; Anjos-Duarte et al., 2010).

Fêmeas de todas as populações foram preservadas em álcool 70% e identificadas por Dr. Keiko Uramoto (Universidade de São Paulo) e Ms. Consuelo Nunes (Agência de Defesa Agropecuária da Bahia) para confirmação da identificação da espécie.

As populações de Vacaria e Piracicaba foram identificadas como *A. sp. 1 aff. fraterculus* por estudos publicados anteriormente (Selivon et al., 1999, 2005; Kamia, 2010). Entretanto, ainda são desconhecidas informações que permitam a caracterização das populações de Pelotas, São Joaquim e Bento Gonçalves dentro do complexo *fraterculus*.

1. Avaliação do comportamento de corte através de filmagem

Experimentos de filmagem em laboratório foram realizados com objetivo de caracterizar o comportamento de corte dos machos bem-sucedidos (aqueles que acasalaram) e determinar a frequência das unidades comportamentais de cada população (Bento Gonçalves, Pelotas, Piracicaba, São Joaquim e Vacaria). Alguns procedimentos adotados foram adaptados de Cendra et al. (2011) e de um trabalho com outra mosca-das-frutas, *Ceratitidis capitata* (detalhes em Anjos-Duarte et al., 2010). Em torno de 7:00h dois machos da mesma origem foram liberados em uma gaiola de vidro (9x7x9cm) contendo uma folha de *Eugenia uniflora* como substrato para interações. O pecíolo foi mantido nas folhas utilizadas considerando que os machos de *A. fraterculus* comumente ocupam tais regiões nas árvores (Malvasi et al.,

1983). Diferentemente dos estudos citados, colocamos dois machos na mesma gaiola, a fim de manter as interações comportamentais entre os machos, já que eles atraem as fêmeas de forma agregada, dentro dos *leks*, mas apenas um macho foi analisado por gaiola.

Cinco minutos após a liberação de feromônio sexual pelo macho, identificada a partir da expansão das respectivas glândulas anais e exposição da gota de feromônio (Silva-Neto et al. 2009b), uma fêmea de mesma origem foi liberada na gaiola e, a partir desse momento, as moscas foram filmadas com uma câmera de vídeo digital (capacidade de 30 frames/segundo) por até 30 minutos. As gravações foram feitas no formato AVI pelo programa Geo Vision 800 e a frequência de cada unidade comportamental foi analisada pelo Software EthoSeq (Japyassú et al., 2006). As condições físicas as quais os experimentos foram submetidos foram: temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 10\%$.

O etograma utilizado na avaliação do comportamento estava de acordo com o descrito por Cendra et al. (2011) com algumas alterações. No total, 14 unidades comportamentais foram identificadas e seis delas utilizadas nas análises: (CA) *Calling*, há uma gota de feromônio na extremidade anal do macho; (FA) *Fanning*, macho realiza movimento de asas rápido e forte, intermitente ou contínuo; (GF) *Graceful* (Aluja et al., 1999), macho libera feromônio sexual, realiza o *fanning* e executa simultaneamente movimentos arqueados do corpo; (SP) *Spin*, macho gira sobre o próprio eixo realizando *fanning*; (WS) *Wing signalling* (Cendra et al., 2007), macho realiza movimentos alternados ou simultâneos de asas para frente e para trás; (TR) *Transversal*, macho permanece com as asas transversais à linha do corpo; (LU) *Fight*, interação agressiva entre machos ou macho e fêmea; (AH) *Arrowhead*, macho coloca as asas para trás, mantendo-as rígidas e perto de seu corpo (*arrowhead* 1) ou move suas asas ligeiramente e alternativamente, esfregando-as contra suas glândulas laterais (*arrowhead* 2), qualquer uma delas ocorre enquanto o macho estende a probóscide; (AT)

Attempt, macho salta sobre a fêmea tentando acasalar; (ML) *Marking leaf* (Aluja et al., 1999), macho toca a folha com a membrana anal evertida marcando o substrato com feromônio; (MT) *Mating*, as moscas estão acasalando; (RE) *Relax*, as moscas estão com as asas em posição de relaxamento, atrás do corpo; (ES) *Stationary*, macho permanece imóvel no mesmo ponto podendo realizar comportamento de limpeza; e (MO) *Mobile*, quando o macho voa ou caminha.

As filmagens foram analisadas e reanalisadas cuidadosamente quadro por quadro (*frame by frame*) e o comportamento caracterizado segundo alguns critérios assumidos neste estudo, expostos a seguir: (a) a análise apenas do macho bem sucedido (aquele que conseguiu acasalar) em cada réplica, considerando que o objetivo dos testes foi avaliar as cortes dos machos que representavam o reconhecimento e a preferência de parceiro por parte das fêmeas da sua população, para posterior comparação com as demais; (b) consideração de apenas uma unidade comportamental de *Arrowhead* (Dodson, 1982), ao invés da separação (*Arrowhead 1* e *2*) proposta por Cendra et al. (2012), devido a dificuldade de visualização resultante do ângulo não favorável de filmagem; (c) junção das unidades comportamentais de sinalização com as asas *Enantion* e *Hamation* (Robacker & Hart, 1985) na categoria *Wing signalling*, conforme proposta de Cendra (2007); (d) junção das unidades comportamentais *Call 1* e *Call 2* (Cendra et al., 2012) na categoria *Calling*; (e) junção das categorias *Spin* e *Graceful*, tendo em vista a semelhança entre ambas, e (f) a exclusão do comportamento de limpeza, considerando que este não está associado ao comportamento de corte da espécie. A fim de facilitar a identificação do macho bem sucedido no momento da análise, um deles foi marcado com tinta guache atóxica. Para cada população foram feitas cinco repetições.

2. Testes de compatibilidade sexual

Com o objetivo de investigar a compatibilidade pré-zigótica das populações de *A. fraterculus* foram realizados experimentos em gaiolas de campo (2x3m e 3x3x3m) contendo uma árvore de ficus (*Ficus benjamina* L.) (aproximadamente 1,4m de altura e 2,5m de diâmetro), sob condições seminaturais. Nestas, as populações foram testadas, sempre aos pares, com a liberação de 100 indivíduos, sendo 50 moscas de cada origem (25 fêmeas e 25 machos). Os machos foram liberados 15 minutos antes das fêmeas e foram observados no período de 6:15h a 11:00h. Os experimentos foram conduzidos nas seguintes condições físicas: temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de $60 \pm 20\%$.

No total, seis diferentes combinações foram avaliadas: (1) Pelotas *versus* Vacaria, (2) Vacaria *versus* São Joaquim, (3) Vacaria *versus* Bento Gonçalves, (4) Piracicaba *versus* Vacaria, (5) Piracicaba *versus* Bento Gonçalves e (6) Piracicaba *versus* São Joaquim. A diferenciação entre os grupos de moscas liberados na gaiola foi feita mediante marcação no tórax com tinta guache atóxica de diferentes cores. Estas cores foram alternadas ao longo das repetições para anular o possível efeito da marcação na escolha do parceiro sexual. Muitos estudos se valeram dessa técnica de marcação e não relataram prejuízo no desempenho das moscas (Vera et al., 2006; Cáceres et al., 2009; Silva-Neto et al., 2010; Anjos-Duarte et al., 2010).

Os casais em cópula foram removidos com auxílio de um tubo de ensaio vedado com algodão, tendo o tempo de duração registrado para posterior comparação. O tempo para que cada população começasse a acasalar (latência) também foi verificado para os diferentes tipos de cruzamentos entre as populações testadas.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a metodologia exigida pelos padrões internacionais de controle de qualidade (FAO/ IAEA/ USDA, 2003). Registrou-se também o posicionamento dos casais dentro da gaiola, a fim de inferir sobre a distribuição das populações de *A. fraterculus* nos leks, sendo possível revelar detalhes da interação entre as populações, por exemplo, se as mesmas estavam fazendo leks juntas ou separadas.

Para determinar o posicionamento dos machos nos leks e dentro da árvore, esta foi dividida em 24 setores distribuídos em um arranjo tridimensional (Segura et al, 2007; Petit-Marty et al., 2004): a) quatro quadrantes NE, NO, SE, SO (representando os quadrantes nordeste, noroeste, sudeste e sudoeste, respectivamente), selecionados de acordo com os pontos cardeais; b) três zonas de altura distintas determinadas a partir da copa da árvore, separadas por uma distância aproximada de 30 cm, sendo a inferior a zona baixa, seguida pelas zonas média e alta; c) dois setores de acordo com a profundidade das folhas na copa da árvore, onde “P” é o setor correspondente às folhas situadas a aproximadamente 5 cm de profundidade partindo da periferia da copa, e “C” o setor de folhas centrais.

O isolamento entre as populações foi mensurado através de uma análise conjunta das médias de diferentes índices (Cayol et al., 1999a), seus intervalos de confiança (Rull et al. 2012) e análise estatística.

O Índice de Isolamento Sexual (*ISI*, *Index of Sexual Isolation*), calculado mediante a razão da diferença entre o número de acasalamentos homotípicos e heterotípicos pelo número total de acasalamentos, varia entre -1 (acasalamentos completamente associados negativamente) a +1 (acasalamentos completamente associativos), sendo que zero indica acasalamentos aleatórios (Cayol et al., 1999a). As performances dos machos e das fêmeas foram medidas pelos índices MRPI (*Male Relative Performance Index*) e FRPI (*Female Relative Performance Index*), respectivamente. Esses índices mensuram a performance

relativa para cada sexo, através da medida relativa da propensão de acasalamento de machos e fêmeas de uma população *versus* machos e fêmeas da outra comparada. Ele também varia entre -1 a +1. O valor +1 indica que todos os acasalamentos na gaiola foram feitos por machos ou fêmeas de uma população, ocorrendo a situação inversa no valor de -1. Zero indica que machos ou fêmeas de ambas as populações participam igualmente nos acasalamentos. Juntos, ISI, MRPI e FRPI, proveem uma visão global da realidade da compatibilidade entre duas populações testadas. Foram realizadas, pelo menos, cinco réplicas para cada combinação testada.

