

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Influência da recópula de fêmeas selvagens de *Ceratitis capitata*
(Wied., 1824) (Diptera: Tephritidae) na eficiência da técnica
do inseto estéril**

Renata Morelli-de-Andrade

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Entomologia

Piracicaba

2008

Renata Morelli-de-Andrade
Engenheiro Agrônomo

Influência da recópula de fêmeas selvagens de *Ceratitis capitata* (Wied., 1824)
(Diptera: Tephritidae) na eficiência da técnica do inseto estéril

Orientador:
Prof. Dr. **JOSÉ MAURÍCIO SIMÕES BENTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Entomologia

Piracicaba
2008

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Morelli-de-Andrade, Renata

Influência da recópula de fêmeas selvagens de *Ceratitis capitata* (Wied., 1824) (Diptera: Tephritidae) na eficiência da técnica do inseto estéril / Renata Morelli-de-Andrade. - - Piracicaba, 2008.

56 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Comportamento sexual animal 2. Esterilização sexual 3. Mosca - do - mediterrâneo
I. Título

CDD 632.774
A553i

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos e todas que trabalham pela realização de um Programa de Manejo Integrado de Moscas-das-frutas com uso da Técnica do Inseto Estéril no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Mamãe e à Cacá por todo o amor incondicional que torna a minha existência cada dia mais plena. Pelo apoio e incentivo essenciais que me permitem ser uma pessoa mais forte.

Ao meu amor André, marido e complemento de vida, eu agradeço por sua paciência e compreensão durante este período, e por todo amor doado e fortalecido ao longo dos anos. Sou muito grata e orgulhosa por partilhar a vida ao seu lado!

À grande amiga Beatriz eu quero agradecer por respeitar-me e acreditar em mim. Pela orientação sincera e fraterna, por todo o carinho e atenção recebidos, sempre! Ah, e também por disponibilizar sua experiência profissional, conhecimentos técnicos e toda a infra-estrutura para a realização do trabalho. Muito obrigada por tudo!

Ao meu orientador Maurício eu agradeço a oportunidade de cursar o mestrado sob sua orientação. Agradeço a receptividade e confiança no meu trabalho, e principalmente a atenção recebida em todos os momentos necessários.

Aos meus Tios queridos, Camilo e Sérgio, que sempre se preocupam comigo, quero agradecer o carinho e a segurança de poder confiar e contar com a ajuda de ambos em qualquer situação.

Apesar das saudades que me causam, agradeço a todas e todos os colegas da Embrapa Semi-Árido por me proporcionarem um ano muito agradável, cheio de aprendizados e por todo o tipo de ajuda recebida. Agradeço em especial ao Diniz, por me conduzir em segurança à Embrapa em dias e horários incomuns e assim tornar possível a realização de todos os experimentos.

Aos meus colegas de pós-graduação por partilharem novos sentimentos e alguns momentos de ansiedade e inquietação.

Às amigas Larissa, Marina, Maria Fernanda, Julia e Melina, e aos amigos Martin e Pedro pelos exemplos de virtudes e por me ajudarem a continuar no caminho do bem.

Aos amigos Fábio e Nelson pela acolhida e pelos vários momentos descontraídos e divertidos neste ano.

Ao Aldo eu agradeço a facilitação do trabalho e as orientações recebidas.

Agradeço à Esalq pela estrutura de ensino, à Embrapa Semi-Árido pela estrutura de pesquisa, à Biofábrica Moscamed Brasil pelo suprimento de insetos estéreis e à FAPESP pelo fomento concedido.

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1 Insetos.....	21
3.2 Comportamento de recópula de fêmeas selvagens de <i>Ceratitidis capitata</i>	22
3.3 Consequências da recópula na esterilidade induzida por machos estéreis em fêmeas selvagens de <i>Ceratitidis capitata</i>	25
4 RESULTADOS.....	29
4.1 Comportamento de recópula de fêmeas selvagens de <i>Ceratitidis capitata</i>	29
4.2 Consequências da recópula na esterilidade induzida por machos estéreis em fêmeas selvagens de <i>Ceratitidis capitata</i>	35
5 DISCUSSÃO.....	43
6 CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS.....	51

RESUMO

Influência da recópula de fêmeas selvagens de *Ceratitis capitata* (Wied., 1824) (Diptera: Tephritidae) na eficiência da técnica do inseto estéril

A técnica do inseto estéril visa a indução de esterilidade em fêmeas selvagens por meio do acasalamento com machos estéreis liberados em grandes quantidades no ambiente. Os insetos liberados devem ser capazes de competir com os selvagens pela cópula com as fêmeas, fertilizar seus ovos e evitar que ela copule novamente. A recópula com machos selvagens pode interferir na eficiência da técnica por resultar em ovos férteis. Não é conhecido como a sequência de cópula-recópula com machos estéreis e/ou selvagens determina a fertilidade dos ovos na mosca-da-fruta, *Ceratitis capitata* (Wied., 1824) (Diptera: Tephritidae), nem as consequências deste comportamento, o que justificou o presente trabalho. Os experimentos foram realizados em laboratório, na Embrapa Semi-Árido, Petrolina-PE, sob condições ambientes de temperatura e umidade relativa, para determinar a influência do tipo e ordem das cópulas na indução de esterilidade, além de parâmetros do comportamento de recópula, como frequência recópula entre as fêmeas, número de cópulas por fêmea, tempo de cópula e recópula, período refratário e competitividade sexual dos machos. Foi também avaliada a interferência do tratamento aromático dos machos estéreis com óleo de gengibre sobre a recópula das fêmeas. A Biofábrica Moscamed Brasil, Juazeiro-BA forneceu os insetos estéreis, e os selvagens foram provenientes de pupas coletadas de frutos infestados em áreas frutícolas na região do Submédio do Vale do São Francisco. Na presença de machos estéreis e selvagens concorrendo pelas cópulas na proporção de 5 estéreis: 1 selvagem, 63% das fêmeas recopularam em média 3,37 vezes com curto período refratário entre a cópula e a primeira recópula. O tratamento dos machos com óleo de gengibre diminuiu significativamente a taxa de recópula. A aromaterapia dos machos não reduziu a fecundidade e nem conferiu aos machos vantagem da competição espermática, entretanto aumentou a indução de esterilidade em fêmeas selvagens que recopularam. O segundo macho a copular a fêmea apresentou maior vantagem reprodutiva em curto período refratário. Conclui-se que para que a técnica do inseto estéril seja eficiente, é necessário que haja sempre machos estéreis de boa qualidade no campo para recopularem as fêmeas em curto período refratário.

Palavras-chave: Mosca-das-frutas; Comportamento sexual; Técnica do inseto estéril;

Ceratitis capitata

ABSTRACT

Influence of wild *Ceratitis capitata* (Wied., 1824) (Diptera: Tephritidae) females remating on the efficiency of the sterile insect technique

The sterile insect technique (SIT) aim at the induction of sterility in wild females by mating with sterile males released in great amounts in the field. These released males must compete with wild ones being able to attract and mate wild females, fertilize their eggs and avoid remating with a wild male that would lead to fertile eggs and consequently reduce the efficiency of the technique. The circumstances in which remating of *Ceratitis capitata* (Wied., 1824) (Diptera: Tephritidae) females interfere with the SIT, as well as the consequences of this behavior are not well known, what justified the present study. The experiments were carried out at the Embrapa Semi-Árido, Petrolina-PE, inside the laboratory under ambient conditions of temperature and relative humidity to determine the influence of the order of mating type in the induction of sterility. The parameters evaluated to better understand the remating behavior were remating frequency, number of matings per female, mating and remating time, refractory period, sexual competitiveness of males, and the interference of males' aromatherapy with ginger root oil in the female's remating. Moscamed facility, Juazeiro-BA, provided the sterile males and the wild ones were from pupae collected from infested fruits from commercial orchards in the São Francisco River Valley. In the presence of sterile and wild males in competition (5 sterile: 1wild), 63% of females remated in average 3.37 times in short refractory period between the mating and the first remating. The male's aromatherapy with ginger root oil reduced significantly the remating rate, but did not reduce the fecundity, neither confer advantage to the males in the sperm competition, however increased the induction of sterility in wild females multiply mated. The second male to mate the female presented reproductive advantage if the refractory period was short. For the SIT be efficient the sterile males in the field must always have great quality to remate the females in a short refractory period and thus induce sterility in the wild population.