Análise estatística

O intervalo de confiança no nível de 95% da média populacional (Quinn & Keough, 2002) foi calculado para todos os índices (ISI, MRPI e FRPI), com o objetivo de avaliar se as cópulas obtidas estavam distribuídas aleatoriamente entre as possíveis combinações de acasalamento. O intervalo de confiança se torna útil na interpretação dos índices, pois fornece um intervalo de valores que pode indicar mais precisamente a variação destes, facilitando, conseqüentemente, as interpretações que podem sugerir a compatibilidade ou incompatibilidade sexual entre duas populações. Para isto, admitiu-se neste estudo que a inclusão do valor zero no intervalo de confiança garantia a aleatoriedade dos índices, critério adotado por Rull et al. (2012).

O posicionamento dos machos na formação do *lek*, posição na qual o casal foi coletado (Vera et al., 2006; Segura et al., 2007), indicado pela altura (alto, médio e baixo), quadrante (SE, SO, NE, NO) e profundidade das folhas na copa (centro e periferia) foi avaliado pelo teste do Qui-quadrado de independência. Neste estudo, assim como realizado por Segura et al. (2011), dentro de cada combinação avaliada, as informações referentes ao posicionamento dos machos da mesma população foram agrupadas, independentemente da origem das fêmeas.

O período de latência para a ocorrência da primeira cópula e o tempo de acasalamento foi comparado entre as combinações de acasalamento através da ANOVA, sendo empregado o teste de Tukey-Kramer para comparação par a par. A normalidade e homogeneidade dos dados, premissas necessárias para a realização de uma análise de variância (Zar, 1999), foram avaliadas, a primeira pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e a segunda pelo teste de Levene. Infringida a prerrogativa de homogeneidade das variâncias e normalidade, foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e, neste caso, as comparações entre os pares foram realizadas pelo teste de Dunn's.

As frequências das unidades comportamentais associadas com o sucesso de acasalamento (*Spin*, *Arrowread*, *Attempt*, segundo Cendra et al., 2011; *Calling* e *Fanning*) foram comparadas entre as populações testadas (Bento Gonçalves, Pelotas, Piracicaba, São Joaquim e Vacaria) através da MANOVA com aleatorização (MANOVA não paramétrica), sendo empregado o teste de Lambda Wilk's para testar a hipótese de igualdade das frequências das unidades comportamentais das populações. As probabilidades para esse teste foram geradas a partir de 10.000 permutações. Para comparações entre os pares foram utilizados testes de aleatorização (ANOVA por aleatorização), com o objetivo de identificar quais populações diferiram estatisticamente.

As análises foram realizadas com auxílio do pacote estatístico SPSS para Windows (versão 17.0, 2008), exceto o teste de Dunn's, para o qual foi utilizado o programa GraphPad SOFT WARE para Windows(versão 3.1, 2009) e a MANOVA por aleatorização, sendo gerada pelo pacote estatístico R (R Development Core Team, 2010).

Resultados

1. Avaliação do comportamento de corte através de filmagem

Das 14 unidades comportamentais identificadas neste estudo, duas unidades aparentemente nunca foram diretamente associadas à espécie *A. fraterculus*, sendo elas o *Graceful*, atribuído à descrição feita por Aluja et al. (1999) a uma característica geral do gênero e descrita como “movimentos das asas (sinalização) acompanhado por ‘graciosos’ (*Graceful*) movimentos laterais e arqueamento do corpo”; e a marcação das folhas com feromônio sexual (aqui denominado *Marking leaf*), já identificado em outra espécie do gênero, como a *A. suspensa* (Sivinski et al., 1994). Destas, a última foi visualizada apenas nas populações de Bento Gonçalves e São Joaquim, fato possivelmente associado a possível não visualização decorrente do restrito ângulo de filmagem.

Considerando que o tempo máximo para filmagem foi de 30 minutos e que machos que não acasalaram durante esse período não foram analisados, o tempo total de análise de filmagem (n=5) variou entre as populações, sendo de 19min18s para Bento Gonçalves ($\bar{x} = 3\text{min}52\text{s} \pm 2\text{min}33\text{s}$), 10min32s para Pelotas ($\bar{x} = 2\text{min}6\text{s} \pm 1\text{min}34\text{s}$), 14min50s para Piracicaba ($\bar{x} = 2\text{min}58\text{s} \pm 2\text{min}10\text{s}$), 6min48s ($\bar{x} = 1\text{min}22\text{s} \pm 26\text{s}$) para São Joaquim e 11min20s ($\bar{x} = 2\text{min}16\text{s} \pm 1\text{min}32\text{s}$) para Vacaria.

As populações diferiram quanto à frequência das unidades comportamentais associadas ao sucesso de cópula (*Arrowhead*, *Attempt*, *Calling*, *Fanning*, *Graceful* aqui associado ao *Spin*) ($F_{4,20}=2.32$, $p = 0,024$) como evidenciado na Figura 2.

Observa-se uma clara distinção quanto às populações selvagens (principalmente Vacaria e Bento Gonçalves) em relação às criadas em laboratório por alguns anos (São Joaquim e Piracicaba). A não diferenciação da população de Pelotas, também de origem selvagem, deve-

se ao curto tempo de análise, possivelmente associado ao efeito aleatório da rápida aceitação do macho pelas fêmeas desta população. A população de Vacaria teve um menor tempo de análise quando comparada a Piracicaba (Vacaria = 11min20s, Piracicaba = 14min50s) e ainda assim se mostrou diferente a esta população em relação à frequência do *Fanning* (Figura 2).

As demais unidades comportamentais analisadas não foram avaliadas, uma vez que, o estudo assumiu que elas não são importantes no contexto sexual (Cendra et al., 2011).

2. Testes de compatibilidade sexual

Em linhas gerais, os resultados dos testes de compatibilidade sexual revelam a existência de compatibilidade sexual entre as populações do Sul (Bento Gonçalves, Pelotas, São Joaquim e Vacaria), e certo grau de incompatibilidade sexual destas quando comparadas com a população do Sudeste (Piracicaba) (Tabela 2).

As populações do Sul do Brasil não apresentaram diferença estatística quanto aos acasalamentos homotípicos e heterotípicos quando cruzadas entre si (São Joaquim *versus* Vacaria, $F_{3,31}=1.68$, $p= 0.193$; São Joaquim *versus* Bento Gonçalves, $F_{3,19}= 1.74$, $p= 0.197$; Bento Gonçalves *versus* Vacaria, $F_{3,19}=0.22$, $p= 0.88$; Pelotas *versus* Bento Gonçalves, $F_{3,23}= 0.524$, $p=0.671$) (Figura 1). Os índices de isolamento sexual de todas as combinações realizadas entre tais populações foram muito similares (ISI variando de 0.03 a 0.14), mantendo-se sempre dentro da faixa de aleatoriedade expressada pelo intervalo de confiança (Tabela 2). Esses resultados tornam-se ainda mais confiáveis quando ambos os sexos participaram igualmente em todas as combinações testadas, fato indicado pelo valor de MRPI e FRPI muito próximo de zero. Estes também estiveram no limite da aleatoriedade indicado pelo intervalo de confiança (Tabela 2).

A porcentagem de acasalamento foi muito similar entre os testes realizados com as populações de Bento Gonçalves, Vacaria e São Joaquim, todas em torno dos 70%, conforme indicado na Tabela 2. Em média, 61% dos acasalamentos aconteceram na árvore, validando os dados coletados. Essa porcentagem poderia ter sido maior se nos experimentos iniciais a árvore tivesse volume foliar da copa abundante e uniforme.

Os testes envolvendo a população de Pelotas e Bento Gonçalves, cuja porcentagem de cópula média foi de 56%, também evidenciaram compatibilidade sexual completa. Todavia, outras informações interessantes, que vão além dos índices de performance da fêmea e do macho que indicaram participação similar de ambas as populações (MRPI = 0.05 e FRPI = 0.06), podem ser extraídas desses testes. Os primeiros experimentos em gaiola de campo ocorreram com moscas parentais e de primeira geração com 16 dias de idade, idade recomendada na literatura (De Lima et al, 1994), no entanto, nessas situações as moscas acasalaram muito pouco, já que ainda não estavam uniformemente maduras sexualmente. Por conta disto, os experimentos com essas populações só foram retomados após a quarta geração, cujas moscas com 16 dias estavam aptas a acasalar, mas ainda não tanto quanto dos 18 a 20 dias de idade. Durante a execução dos experimentos foi percebido que com o crescimento do número de gerações havia um decréscimo da idade de maturação sexual, algo não instantâneo, mas gradual e, ainda assim, visível.

Os acasalamentos heterotípicos e homotípicos entre a população de Piracicaba quando testada com as demais populações do Sul do Brasil diferiram estatisticamente em todas as combinações avaliadas (Piracicaba *versus* São Joaquim, $F_{3, 23} = 33.23$, $p < 0.0001$; Piracicaba *versus* Bento Gonçalves, $F_{3, 23} = 28.43$, $p < 0.0001$; e Piracicaba *versus* Vacaria, $F_{3, 23} = 5.69$, $p = 0.005$) (Figura 1). Neste caso, os testes exibiram um ISI médio em torno de 0.5, todos com intervalo de confiança fora da faixa de aleatoriedade, ou seja, afastado de zero, indicando

incompatibilidade sexual parcial (Tabela 2). Em média, 72% dos acasalamentos ocorreram na árvore, indicando boas condições experimentais para coleta dos dados.

A combinação envolvendo Piracicaba e Bento Gonçalves exibiu participação de ambos os sexos (MRPI = - 0.12 e FRPI = -0.08), apresentando um porcentual de acasalamento quase similar aos obtidos com as combinações do Sul (Tabela 2). Ainda em relação a esses índices, quando foram avaliadas as combinações Piracicaba-Vacaria e Piracicaba-São Joaquim, percebeu-se a tendência de maior participação das populações do Sul do Brasil, sendo essa percepção mais forte quando analisou-se a última combinação. Podemos atribuir isto a uma variação natural nos lotes de pupas, a maior parte dos testes com Piracicaba-Bento Gonçalves e Piracicaba-Vacaria foi feito com lotes de moscas diferentes daqueles usados nos testes entre Piracicaba-São Joaquim.

Em alguns dos últimos lotes recebidos do CENA, justamente o período cujos testes entre Piracicaba e São Joaquim se concentraram, machos e fêmeas não participaram tanto quanto em outros lotes. Agrega-se a isto o fator idade. Novamente aqui, isto pôde ser verificado, já que foram utilizadas algumas moscas de Piracicaba com 15 dias de idade nas combinações Piracicaba-Vacaria e Piracicaba-São Joaquim. Ao que parece, o pico de atividade sexual da população de Piracicaba é mais curto do que em populações selvagens (Bento Gonçalves, Pelotas e Vacaria) e na população criada “relaxadamente” em frutos no laboratório (São Joaquim). Isto resultou em um porcentual de acasalamento menor (em torno de 50% nas combinações Piracicaba-São Joaquim e Piracicaba-Vacaria).

Quanto à distribuição dos machos nos *leks* dentro da árvore, independente da origem do macho e da combinação testada, a maioria se concentrou na parte alta e periférica da copa da árvore, área mais iluminada. A maior parte dos acasalamentos ocorreu abaixo da folha (média total de 72.4% \pm 1.7), seguido pelo pecíolo (média total de 23.1% \pm 1.9), uma minoria de

casais foram coletados em cima das folhas (média total $3.7\% \pm 1.25$). As porcentagens totais para cada setor por tipo de combinação testada estão representadas na Tabela 4.

Não houve uma preferência aparente por quadrantes. A realização dos experimentos em diferentes locais, com sombreamento e condições distintas pode ser uma explicação para isto. Os machos não apresentaram diferença estatística em nenhum dos setores avaliados indicando a participação conjunta destes nos leks, isto é válido inclusive para a população de Piracicaba que exibiu certo grau de incompatibilidade com as populações do Sul do Brasil.

Nas combinações testadas com as populações do Sul, não foi encontrada diferença estatística significativa na latência para primeira cópula entre os possíveis cruzamentos obtidos (homotípicos e heterotípicos) (Tabela 3). Quanto à duração de cópula, apenas a combinação Vacaria-Bento Gonçalves apresentou diferença estatística significativa ($H_{3, 175} = 7.91$, $p = 0.048$), cujos cruzamentos homotípico de Vacaria diferiram dos dois possíveis cruzamentos heterotípicos. Provavelmente, esta diferença deve-se à presença de *outliers*, já que nos cruzamentos homotípicos de Vacaria houve seis casais com tempo de cópula entre 165 e 270 minutos, e quatro casais com tempo de cópula entre 178 e 214 minutos nos cruzamentos entre macho de Bento Gonçalves e fêmea de Vacaria.

Quanto às combinações testadas entre as populações do Sul do Brasil e Piracicaba, não houve diferença estatística significativa no tempo de cópula, considerando os possíveis cruzamentos nas diferentes combinações entre essas populações (Tabela 3). No entanto, apesar da latência média para início da primeira cópula ter sido maior na maioria dos tipos de cruzamentos envolvendo moscas de Piracicaba, apenas a combinação Piracicaba-Bento Gonçalves exibiu diferença estatística significativa ($H_{3, 24} = 11.77$, $p = 0.008$), sendo que os acasalamentos homotípicos de Bento Gonçalves ocorreram, em média, mais rapidamente que

os acasalamentos heterotípicos, não diferindo, no entanto, dos acasalamentos homotípicos de Piracicaba (Tabela 3).

Discussão

Diferentes populações do complexo de espécie críptica *A. fraterculus* do Brasil foram comparadas através de testes de compatibilidade sexual e experimentos de filmagens para analisar o comportamento de corte delas. Os resultados apontam para completa compatibilidade sexual entre as populações do Sul (Bento Gonçalves, Pelotas, São Joaquim e Vacaria), mas incompatibilidade parcial destas quando comparada à população de Piracicaba (Sudeste). Diferenças em unidades comportamentais relacionadas ao sucesso de acasalamento também foram verificadas em algumas das populações avaliadas.

A respeito da compatibilidade sexual entre as populações do Sul encontrada aqui, um estudo anterior envolvendo algumas delas (Vacaria e Pelotas) chegou ao mesmo resultado, indo além ao comparar estas com uma população da Argentina (Tucumán) (Rull et al., 2012). Em relação à Argentina, compatibilidade sexual completa também foi indicada quando quatro populações provenientes de três regiões biogeográficas foram comparadas (Petit-Marty et al., 2004). Em todos os casos, nenhuma diferença no horário de chamamento e na latência para o início de cópula foi notada, evidenciando uma clara semelhança entre as populações do Sul do Brasil e Argentina.

A compatibilidade sexual existente entre essas populações refletem os resultados moleculares e genéticos que indicam a existência de um único grupo envolvendo as populações dessas regiões (Smith-Caldas et al., 2001; Alberti et al., 2002; Basso et al., 2003). Dentre eles, Smith-Caldas et al. (2001), a partir de dados provenientes do gene mitocondrial COI, classificou quatro populações brasileiras do Sul (Monte Alegre do Sul, São José da Bela

Vista, ambas de São Paulo; Vacaria, Rio Grande do Sul; e Caçador, Santa Catarina) e uma Argentina (Tucumán) em um único cluster. Alberti et al. (2002) comparou diferentes populações argentinas e uma brasileira (Pelotas) através de eletroforese de isoenzimas e análises de DNA mitocondrial, concluindo que apesar da ocorrência de variação macrogeográfica, as populações estudadas pertencem a uma única espécie.

Não apenas dados genéticos e moleculares evidenciam a existência de um único grupo dentro do complexo *A. fraterculus* a partir de populações brasileiras do Sul e argentinas. Um amplo estudo morfométrico que utilizou 32 populações deste complexo e avaliou 21 variáveis (associadas à asa, acúleo e mesonoto), chegou à conclusão da existência de sete morfotipos distintos nas principais zonas biogeográficas da região Neotropical, dentre elas o morfotipo Brasileiro-1, 2 e 3 (Hernández-Ortiz et al., 2012). Destes brasileiros, o primeiro morfotipo envolve populações argentinas e brasileiras (Piracicaba, São Paulo, Botucatu, Santa Catarina e Uberlândia), sendo o segundo (Ilha Bela e São Sebastião) e o terceiro (Ubatuba) formados apenas populações do Brasil (Hernández-Ortiz et al., 2012). Em um estudo morfométrico anterior, as populações do Brasil (São Paulo e Caçador – Santa Catarina) e uma da Argentina (Tucumán) já tinham sido consideradas uma entidade taxonômica distinta, quando comparada a outras da América Latina (Hernández-Ortiz et al., 2004).

Em relação aos resultados encontrados neste estudo para o nível de incompatibilidade sexual exibido pela população de Piracicaba quando testada com populações do Sul do Brasil, a mesma tendência foi verificada por Vera et al. (2006) ao cruzar esta com a população de Tucumán. Diferentemente dos presentes resultados, esses autores verificaram que a maioria dos casais de Piracicaba era formada na tela da gaiola, enquanto que os acasalamentos envolvendo Tucumán se concentravam na árvore. Assim, na medida em que os casais de Tucumán foram reduzindo sua atividade sexual, os machos de Piracicaba ocupavam a árvore,

acasalando mais tardiamente, fato evidenciado pela diferença no tempo de latência para primeira cópula. Vera et al. (2006) atribuiu tal fato a uma possível evidência de isolamento ecológico (Dobzhansky, 1951).

Outro argumento em relação à distribuição dos machos de diferentes populações de *A. fraterculus* nos *leks* é corresponde a partição espacial devido às diferenças no horário de chamamento e composição feromonal proposta por Segura et al. (2011).

Neste estudo, uma possível explicação para a ausência de diferença em relação à distribuição dos machos dentro dos *leks*, nas populações avaliadas, está relacionada às variações físicas decorrente dos locais onde os experimentos foram realizados. Tais condições podem ter diluído um possível efeito da distribuição dos machos, todavia, ainda assim a incompatibilidade apontada por Vera et al. (2006) se manteve, o que indica que outras causas estão associadas ao isolamento reprodutivo parcial dessas populações. Até populações que exibiram compatibilidade sexual completa mostraram diferenças quanto à posição dos machos no *lek* (Petit-Marty et al., 2004).

O reconhecimento de um parceiro sexual em muitos taxa pode envolver um conjunto de respostas comportamentais, estímulos visuais, químicos, auditivos e olfativos (Ryan & Rand, 1993; Endler & Houde, 1995; Smadja & Ganem, 2002; Hohenlohe & Arnold, 2010). Diante disto, fatores que ainda não foram analisados na população de Piracicaba, como a composição do feromônio ou dos hidrocarbonetos cuticulares (conforme apontado por Rull et al., 2012), podem estar envolvidos na diferente distribuição de Piracicaba nos *leks* como descrito por Vera et al. (2006), assim como na incompatibilidade também expressada por estes resultados.

De todas as populações brasileiras utilizadas nos estudos citados, nós analisamos Pelotas, Piracicaba e Vacaria tanto nos testes de compatibilidade sexual, quanto nos

experimentos de filmagem para avaliação das frequências de unidades comportamentais. Destas, Vacaria foi caracterizada como *A. sp. 1 aff. fraterculus*, através de estudos com isoenzimas, cariótipo e morfometria (Selivon et al., 2005), assim como a população de Piracicaba oriunda do CENA/USP (Kamiya, 2010).

Algumas questões interessantes surgem diante do cenário acima apresentado: como a população de Piracicaba caracterizada como *A. sp. 1 aff. fraterculus* (Kamiya, 2010) e como morfotipo Brasileiro-1 (Hernández-Ortiz et al., 2012) pôde exibir incompatibilidade sexual parcial com as populações do Sul, já que algumas delas foram descritas como participantes dos mesmos grupos (Selivon et al., 2005; Hernández-Ortiz et al., 2004; 2012)? Realmente há contradição entre os resultados genéticos, moleculares e morfométricos quando comparados a estudos de compatibilidade de acasalamento, ou a população de Piracicaba utilizada pertence à outra entidade biológica dentro do complexo *A. fraterculus*? Alguns argumentos serão apresentados a seguir visando esclarecer essas questões.

Rull et al. (2012) apontam uma importante questão quando relaciona a proximidade geográfica de Piracicaba e Santa Isabel (São Paulo), onde pelo menos dois morfotipos coexistem em simpatria utilizando diferentes hospedeiros, a *A. sp. 1 aff. fraterculus* infestando goiaba (*P. guajava*) e *A. sp. 2 aff. fraterculus* utilizando a laranja (*Citrus sinensis*) como recurso de oviposição (Selivon et al, 2004; 2005). Segundo eles, outros estudos sobre a população Piracicaba precisam ser realizados antes de qualquer referência a um morfotipo específico.