Keywords: Fruit fly; Sexual behavior; Sterile insect technique; *Ceratitis capitata*

1 INTRODUÇÃO

A Técnica do Inseto Estéril (TIE) é um método de controle de pragas que tem recebido interesse especial dentro de programas de manejo integrado de moscas-das-frutas (Diptera: Tephritidae) no mundo e, mais recentemente, no Brasil, pelo fato de ser muito eficiente e inócuo ao meio ambiente e à saúde humana. A TIE é um método de controle biológico seguro, pois é totalmente direcionado para a espécie alvo, não há liberações de agentes exóticos e não introduz novo material genético, uma vez que os indivíduos são estéreis. O método consiste na liberação de grande quantidade de insetos estéreis no campo para que a cópula com indivíduos selvagens resulte em gerações inviáveis, e desta forma reduz-se o potencial reprodutivo das populações selvagens. Liberações constantes podem resultar até na erradicação da praga, principalmente em locais onde há isolamento geográfico e/ou climático que viabilizem um programa de erradicação. No entanto, a TIE é efetiva somente quando aplicada em área ampla, visando a população total da praga na região e não somente dentro de pomares isolados.

O sucesso do uso da TIE para a mosca-do-mediterrâneo (moscamed), *Ceratitis capitata* (Wied., 1824) (Diptera: Tephritidae), provém do fato desta ser uma espécie de reprodução sexuada com boa capacidade de se dispersar no campo e possível de ser criada massalmente.

No Brasil, a região nordeste está sendo pioneira na implantação da TIE dentro de um programa de Manejo Integrado de moscas-das-frutas em área ampla, com a implantação da Biofábrica Moscamed Brasil em Juazeiro-BA. A localização é bastante estratégica uma vez que o Submédio do Vale do São Francisco é responsável por mais de 95% das exportações de manga e uva do país (MALAVASI; NASCIMENTO, 2003). Além disso, o fato desta região apresentar algumas espécies de mosca-das-frutas (*Anastrepha obliqua*, *A. fraterculus* e *C. capitata*) consideradas pragas de importância quarentenária em alguns países como EUA, Japão e outros da Ásia (MALAVASI; NASCIMENTO, 2003), implica na necessidade de manter a população de moscas-das-frutas na região em níveis bem baixos (índice $MAD < 1$). E ainda assim há necessidade da aplicação de tratamentos quarentenários pós-colheita, o que reduz a qualidade dos produtos e eleva os custos de produção e exportação.

Na década de 80, geneticistas e entomologistas da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA) desenvolveram uma linhagem mutante de *C. capitata*, onde as pupas fêmeas são brancas, diferentes dos machos que são marrons (cor selvagem). Desta forma, separam-se as fêmeas antes da emergência, e liberam-se, após a irradiação, apenas machos no campo. A liberação somente de machos estéreis aumenta a eficiência da técnica, pois estes só copularão com fêmeas selvagens, e as fêmeas, mesmo estéreis, danificam o fruto pela punctura. Com o intuito de minimizar o custo de produção de machos estéreis, na década de 90, o mesmo grupo de pesquisadores desenvolveu, sobre o mutante “pupa branca”, um outro tipo de mutação onde as fêmeas possuem sensibilidade letal à temperatura (*ts/*) de 34°C, ainda na fase de embrião, tornando possível a eliminação das fêmeas no início do processo produtivo. Atualmente, todas as Biofábricas de Moscamed no mundo já utilizam linhagens mutantes *ts/* com grande economia na produção. No Brasil é usada uma das mais recentes, a Vienna 8.

O processo de desenvolvimento das linhagens, de criação massal e de irradiação antes da liberação, submetem os insetos à condições artificiais adversas, incluindo altas densidades populacionais, esterilização e manipulação genética. Todos estes fatores afetam a biologia e interferem no comportamento dos insetos, resultando em redução da qualidade dos machos estéreis, que implica num custo inevitável, porém redutível, para os programas de TIE (CAYOL, 2000; LUX et al., 2002a).