Além da zona de simpatria em Santa Isabel, outras são apontadas em todo Vale do Paraíba, onde a *A. sp. 3 aff. fraterculus* foi identificada infestando várias espécies de Myrtaceae, muitas vezes compartilhando o mesmo hospedeiro com os outros morfotipos (ver detalhes em Selivon et al., 2004). Selivon et al. (2004), indica ainda que em Vacaria há a *A.*

sp. 3 aff. fraterculus e que esta compartilha os mesmos hospedeiros da *A. sp. 1 aff. fraterculus*, a saber guabiroba (*C. xanthocarpa*) e feijoa (*F. sellowiana*).

Outra explicação para a incompatibilidade sexual parcial envolvendo a população de Piracicaba refere-se a possíveis alterações comportamentais associadas à criação semi-massiva em laboratório. Quanto a isto, argumentos prós e contras serão apontados.

Neste estudo, as populações diferiram quanto às frequências das unidades comportamentais, exibindo uma tendência de distinção entre moscas criadas no laboratório e selvagens. Quando esta tendência não foi observada, considerando a população de Pelotas, verificou-se que o curto tempo de análise e um possível efeito aleatório da rápida aceitação dos machos pelas fêmeas desta população poderiam estar atuando. No entanto, o mesmo não pode ser atribuído à população de Piracicaba, desde que esta apresentou um tempo total de análise maior que Vacaria e, ainda assim, exibiu diferença na frequência do *Fanning*.

De fato, a população de Piracicaba se mostrou diferente das populações selvagens utilizadas neste estudo. A modificação do comportamento sexual de alguns tefritídeos criados em laboratório é amplamente conhecida, sendo inclusive atribuída a algumas espécies do gênero *Anastrepha* (para revisão do assunto ver Cayol, 1999b). Mudanças extremas já foram encontradas na espécie *A. ludens*, cujos machos em algumas situações agrediam as fêmeas e, mediante essa “*mating aggression*”, foram bem sucedidos na obtenção de parceiras de acasalamento (Moreno et al., 1991).

Ainda quanto a diferenciação comportamental resultante da seleção artificial promovida pela criação em laboratório, Joachim-Bravo et al. (2009) reportou diferenças comportamentais entre populações híbridas de *C. capitata* (moscas de laboratório com inserção periódica de selvagens) e populações exclusivas de laboratório. Uma das principais diferenças estava

associada ao comportamento de oviposição, cuja população híbrida realizou oviposição apenas em mangas, ao contrário da população de laboratório que só a fez em substrato artificial (as moscas estavam em situação de escolha), rejeitando os frutos como recurso de oviposição. Considerando que a população híbrida estava sendo mantida por 15 anos em laboratório, alterações na competitividade sexual não foram notadas. No presente estudo, a população híbrida de São Joaquim não exibiu compatibilidade de acasalamento em relação à população de laboratório oriunda de Piracicaba, mas total compatibilidade foi identificada quando cruzada com as populações selvagens de Bento Gonçalves e Vacaria. Provavelmente os efeitos da criação de *A. fraterculus* em laboratório sob condições semi-massiva são mais intensos do que a criação relaxada, isto se o fator criação em laboratório for o responsável pela incompatibilidade parcial entre Piracicaba e as demais populações.

Em contrapartida ao que foi apresentado até agora há possibilidade da diferença entre Piracicaba ser intrínseca, não estando associada a mudanças devido à criação em laboratório. Vera et al. (2006) utilizou moscas selvagens de Piracicaba (a partir da primeira geração) ao cruzá-las com Tucumán e apontou certo nível de incompatibilidade sexual entre elas. Na ocasião os autores afirmaram que seria prematuro afirmar que o verificado correspondia a algum isolamento entre Argentina e Brasil, já que apenas uma população brasileira foi utilizada. Atribuiu o ocorrido ainda a uma possível redução de competitividade dos machos de laboratório de Tucumán, já que os acasalamentos heterotípicos envolvendo estes e fêmeas de Piracicaba, embora menor que os homotípicos, foram mais frequentes que o inverso. Neste estudo, no entanto, todas as populações do sul demonstram incompatibilidade sexual parcial, até a população híbrida de São Joaquim.

Em relação a Piracicaba, acreditamos que a origem de laboratório altere o comportamento, mas não a compatibilidade sexual, considerando as semelhanças entre os

índices encontrados neste estudo quando comparado a outro (Vera et al., 2006). Para que esta questão seja satisfatoriamente justificada seria necessário investigar se em Piracicaba há apenas uma ou várias entidades biológicas do complexo *A. fraterculus*. Mesmo assim, diante de uma possível contradição entre os resultados, para aplicação da TIE o fator sexual é o mais importante e deve ser levado em consideração em programas de controle envolvendo insetos estéreis.

Cayol (1999b) aponta que o papel das fêmeas na natureza é selecionar o melhor parceiro sexual que resulte em descendentes bem sucedidos. Nos animais, em geral, as fêmeas podem escolher machos de melhor qualidade (*good genes sexual selection*, ver detalhes em Möller & Alatalo, 1999 e Alcock, 2011) ou mais estimulantes (seleção *runaway*, ver detalhes em Fisher, 1930). Todavia, quando tais escolhas conduzem a uma discriminação entre espécies de um grupo aparentado (raças geográficas), elas podem contribuir para o reconhecimento das espécies (Ryan & Rand, 1993), isto evidencia a grande probabilidade de participação da seleção sexual nesse contexto.

Segundo Ritchie (2007), a atuação solitária da seleção sexual no isolamento reprodutivo parece pouco provável e o grande desafio dos estudos empíricos é distinguir quando ela conduz a este isolamento primária ou secundariamente. De acordo com Questiau (1999), é mais provável que a seleção sexual contribua para a divergência populacional de forma indireta, associadas a barreiras ecológicas. De maneira geral, evidenciar a participação da seleção sexual como principal fator resultante na formação de espécies é difícil, tendo como pré-requisito a divergência inicial de traços sexuais (incluindo o comportamento) que resultem no isolamento reprodutivo e, a garantia de que este tenha evoluído exclusivamente pela ação da seleção sexual (Panhuis et al., 2001).

O papel da seleção sexual na diferenciação das espécies crípticas do complexo *A. fraterculus*, ainda precisa ser mais bem estudado. Espécies incipientes como essas, por apresentarem pouca divergência genética, podem ser úteis no estudo do papel da seleção sexual na especiação (Panhuis et al., 2001). Trabalhos que visam elucidar o processo de especiação no complexo *A. fraterculus* são válidos, a exemplo da explicação de uma possível rota de radiação deste realizada por Segura et al. (2011), que embasa seus argumentos nos acasalamentos associativos de híbridos das populações da Argentina e Peru.

Finalmente, sugere-se que novos estudos sejam realizados, a fim de comparar as populações selvagens e de laboratório provenientes de Piracicaba para evidenciar até onde o nível de incompatibilidade encontrado neste trabalho é uma consequência da criação em laboratório ou uma característica intrínseca da população original e selvagem. Além disto, ampliar os testes para outras regiões do Brasil, como o Nordeste, é fundamental para elucidar os mecanismos de isolamento reprodutivo atuantes no complexo de espécies crípticas *A. fraterculus*. Isto é potencializado quando dados de semelhanças genéticas entre populações do Nordeste (Recife, proveniente de *Inga edulis*) e Sudeste (São Paulo, proveniente de *Psidium guajava*) separadas por uma distância de 2.500km são evidenciados, como indicado por Morgante et al. (1980).

Essas informações devem ser levadas em consideração antes de qualquer aplicação da TIE no Brasil. Uma maior precaução deve ser tomada quanto se pensa em utilizar uma única linhagem para este fim, no que se refere a populações brasileiras.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb) pela concessão da bolsa ao primeiro autor (termo de outorga: BOL0186/2010). A Agência Internacional de

Energia Atômica pelo auxílio financeiro ao projeto (Contract number: 16060). A Moscamed Brasil pelo suporte Técnico e financeiro.

Referências Bibliográficas

Alberti AC, Rodriguero MS, Gomez-Cendra P, Saidman BO, Vilardi JC (2002) Evidence indicating that Argentinian populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) belong to a single biological species. *Annals of the Entomological Society of America* 95: 505–512.

Alcock J (2011) *Comportamento animal. Uma abordagem evolutiva*. 9nd edn. Artmed, Brasil.

Aluja M, Piñero J, Jacome I, Díaz-Fleischer F, Sivinski J. 1999. Behavior of flies in the genus *Anastrepha* (Trypetinae: Toxotrypanini). In: Aluja M, Norrbom AL, eds. *Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior*. Boca Raton, FL: CRC Press, 375–406.

Anjos-Duarte CS, Joachim-Bravo IS & Costa AM (2010) Sexual behavior of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): The influence of female size on mate choice. *Journal of Applied Entomology* 135: 367–373.

Basso A, Sonvico A, Quesada-Allue LA, Manso F (200) Karyotypic and molecular identification of laboratory stocks of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Wied) (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economy Entomology* 96: 1237-1244.

Boake CRB, Shelly TE & Kaneshiro KY (1996) Sexual selection in relation to pest-management strategies. *Ann. Rev. Entomology* 41: 211–229.

Cáceres C, Segura DF, Vera MT, Wornoyayporn V, Cladera JL & Teal P (2009) Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization, and cytology. *Biological Journal of the Linnean Society* 97: 152-165.

Cayol JP, Vilardi J, Rial E, Vera MT (1999a) New indices and method to measure the sexual compatibility and mating performance of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) laboratory strains under field cage conditions. *Journal of Economic Entomology* 92: 140–145.

Cayol JP. (1999b) Changes in Sexual Behavior and Life History Traits of Tephritid Species Caused by Mass-Rearing Processes. In: Aluja M, Norrbom AL, eds. *Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior*. Boca Raton, FL: CRC Press, 843–840.

Cendra PVG (2007) Estudios genéticos y comportamentales sobre la mosca sudamericana de la fruta (*Anastrepha fraterculus*). PhD dissertation, Universidad de Buenos Aires.

Cendra PG, Calcagno G, Belluscio L, Vilardi JC (2011) Male courtship behavior of the South American fruit fly, *Anastrepha fraterculus*, from an Argentinean laboratory strain. *Journal of Insect Science* 11: 1-18.

Dobzhansky T (1951) *Genetics and the origin of species*. 3rd edn. Columbia University Press, New York.

Dodson G (1982) Mating and territoriality in wild *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) in field cages. *Journal of the Georgia Entomological Society* 17: 189 -200.

Dominguez B (2010) Proteção para quem? *Radis* 95: 11-15.

Endler & Houde (1995) Geographic variation in female preference for male traits in *Poecilia reticulata*. *Evolution* 49: 456-468.

FAO/ IAEA/ USDA (2003) Food and Agriculture Organization/ International Atomic Energy Agency/ U.S. Dep. Agric. 2003. Manual for product quality control and shipping procedures for sterile mass-reared tephritid fruit flies, version 5.0. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.

Field SA, Kaspi R & Yuval B (2002) Why do calling medflies (Diptera: Tephritidae) cluster? Assessing the empirical evidence for models of medfly lek evolution. *Florida Entomology* 85: 63–72.

Fisher RA (1930) *The genetical theory of natural selection*. 1nd edn. Oxford University Press, Oxford, UK.

Hendrichs J, Robinson A & Cayol J (2002) Medfly areawide sterile insect technique programmes for prevention, suppression or eradication: the importance of mating behavior studies. *Florida Entomologist* 85: 1-13.

Hernández-Ortiz V, Gómez-Anaya J a., Sánchez a., McPheron B a. & Aluja M (2004) Morphometric analysis of Mexican and South American populations of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae) and recognition of a distinct Mexican morphotype. *Bulletin of Entomological Research* 94:487-499.

Hernández-Ortiz AV, Bartolucci AF, Morales-valles P, Frías D & Selivon D (2012) Cryptic Species of the *Anastrepha fraterculus* Complex (Diptera : Tephritidae): A Multivariate Approach for the Recognition of South American Morphotypes. *Annals of the Entomological Society of America* 105(2): 305-318.

Hohenlohe PA & Arnold SJ (2010) The dimensionality of mate choice, sexual isolation, and speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(38): 16583-16588.

Japyassú HF, Alberts CC, Izar P & Sato T (2006) EthoSeq: a tool for phylogenetic analysis and data mining on behavioral sequences. *Behavior Research Methods* 38(4): 549-556.

Joachim-Bravo IS, Silva-Neto AM & Dias VS (2009) Biological and behavioral aspects of two laboratory strains of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae): The influence of periodic introduction of wild flies in the colony. *Acta Zoológica Mexicana* 25: 359-374.

Kamiya AC (2010) Criação massal em dieta líquida e radioesterilização da mosca-sul-americana *Anastrepha* sp. 1 *aff. fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera:Tephritidae). Masters dissertation, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brazil.

Knipling GF (1955) Possibilities of insect control of eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology* 48: 459–462.

Kovaleski A, Uramoto K, Sugayama RL, Canal DNA & Malavasi A (1999) A survey of *Anastrepha* Schiner (Diptera, Tephritidae) species in the apple growing area of the state of Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia* 43: 229-234.

Krebs JR & Davies NB (1996) *Introdução à ecologia comportamental*. Atheneu editora São Paulo.

Londres F (2011) *Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida*. 1nd Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, Rio de Janeiro, Brazil.

Machota JR, Bortoli LC, Tolotti A & Botton M (2010) Técnica de criação de *Anastrepha fraterculus* (Wied., 1830) (Diptera: Tephritidae) em laboratório utilizando hospedeiro natural. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, RS, Brazil.

Malavasi A, Morgante JS, Prokopy RJ (1983) Distribution and activities of *Anastrepha fraterculus* flies on host and non-host trees in nature. Ann. Entomol. Soc. Amer. 76: 286-292.

Møller AP & Alatalo RV (1999) Good-genes effects in sexual selection. Proceedings of the Royal Society. London, Series B 266: 85–91.

Moreno D, M Sánchez, D Robacker & Worely J (1991) Mating competitiveness of irradiated Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae). Journal Economic Entomology 84: 1227–1234.

Morgante JS, Malavasi A & Bush GL (1980) Biochemical systematics and evolutionary relationships of Neotropical *Anastrepha*. Annals Entomology Society of America 73: 622-630.

Norrbom AL & Korytkowski C (2011) New species of and taxonomic notes on *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). Zootaxa 2740: 1-23.

Norrbom AL & Korytkowski CA (2009) A revision of the *Anastrepha robusta* species group (Diptera: Tephritidae). Zootaxa 2182: 1–91.

Norrbom AL, RA Zucchi & Hernández-Ortiz V (1999) Phylogeny of the genera *Anastrepha* and *Toxotrypana* (Trypetinae: Toxotrypanini) based on morphology, pp: 299-

341. In M. Aluja and A. L. Norrbom (eds.), Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior. CRC, Boca Raton, FL.

Panhuis, TM, Butlin R, Zuk M, Tregenza T (2001). Sexual selection and speciation. Trends in ecology & evolution 16: 364-371.

Petit-Marty N, Vera M & Calcagno G (2004) Sexual behavior and mating compatibility among four populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) from Argentina. Annals of the entomological society of America 97: 1320-1327.

Questiau S (1999) How can sexual selection promote population divergence? Ethology Ecology & Evolution 11: 313–324.

Quinn PG & Keough JM (2002) Experimental design and data analysis for Biologists. Cambridge University Press.

Ritchie MG (2007) Sexual Selection and Speciation. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 38:79-102.

Robacker DC & Hart W (1985) Courtship and territoriality of laboratory-reared Mexican Fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) in cages containing host and non-host trees. Annals of the Entomological Society of America 78: 488-494.

Robinson A, Cayol JP & Hendrichs J (2002) Recent findings on medfly sexual behavior: Implications for SIT. Florida Entomology 85: 171-181.

Rull J, Abraham S, Kovaleski A, Segura DF, Islam A, Wornoayporn V, Dammalage T, Tomas US & Vera MT (2012) Random mating and reproductive compatibility among Argentinean and southern Brazilian populations of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). Bulletin of Entomological Research 1-9.

Ryan MJ & Rand AS (1993) Species recognition and sexual selection as a unitary problem in animal communication. *Evolution* 47: 647-657.

Salles LAB (1992) Metodologia de criação de *Anastrepha fraterculus* (Wied,1830) (Díptera: Tephritidae) em dieta artificial em laboratório. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 21: 479-486.

Sciurano R, Segura D, Rodriguero M & Cendra PG (2007) Sexual selection on multivariate phenotypes in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) from Argentina. *Florida Entomologist* 90: 163-170.

Segura D, Petit-Marty N, Sciurano R, Vera T & Calcagno G (2007) Lekking behavior of *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). *Florida Entomologist* 90: 154–162.

Segura DF, Vera MT, Rull J, Wornoyayporn V, Islam A & Robinson AS (2011) Assortative mating among *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) hybrids as a possible route to radiation of the fraterculus cryptic species complex. *Biological Journal of the Linnean Society* 102:346-354.

Selivon D & Perondini ALP (1998) Eggshell morphology in two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 91: 473–478.

Selivon D, Perondini ALP & Morgante JS. 1999. Haldane's rule and other aspects of reproductive isolation observed in the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). *Genetics and Molecular Biology* 22: 507–510.

Selivon D, Vretos C, Fondes L & Perondini ALP (2004) New variant forms in the *Anastrepha fraterculus* complex. In: Barnes BN, ed. Proceedings of the sixth international fruit fly symposium, Irene: Isteg Scientific Publications, 253–258.

Selivon D, Perondini ALP & Morgante JS (2005) A genetic-morphological characterization of two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 98: 367-381.

Shelly TE & Kaneshiro KY (1996) Sexual selection in relation to pest-management strategies. *Annual Review of Entomology* 41: 211-229.

Silva-Neto AM, Santos TRO, Dias VS, Joachim-Bravo IS, Benevides LJ, Benevides CMJ, Silva MVL, Santos DCC, Virgínio J, Oliveira G, Walder JMM, Paranhos BJ, Nascimento AS (2012) Mass-rearing of Mediterranean fruit fly using national low-cost yeast products. *Scientia Agrícola*.

Silva-Neto AM, Dias VS, Joachim-Bravo ISJ (2010) Importância da ingestão de proteína na fase adulta para o sucesso de acasalamento dos machos de *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae). *Neotropical Entomology* 39: 1-6.

Silva-Neto AM, Dias VS, Joachim-Bravo IS (2009) Escolha de parceiro para acasalamento em *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae): influência do envelhecimento dos machos no sucesso de cópula. *Neotropical Entomology* 38:571–577.

Sivinski J, Epsky N & Heath R (1994) Pheromone depositions on leaf territories by male Caribbean fruit flies, *Anastrepha suspensa* (Loew). *Journal of Insect Behavior* 7: 43–51.

Smith-Caldas MRB, McPheron BA, Silva JG, Zucchi RA (2001) Phylogenetic relationships among species of the *fraterculus* group (*Anastrepha*: Diptera: Tephritidae)

inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I. Neotropical Entomology 30: 565–573.

Steck GJ (1991) Biochemical systematic and population genetic structure of *Anastrepha fraterculus* and related species (Diptera: Tephritidae). Annals of the Entomological Society of America 84: 10 – 28

Stone A (1942) The fruit Flies of the genus *Anastrepha*. U.S. Dep. Agric. Misc. Publ. N°. 439.

Sugayama RL, Branco ES, Malavasi A, Kovaleski A & Nora I (1997) Oviposition behavior of *Anastrepha fraterculus* in apple and diel pattern of activities in an apple orchard in Brazil. Entomol. Exp. Appl. 83: 239-245.

Vera MC, Cáceres C, Wornoyayporn V, Islam A, Robinson AS, De la Vega M Hendrichs, HJ & JP Cayol. (2006) Mating incompatibility among populations of the South American fruit fly *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae). Society of America 99: 387-397.

Zar JH (1996) Biostatistical analysis. 4rd ed. Prentice Hall, NJ.