A probabilidade das fêmeas selvagens copularem novamente após terem sido copuladas pelos machos estéreis é altamente relevante para a eficiência da TIE. O entendimento de como a recópula interfere na indução de esterilidade promovida pela técnica do inseto estéril nas fêmeas selvagens, é fundamental para o sucesso da técnica. Com o comportamento de recópula das fêmeas elucidado, e suas implicações no controle populacional da mosca-do-mediterrâneo determinadas, é possível otimizar e adequar programas de supressão da praga em questão, de forma que o possível efeito na redução da esterilidade das fêmeas em função deste comportamento seja minimizado pela quantidade de insetos liberados, intervalos e quantidade de liberações.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O objetivo da TIE é a indução de esterilidade nas fêmeas selvagens pelos machos estéreis liberados, e para tal a cópula tem que ter sucesso do começo ao fim. A simples capacidade de copular não garante a eficiência do controle e o caminho para alcançar o sucesso inicia-se no “chamado” da fêmea pelo macho. Os machos de *C. capitata* se organizam em sítios de agregação (*lek sites*) para a cópula e, juntos, atraem as fêmeas para esses pontos. Os machos de linhagens mutantes estabelecem agregações como os selvagens (LUX et al., 2002b), contudo, a irradiação parece prejudicar este tipo de comportamento. Muitas vezes nem chamam a fêmea liberando feromônio antes do encontro, que desta forma ocorre ao acaso, o que diminui as chances de cópula (KRAAIJEVELD; CHAPMAN, 2004) além de poder resultar numa reação agressiva da fêmea à aproximação deste macho (LUX et al., 2002a).

Os machos cortejam as fêmeas para a cópula e estas escolhem o macho de acordo com seu desempenho, aceitando a cópula deste dentre os outros (FIELD; KASPI; YUVAL, 2002). A irradiação parece não causar grandes alterações qualitativas no cortejo nupcial dos machos, mas altera quantitativamente muitos aspectos, principalmente em relação à duração de certas etapas, a ponto de reduzir em 40-50% o desempenho dos machos irradiados em relação aos não irradiados (LUX et al., 2002a). Em geral eles ficam mais lentos, demoram mais para envolver-se na cópula e ficam mais tempo parados que andando ou voando.

Apesar dos machos estéreis serem capazes de competir nos sítios de agregação, copular com as fêmeas selvagens, transferir esperma adequadamente e induzir esterilidade nestas, eles são claramente menos competitivos que os concorrentes selvagens (HENDRICHS et al., 2002; KRAAIJEVELD; CHAPMAN, 2004). Doses altas de irradiação aplicadas para total esterilização dos machos resultam em baixa competitividade sexual, enquanto que doses menores, apesar de insuficientes para total esterilização, podem ser mais interessantes para um programa de supressão por meio da TIE, pois com maior competitividade de cópula podem-se alcançar maiores índices de indução de esterilidade nas fêmeas selvagens. No entanto, a demanda em programas de erradicação pela TIE é de que o processo de esterilização resulte em, no

mínimo, 99,5% de inviabilidade dos ovos (ROBINSON; CAYOL; HENDRICHS, 2002; FAO/IAEA/USDA, 2003).

A probabilidade das fêmeas selvagens copularem novamente após terem sido copuladas pelos machos estéreis é altamente relevante para a TIE. A cópula do macho estéril tem que durar o suficiente para o preenchimento das espermatecas com esperma viável. Os machos estéreis devem possuir espermatozóides viáveis, porém com mutação letal dominante, além do fluído acessório que tem importante papel na alteração do comportamento das fêmeas após a cópula (JANG, 2002; MIYATAKE; CHAPMAN; PARTRIDGE, 1999; MOSSISON; YUVAL, 2003). O fluído produzido pelos machos nas glândulas acessórias, transferido às fêmeas, contém componentes que alteram a resposta olfativa das fêmeas, sendo que a atração por feromônio sexual transforma-se em atração por odores de frutas hospedeiras, ocorrendo assim uma redução na receptividade à recópula e indução do comportamento de oviposição. Estudos mostram que a irradiação utilizada para esterilização dos machos não afeta o fluído das glândulas acessórias (JANG, 2002).