Figuras

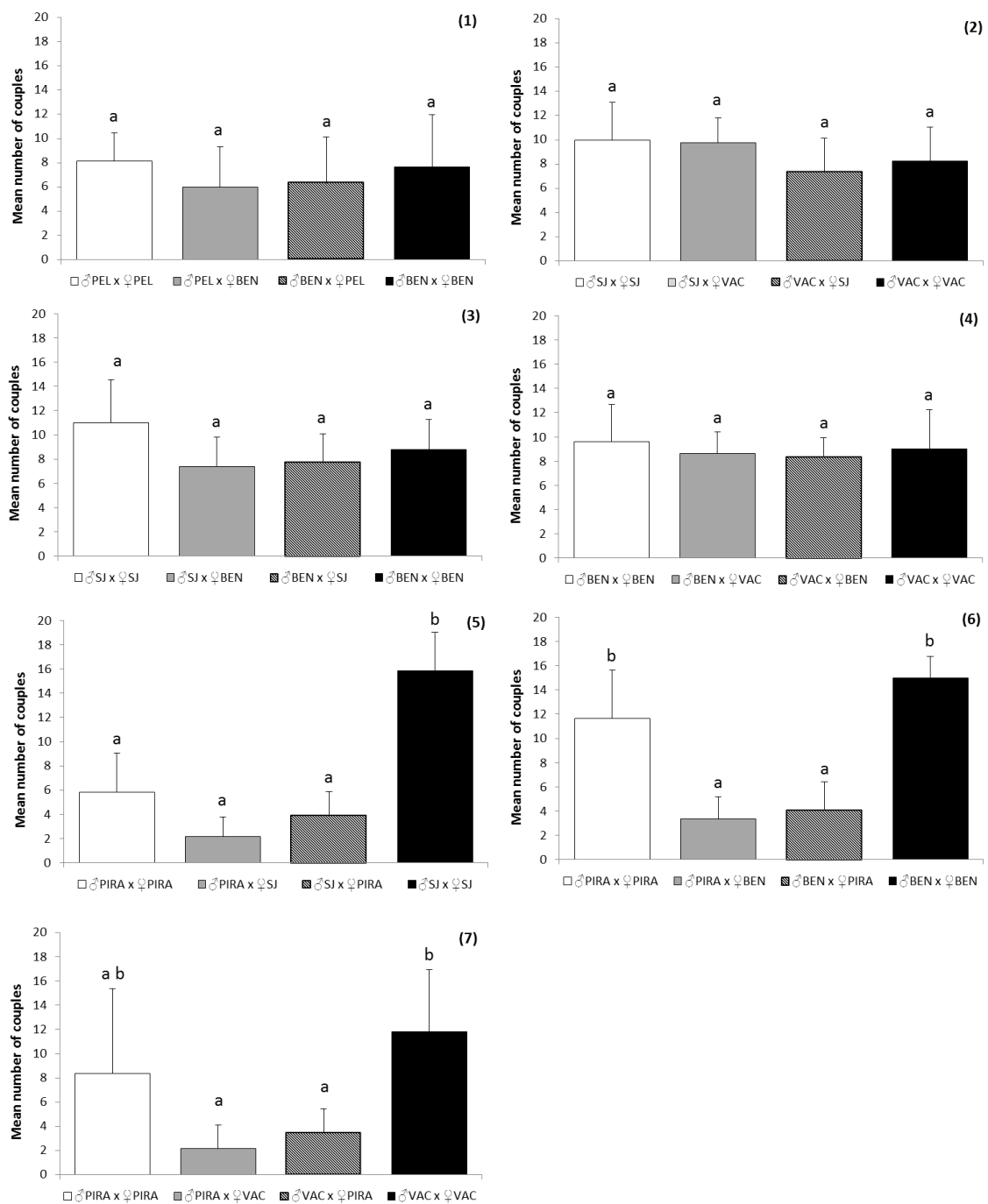


Figura 1: Número médio de casais (\pm DP) obtido nos cruzamentos entre as populações de *A. fraterculus*. No total foram realizados sete tipos de combinações pareadas: (1) Pelotas (PEL) x Bento Gonçalves (BEN) ($F_{3,23}=0.524$, $p=0.671$); (2) São Joaquim (SJ) x Vacaria (VAC) ($F_{3,31}=1.68$, $p=0.193$); (3) São Joaquim x Bento Gonçalves ($F_{3,19}=1.74$, $p=0.197$); (4) Bento Gonçalves x Vacaria ($F_{3,19}=0.22$, $p=0.88$); (5) Piracicaba (PIRA) x São Joaquim ($F_{3,23}=33.23$, $p<0.0001$); (6) Piracicaba x Bento Gonçalves ($F_{3,23}=28.43$, $p<0.0001$) e (7) Piracicaba x Vacaria ($F_{3,23}=5.69$, $p=0,005$). Barras seguidas de letras diferentes representam diferença estatística resultante da Análise de Variância (ANOVA) realizada para cada combinação (pós-teste de Turkey-Kramer) com 5% de significância.

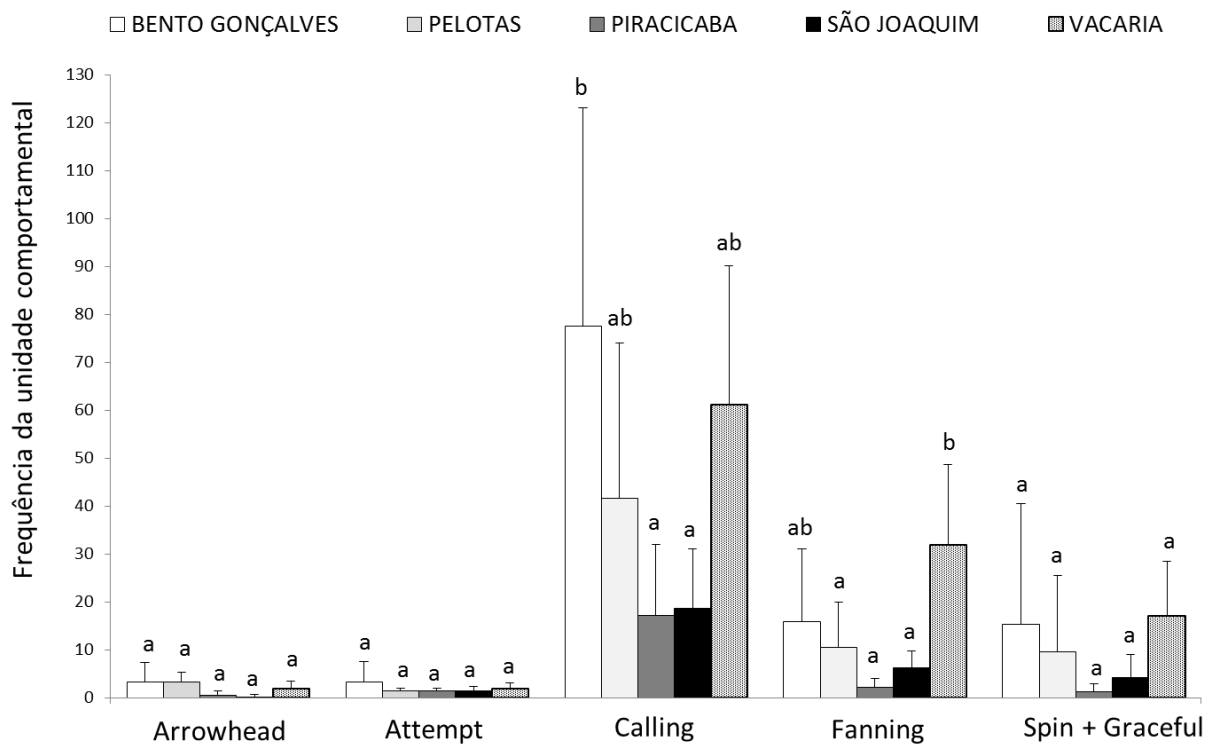


Figura 2: Frequência das unidades comportamentais relacionadas ao sucesso de cópula, *Arrowhead*, *Attempt*, *Calling*, *Fanning* e *Spin* associado ao *Graceful*, das populações do Sul e Sudeste do Brasil. Barras seguidas de letras diferentes representam diferença estatística resultante da MANOVA ($F_{4,20}=2.32$, $p = 0,024$) por aleatorização (foi utilizado como pós-teste uma ANOVA por aleatorização para cada unidade comportamental). Considerou-se uma significância de 5%.

Tabelas

Tabela 1: Sítios de coleta, hospedeiros e localização das populações de *A. fraterculus*

LOCAL	COORDENADA GEOGRÁFICA	HOSPEDEIRO	ALTITUDE (m)
Bento Gonçalves - RS	29° 10' 15" S 51° 31' 08" W	<i>Feijoa Sellowiana</i> e <i>P. cattleianum</i>	750
Pelotas - RS	31° 46' 19" S 52° 20' 34" W	<i>Psidium cattleianum</i>	7
Vacaria - RS	28° 30' 43" S 50° 56' 02" W	<i>F. sellowiana</i>	971
São Joaquim - SC	28° 17' 38" S 49° 55' 55" W	<i>Campomanesia xanthocarpa</i>	1360
Piracicaba - SP	22° 43' 30" S 47° 38' 56" W	<i>Psidium guajava</i>	547

Tabela 2: Compatibilidade sexual de populações de *A. fraterculus* do Brasil inferida pelas cópulas obtidas e avaliada através das médias (\pm EP) dos índices de performance de acasalamento

Combinação Testada	PA ^a	ISI ^b (IC 95%) ^e	MRPI ^c (IC 95%)	FRPI ^d (IC 95%)	#réplicas ^f
Pelotas - Bento Gonçalves	56.3 \pm 9.6	0.14 \pm 0.07 (-0.04 a 0.32)	0.05 \pm 0.06 (-0.12 a 0.23)	0.06 \pm 0.07 (-0.12 a 0.24)	6
São Joaquim - Vacaria	70.7 \pm 3.8	0.04 \pm 0.04 (-0.06 a 0.14)	0.11 \pm 0.05 (-0.005 a 0,23)	-0.03 \pm 0.08 (-0.22 a 0,15)	8
São Joaquim - Bento Gonçalves	70.0 \pm 4,4	0.14 \pm 0.07 (-0.05 a 0.33)	0.04 \pm 0.05 (-0.10 a 0.20)	0.07 \pm 0.08 (-0.17 a 0.32)	5
Bento Gonçalves- Vacaria	71.2 \pm 4.9	0.03 \pm 0.05 (-0.10 a 0.18)	0.01 \pm 0.05 (-0.14 a 0.17)	0.02 \pm 0.07 (-0.19 a 0.23)	5
Piracicaba - São Joaquim	55.6 \pm 3.6	0.55 \pm 0.09 (0.31 a 0.78)	-0.45 \pm 0.09 (-0.69 a -0.20)	-0.31 \pm 0.07 (-0.51 a -0.10)	6
Piracicaba - Bento Gonçalves	68.3 \pm 4.2	0.56 \pm 0.05 (0.41 a 0.71)	-0.12 \pm 0.03 (-0.21 a -0.04)	-0.08 \pm 0.08 (-0.29 a 0.12)	6
Piracicaba - Vacaria	51.6 \pm 7.7	0.53 \pm 0.10 (0.26 a 0.79)	-0.28 \pm 0.17 (-0.73 a 0.17)	-0.11 \pm 0.16 (-0.54 a 0.31)	6

^aPorcentagem de acasalamento= (número de cópulas obtidas/número total de cópulas) x 100

^b*Index of Sexual Isolation* (índice de isolamento sexual)

$$ISI = [(\text{♂A♀A} + \text{♂B♀B}) - (\text{♂A♀B} + \text{♂B♀A})]/(\text{total de acasalamentos})$$

^c*Male Relative Performance Index* (índice de performance relativa do macho)

$$MRPI = [(\text{♂A♀B} + \text{♂A♀A}) - (\text{♂B♀A} + \text{♂B♀B})]/(\text{total de acasalamentos})$$

^d*Female Relative Performance Index* (índice de performance relativa da fêmea)

$$FRPI = [(\text{♂B♀A} + \text{♂A♀A}) - (\text{♂A♀B} + \text{♂B♀B})]/(\text{total de acasalamentos})$$

^e Intervalo de confiança a nível de 95%

^f Número de réplicas

Tabela 3: Latência para o primeiro acasalamento e duração de cópula [média ± EP (número de casais)] para os diferentes tipos de cruzamentos entre as populações de *A. fraterculus* testadas.

Combinação testada	Casal (♂ - ♀)	Latência (minutos)	Análise Estatística ¹	Duração de cópula (minutos)	Análise Estatística ¹
Pelotas (PEL) - Bento Gonçalves (BEN)	PEL - PEL	5.3 ± 1.0	H _{3,24} = 0.57, p = 0.902	79.3 ± 8.1 (39)	H _{3,154} = 1.85, p = 0.603
	PEL - BEN	6.5 ± 2.6		62.3 ± 5.2 (31)	
	BEN - PEL	10.6 ± 7.0		66.6 ± 6.0 (41)	
	BEN - BEN	4.6 ± 1.1		68.7 ± 5.8 (43)	
Vacaria (VAC) - São Joaquim (SJ)	VAC - VAC	4.5 ± 0.9	H _{3,32} = 6.36, p = 0.095	86.7±6.2 (65)	H _{3,263} = 0.69, p = 0.874
	VAC - SJ	14.2 ± 7.8		86.4±6.7 (47)	
	SJ - VAC	1.8 ± 0.3		90.3±5.6 (74)	
	SJ - SJ	8.0 ± 5.7		93.1± 5.9 (77)	
Bento Gonçalves (BEN) - São Joaquim (SJ)	BEN - BEN	3.8 ± 1.7	F _{3,19} = 0.56, p = 0.649	65.6 ± 5.5 (39)	H _{3,151} = 2.63, p = 0.451
	BEN - SJ	2.2 ± 1.0		54.8 ± 7.3 (30)	
	SJ - BEN	2.2 ± 0.7		55.9 ± 6.1 (33)	
	SJ - SJ	2.0 ± 0.7		55.7 ± 5.4 (47)	
Vacaria (VAC)- Bento Gonçalves (BEN)	VAC - VAC	3.0 ± 0.7	F _{3,19} = 0.63, p = 0.606	95.3 ± 9.3 (44)a	H _{3,175} = 7.91, p = 0.048*
	VAC - BE	1.8 ± 0.6		63.6 ± 6.47 (41)b	
	BE - VAC	3.6 ± 1.4		74.0 ± 7.5 (43)ab	
	BE - BE	3.8 ± 1.4		62.3 ± 5.5 (47)b	
Piracicaba (PIRA) - São Joaquim (SJ)	PIRA - PIRA	10.8 ± 7.9	F _{3,23} = 2.13, p = 0.128	61.8 ± 7.7 (30)	H _{3,151} = 5.22, p = 0.156
	PIRA - SJ	15.1 ± 6.3		50.5 ± 16.3 (12)	
	SJ - PIRA	7.5 ± 2.7		77.3 ± 9.4 (22)	
	SJ - SJ	1.8 ± 0.9		67.2 ± 4.8 (87)	
Piracicaba (PIRA) - Bento Gonçalves (BEN)	PIRA - PIRA	5.0 ± 1.4ab	H _{3,24} = 11.77, p = 0.008**	66.5 ± 5.0 (63)	H _{3,192} = 3.38, p = 0.337
	PIRA - BEN	6.8 ± 1.6a		67.5 ± 11.4 (20)	
	BEN - PIRA	9.5 ± 3.3a		49.3 ± 5.3 (23)	
	BEN - BEN	1.5 ± 0.3b		60.3 ± 4.0 (86)	
Piracicaba (PIRA) - Vacaria (VAC)	PIRA - PIRA	9.0 ± 4.2	H _{3,19} = 11.05, p = 0.052	58.7 ± 6.5 (29)	H _{3,106} = 3.17, p = 0.366
	PIRA - VAC	15.7 ± 11.4		66.8 ± 8.2 (8)	
	VAC - PIRA	17.4 ± 4.3		47.1 ± 6.3 (17)	
	VAC - VAC	3.0 ± 0.6		56.7 ± 4.4 (51)	

¹ Para análise estatística foram utilizados um teste paramétrico de Análise de Variância (ANOVA) (F) ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (H)

Tabela 4: Porcentagem de machos localizados em cada setor da árvore para cada combinação testada.

Combinação testada	Origem do macho	Quadrantes (%*)				Altura (%*)			Profundidade (%*)	
		SE	SO	NE	NO	A	M	B	C	P
Pelotas - Bento Gonçalves ^a	Pelotas	14	13	11	9	45	2	0	18	39
	Bento Gonçalves	18	16	8	11	52	1	0	15	28
Vacaria - São Joaquin ^b	Vacaria	11	20	6	8	41	2	1	13	33
	São Joaquim	15	20	8	12	49	5	2	17	37
Bento Gonçalves - São Joaquim ^c	Bento Gonçalves	17	11	11	10	47	2	1	20	15
	São Joaquim	18	18	8	7	49	1	0	20	45
Vacaria - Bento Gonçalves ^d	Vacaria	15	12	2	19	48	2	0	25	25
	Bento Gonçalves	14	15	3	20	49	1	0	19	31
Piracicaba - São Joaquim ^e	Piracicaba	11	10	2	6	24	5	1	25	6
	São Joaquim	27	26	7	11	58	10	2	44	25
Piracicaba - Bento Gonçalves ^f	Piracicaba	17	12	11	5	42	5	1	22	27
	Bento Gonçalves	17	17	10	11	49	3	0	18	33
Piracicaba - Vacaria ^g	Piracicaba	7	15	5	13	33	6	2	21	23
	Vacaria	10	16	18	16	52	5	2	22	34

*As porcentagens foram calculadas a partir do número total de machos em cada setor (na tabela a soma destes representa 100%) para cada combinação testada

^a Quadrante: $\chi^2 = 1.21$, df= 3, p= 0.731; Altura: $\chi^2 = 2.14$, df= 2, p= 0.343; Profundidade: $\chi^2 = 0.092$, df= 1, p= 0.62

^b Quadrante: $\chi^2 = 1.71$, df= 3, p= 0.633; Altura: $\chi^2 = 1.49$, df= 2, p= 0.473; Profundidade: $\chi^2 = 0.173$, df= 1, p= 0.403

^c Quadrante: $\chi^2 = 4.11$, df= 3, p= 0.250; Altura: $\chi^2 = 2.32$, df= 2, p= 0.312; Profundidade: $\chi^2 = 0.0001$, df= 1, p= 0.572

^d Quadrante: $\chi^2 = 0.448$, df= 3, p= 0.930; Altura: $\chi^2 = 0.218$, df= 2, p= 0.641; Profundidade: $\chi^2 = 1.635$, df= 1, p= 0.201

^e Quadrante: $\chi^2 = 0.843$, df= 3, p= 0.839; Altura: $\chi^2 = 0.179$, df= 2, p= 0.914; Profundidade: $\chi^2 = 3.135$, df= 1, p= 0.077

^f Quadrante: $\chi^2 = 5.469$, df= 3, p= 0.140; Altura: $\chi^2 = 3.46$, df= 2, p= 0.177; Profundidade: $\chi^2 = 1.170$, df= 1, p= 0.279

^g Quadrante: $\chi^2 = 5.563$, df= 3, p= 0.135; Altura: $\chi^2 = 1.82$, df= 2, p= 0.402; Profundidade: $\chi^2 = 0.355$, df= 1, p= 0.552

Referências do Texto de Divulgação

- Alcock J (2011) Comportamento animal. Uma abordagem evolutiva. 9nd edn. Artmed, Brasil.
- Cáceres, C, Segura, DF, Vera MT, Wornoayporn V, Cladera JL & Teal P (2009) Incipient speciation revealed in *Anastrepha fraterculus* (Diptera: Tephritidae) by studies on mating compatibility, sex pheromones, hybridization, and cytology 97: 152-165.
- Darwin C (1871) The descent of man, and selection in relation to sex. New York: Appleton.
- Dobzhansky T (1951) Genetics and the origin of species. 3nd edn. Columbia University Press, New York.
- Fisher RA (1930) The genetical theory of natural selection. 1nd edn. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Knipling GF (1955) Possibilities of insect control of eradication through the use of sexually sterile males. Journal of Economic Entomology 48: 459–462.
- Kovaleski A, Uramoto K, Sugayama RL, Canal DNA & Malavasi A (1999) A survey of *Anastrepha* Schiner (Diptera, Tephritidae) species in the apple growing area of the state of Rio Grande do Sul, Brasil. Revista Brasileira de Entomologia 43: 229-234.
- Krebs JR & Davies NB (1996) Introdução à ecologia comportamental. Atheneu editora São Paulo.
- Lande R (1981) Models of speciation by sexual selection on polygenic traits. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3721–3725.