Se os machos não transferirem um volume espermático suficiente durante a cópula de forma a alterar o comportamento da fêmea, de atração sexual para comportamento de oviposição, ocorrerá a recópula. Cabe ao macho garantir que a fêmea copulada por ele utilize seus espermatozóides para fecundar todos os seus ovos. Machos de linhagens de laboratório copulam por menor tempo que os selvagens (HENDRICHS et al., 1993). Segundo Seo et al. (1990) e Taylor et al. (2001), machos de laboratório e irradiados transferem menos espermatozóides que machos selvagens e, apesar de cópulas longas diminuir as chances de recópula (VERA et al., 2002), o sucesso na transferência não está relacionado com a duração da cópula (TAYLOR et al, 2001). A irradiação afeta negativamente o comportamento dos machos, assim os machos estéreis são menos capazes de evitar a recópula que os machos selvagens, o que é agravado quando a linhagem é colonizada há muito tempo (ROBINSON; CAYOL; HENDRICHS, 2002).

A quantidade de espermatozóide armazenado pela fêmea depois da 1ª inseminação pode determinar se ela irá copular novamente e quando isso ocorrerá. Há menções na literatura de que o macho que insemina uma fêmea não-virgem pode

garantir a paternidade da maioria da progênie de forma mais eficiente que pela inibição da recópula das fêmeas virgens por um período maior (VERA et al., 2003), pois seus espermatozóides estarão localizados estrategicamente no trato genital das fêmeas (YUVAL; BLAY; KASPI, 1996). Esse sucesso pode ser alcançado a partir do direcionamento da ejaculação na câmara de fertilização, o que é passível de acontecer uma vez que o aparelho genital do macho é morfológicamente adaptado para tal (MARCHINI et al., 2001).

A recópula é comum em linhagens de laboratório nestas condições (MIYATAKE; CHAPMAN; PARTRIDGE, 1999; MOSSIVON; YUVAL, 2003; KRAAIJEVELD; CHAPMAN, 2004; KRAAIJEVELD et al., 2005), assim como em fêmeas selvagens em condições de gaiolas de campo (MCINNIS; RENDON; KOMATSU, 2002; VERA et al., 2002) e na natureza (ROBINSON; CAYOL; HENDRICHS, 2002). Kraaijeveld et al. (2005) encontraram 4 a 28% de recópula em fêmeas selvagens ao analisar a progênie das fêmeas coletadas do campo. Mossinson e Yuval (2003) citam frequências de recópula em fêmeas selvagens coletadas de 3,8 a 21% encontradas por Chios et al. (2002) após analisar a paternidade da progênie, demonstrando que a recópula é também comum em populações selvagens. Yuval, Blay e Kaspi (1996) não constataram diferença significativa na quantidade de espermatozóides presente nas fêmeas de laboratório copuladas ininterruptamente por uma vez, e naquelas coletadas no campo. Os autores sugerem que a recópula é uma estratégia da fêmea para manter muitos espermatozóides nas espermatecas a partir de cópulas repetitivas, pois constataram também, assim como Whittier e Shelly (1993), um rápido esvaziamento das espermatecas após oviposição subsequente à primeira cópula.

As limitações sexuais dos machos estéreis têm início antes da cópula, durante o chamado (liberação de feromônio sexual) e o cortejo. Após uma corte bem sucedida, a cópula de fato acontece. Tem-se início então a transferência de espermatozóide, fator determinante na aceitação de uma segunda cópula pela fêmea, e que também é afetada quantitativamente pela irradiação. Sendo assim, em função do comportamento do macho no cortejo e seu desempenho sexual, a propensão de uma fêmea copular novamente após uma primeira cópula é de fato maior quando esta acontece com um macho irradiado, conforme constatado por Hendrichs et al. (1993), Vera et al. (2002) e

Mossinson e Yuval (2003) e, segundo Kraaijeveld e Chapman (2004), a tendência maior é que a segunda cópula aconteça com um macho selvagem e não com um estéril.

A baixa competitividade dos machos estéreis é um desafio a ser superado na melhoria da técnica do inseto estéril. Estudos são feitos na busca de minimizar os efeitos negativos da criação massal (CALKINS; PARKER, 2005; FISHER; CÁCERES, 2005) e da irradiação (PARKER, 2005; FISHER, 1997), de aumentar a longevidade e de melhorar o desempenho sexual por meio da alimentação e da aromaterapia dos adultos (SHELLY; KENNELLY, 2002; MCINNIS; RENDON; KOMATSU, 2002, PARANHOS et al., 2008). A exposição dos machos estéreis ao aroma do óleo de gengibre antes da liberação é um procedimento simples, que pode ser feito em grande escala (SHELLY; EDU; PAHIO, 2004; SHELLY et al., 2004) e que aumenta a taxa de cópula dos machos criados massalmente e irradiados em até três vezes (SHELLY; MCINNIS, 2001; SHELLY et al., 2002, 2003; MCINNIS; SHELLY; KOMATSU, 2002; PARANHOS et al., 2008). Barry et al. (2003) sugerem o uso do óleo de gengibre para diminuir a proporção de liberação 'estéril: selvagem', pelo grande aumento no sucesso de cópula dos machos irradiados quando tratados, sendo a proporção de 1:1 (tratados: selvagem) equivalente a 5:1 ou 10:1 (não tratados: selvagem).