Lande R (1982) Rapid origin of sexual isolation and character divergence in a cline. *Evolution* 36: 213–223.

Møller AP & Alatalo RV (1999) Good-genes effects in sexual selection. *Proceedings of the Royal Society. London, Series B* 266: 85–91.

Ritchie MG (2007) Sexual Selection and Speciation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38:79-102.

Ryan MJ & Rand AS (1993) Species recognition and sexual selection as a unitary problem in animal communication. *Evolution* 47: 647-657.

Selivon D & Perondini ALP (1998) Eggshell morphology in two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 91: 473–478.

Selivon D, Vretos C, Fondes L & Perondini ALP (2004) New variant forms in the *Anastrepha fraterculus* complex. In: Barnes BN, ed. *Proceedings of the sixth international fruit fly symposium*, Irene: Isteg Scientific Publications, 253–258.

Selivon D, Perondini ALP & Morgante JS (2005) A genetic-morphological characterization of two cryptic species of the *Anastrepha fraterculus* complex (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 98: 367-381.

Steck GJ (1991) Biochemical systematic and population genetic structure of *Anastrepha fraterculus* and related species (Diptera: Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 84: 10 – 28

Stone A (1942) *The fruit Flies of the genus Anastrepha*. U.S. Dep. Agric. Misc. Publ. N°. 439.

Sugayama RL, Branco ES, Malavasi A, Kovaleski A & Nora I (1997) Oviposition behavior of *Anastrepha fraterculus* in apple and diel pattern of activities in an apple orchard in Brazil. Entomol. Exp. Appl. 83: 239-245.

APÊNDICE

Entomologia Experimentalis et Applicata

Published on behalf of The Netherlands Entomological Society

Edited by: S.B.J. Menken

Print ISSN: 0013-8703

Online ISSN: 1570-7458

Frequency: Monthly

Current Volume: 143/2012

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2010: Entomology: 28 / 83

Impact Factor: 1.404

Top Author Guidelines

Submission of manuscripts

Manuscripts submitted to *Entomologia Experimentalis et Applicata*, or any part of the work described therein, must be original and must not be simultaneously under consideration for publication elsewhere. Work previously published in abstract form should be referred to in the introduction. The Editors cannot accept responsibility for damage to or loss of papers submitted to them.

Online

Manuscripts for *Entomologia Experimentalis et Applicata* should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/eea>. Submission online enables the quickest possible review and allows online manuscript tracking. Manuscript submission online can be in Word document (.doc), or Rich Text Format (.rtf) which will be automatically converted to PDF for reviewing. Figures can be embedded in the native word processor file or may be uploaded separately in one of the following formats: GIF (.gif), JPEG (.jpg), TIFF (.tif), EPS (.eps). Figures uploaded separately in these file formats will be automatically converted to small jpegs/PDFS for reviewing.

Full upload instructions and support are available from the [ScholarOne Manuscript Submission Site](#) via the Get Help Now button (now button at top right corner of each page). When prompted online, please submit your covering letter or comments to the Editor-in-Chief including one or two sentences describing the contents of the paper and its relevance to the focus of the journal.

Pre-submission English-language editing

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found [here](#). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, **Wiley-Blackwell will dispose of all electronic material submitted two months after publication**. If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.

Presentation of manuscripts

Authors using our EndNote Word formatting template to help them to present their article correctly can use the 'Submit an EndNote manuscript' option to speed submission when in our Manuscript Central submission site. [Click here](#) to download and unzip the template. Manuscripts, including the references, should be double-spaced, line & page numbered, and written in grammatically correct English. The title page should state the title of the paper, the names and addresses of the authors, a short title for running headlines, the full address of the corresponding author and up to 12 key words, which should not duplicate words in the title. An Abstract of not more than 300 words should include the reason why the work was carried out, the key techniques, the results and the major conclusions. The abstract should contain the full scientific name, followed by that of the family and tribe of the subject insect(s), along with the full name(s) of food plants, chemicals, etc. The Latin names of insects as well as plants should be followed by the name of the describer. Original articles should include, in the following order, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Figure legends (starting on a separate sheet), Tables. The text should preferably be in MS Word (PC or Mac format) and the illustrations must be submitted according to the Wiley-Blackwell digital illustration standards (see below). The Editors reserve the right to adjust style to certain standards of uniformity.

The SI system of units should be used for all scientific and laboratory data; temperature should be expressed in degrees Centigrade. A table of commonly used SI units and their symbols is available to view by clicking the following link: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/eea_ifa.doc

Data that is integral to the paper must be made available in such a way as to enable readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in the paper. Any restriction on the availability of this data must be disclosed at the time of submission. Data may be included as part of the main article where practical. We recommend that data for which public repositories are widely used, and are accessible to all, should be deposited in such a repository prior to publication. The appropriate linking details and identifier(s) should then be included in the publication and where possible the repository, to facilitate linking between the journal article and the data. If such a repository does not exist, data should be included as supporting information to the published paper or authors should agree to make their data available upon reasonable request.

Entomologia Experimentalis et Applicata requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt

of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the manuscript (under the Acknowledgment section) and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

Corresponding authors will be asked to confirm whether or not a conflict of interest exists as part of the submission process.

Entomologia Experimentalis et Applicata is a member of and subscribes to the principles of the Committee on Publication Ethics.

Technical Notes

A short manuscript (up to four pages in print) that describes a new technique or rearing method, or substantial improvements of existing methods, or that presents data on the bio-activity of a novel substance may be submitted as a Technical Note. These short manuscripts should not have an abstract, and can be organized either along the lines of a regular manuscript or without subdivisions. Authors may also consider combining the results and discussion sections. Technical Notes should not present incomplete or preliminary data sets.

References

References in the text. References should be in the Harvard style, i.e. citations appear in the form (Smith, 1990; Smith & Jones, 1991, Smith et al., 1992), (Smith et al., 1990) or if only the year is given in brackets, there should be no comma after the author name, e.g., The results of recent work by Smith et al. (1992).... References to papers having three or more authors should give the name of the first author only, followed by et al.

Reference list. References should be listed alphabetically at the end of the article and should conform to the formats of the following examples. Journal titles should be given in full.

Journal *article:*
Dicke M & van Loon JJA (2000) Multitrophic effects of herbivore-induced plant volatiles in an evolutionary context. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 97: 237-249.

Book:
Gullan PJ & Cranston PS (1999) *The Insects. An outline of entomology.* 2nd edn. Blackwell Science, Oxford, UK.

Book chapter:
Shapiro M (1986) In vivo production of baculoviruses. *The Biology of Baculoviruses, Vol. 2: Practical Application for Insect Control* (ed. by RR Grandos & BA Federici) CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 31-62.

Where a DOI is included in a reference, it should be cited as follows:
Mazmanian SK, Ton-That H & Schneewind O (2001) Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* 40: 1049-1057. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02411.x

or alternatively if it has not yet been allocated to an issue: Mazmanian SK, Ton-That H & Schneewind O (2001) Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02411.x

References should be checked carefully to make sure that all references given in the text (and no others) appear in the list of references and that the spelling of authors names and the dates are correct.

We recommend the use of a tool such as [EndNote](#) or [Reference Manager](#) for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>

Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

Illustrations

Illustrations must be in a finished form ready for reproduction. All lettering in the figures, where possible, should be in 'Arial' font. Subdivided figures should be lettered A, B, etc. in the top left hand corner. The maximum figure size is 175 x 224 mm. Magnifications should be indicated by scale bars. Labelling should be clear and sized appropriately for the intended final size that the figure is intended to appear in the journal. Figures should be referred to in the text as (Figure 10). Authors may be asked to reduce the number of figures if some are considered to be inessential.

Electronic artwork. We would like to receive your artwork in electronic form. Save line art (vector graphics), uncompressed if possible, in Encapsulated PostScript (.eps) format and bitmap files (halftones or photographic images) in Tagged Image Format Files (.tif). The Editor will ask for these final versions of figures after the manuscript has been accepted for publication.

Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/journal.asp>

Exclusive Licence Form

Authors will be required to sign an Exclusive Licence Form (ELF) for all papers accepted for publication. Signature of the ELF is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless a signed form has been received. Please note that signature of the Exclusive Licence Form does not affect ownership of copyright in the material. (Government employees need to complete the Author Warranty sections, although copyright in such cases does not need to be assigned). After submission authors will retain the right to publish their paper in various medium/circumstances (please see the form for further details). To assist authors an appropriate form will be supplied by the editorial office. Alternatively, authors may like to download a copy of the form [Here](#).

OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to

archive the final version of their article. With OnlineOpen the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley **Online Library**, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at:

https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Colour Illustrations

It is the policy of EntomologiaExperimentalis et Applicata for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork, with the exception of colour figures in Mini Review articles. In the event that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures in colour in the printed version of the journal, EntomologiaExperimentalis et Applicata offers authors the opportunity to reproduce colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher.

Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Wiley-Blackwell require you to complete and return a [colour work agreement form](#) before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF* from the internet. If you are unable to download the form, please contact the Production Editor at the address below and they will be able to email a form to you.

Once completed, please return the form to the Production Editor at the address below:

Production Editor EntomologiaExperimentalis et Applicata Wiley-Blackwell
101 George Street Edinburgh Scotland EH2 3ES. Email: eea@wiley.com

Any article received by Wiley-Blackwell with colour work will not be published until the form has been returned.

* To read PDF files, you must have Acrobat Reader installed on your computer. If you do not have this program, this is available as a free download from the following web address:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader

will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site:<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

Early View

Entomologia Experimentalis et Applicata is covered by the Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. *Early View* articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found on the Web:<http://www.doi.org/faq.html>

Note to NIH Grantees Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

Offprints

Free access to the final PDF offprint or your article will be available via Author Services only. Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the journal. For order enquiries please email: offprint@cosprinters.com

Online production tracking is now available for your article through Author Services.

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.