Paranhos et al., (2008) constataram um aumento no tempo de cópula dos machos de laboratório e irradiados quando tratados com óleo de gengibre, e sugerem que, ao aumentar o tempo de cópula dos machos tratados com óleo de gengibre, a probabilidade de ocorrer a recópula pode diminuir. Contudo, ainda não é conhecido se este tempo maior de cópula em função do efeito do óleo de gengibre significa uma maior transferência de esperma.

O aumento no sucesso de cópula dos machos irradiados tratados com óleo de gengibre significa que mais fêmeas estarão copulando com machos estéreis, o que implica em maior probabilidade de recópula. Shelly, Edu e Pahio, (2004) mostram que fêmeas que copulam com machos de laboratório são mais propensas a uma segunda cópula com os machos tratados com óleo de gengibre do que com machos não tratados, isso em condição de laboratório. Já em gaiolas de campo, não encontraram diferença significativa na frequência de recópula com machos tratados e não tratados, independente do macho envolvido na primeira cópula. Sendo assim o uso do óleo de

gingibre para aumento da eficiência da técnica do inseto estéril tem que ser melhor avaliado, com relação a recópula e na indução de esterilidade em fêmeas selvagens em condições de competição com machos selvagens, para que a liberação de machos tratados sejam mais eficientes se realizadas de forma estratégica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos na Embrapa Semi-Árido em Petrolina-PE, no período de fevereiro a setembro de 2008. O projeto foi dividido em duas etapas: (i) estudo do comportamento de recópula; e (ii) implicações deste comportamento na técnica do inseto estéril, sendo os resultados da primeira etapa determinantes na realização da segunda.

3.1 Insetos

Os adultos selvagens de *C. capitata* utilizados nos experimentos foram provenientes de pupas coletadas em frutos infestados recolhidos ao acaso em áreas frutícolas na região do Submédio do Vale do São Francisco em Petrolina-PE e mantidos em vermiculita por 15 dias. Em seguida, as pupas foram peneiradas e acondicionadas em gaiolas de acrílico (30x30x30cm). No primeiro dia após a emergência dos adultos, machos e fêmeas foram separados e mantidos virgens em gaiolas distintas.

Os machos estéreis utilizados foram da linhagem *ts*/-Viena 8 irradiados com 95 Gy de radiação gama (fonte cobalto 60). As pupas foram produzidas na Biofábrica Moscamed Brasil, Juazeiro-BA e irradiadas, 24 horas antes da emergência, na Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE. As pupas estéreis foram devidamente acondicionadas em gaiolas de acrílico e tela com dimensões de 30x30x30 cm (100ml de pupas/gaiola) para a emergência dos adultos.

Os machos estéreis foram mantidos em laboratório, com temperatura e umidade relativa controladas (25°C/ 50-60% UR) até estarem sexualmente maduros, entre o 5º e 6º dia, para montagem dos experimentos. Os insetos selvagens também foram mantidos em laboratório, porém não foi efetuado o controle de temperatura e umidade relativa, até atingirem a maturidade sexual entre o 7º e 10º dia de idade. Todos os insetos adultos, selvagens e estéreis, tiveram livre acesso à água e dieta completa [(3 partes de açúcar: 1 parte de levedura hidrolisada) + 10% de gérmen de trigo] antes e durante os experimentos.

Para o tratamento aromático com óleo de gengibre, as pupas estéreis foram acondicionadas conforme já descrito. Entretanto no 4º dia de idade, os adultos foram expostos ao aroma do óleo de gengibre em uma sala fechada e escura de 23m³. Sobre um papel absorvente em uma placa de Petri, foram colocados 2,3 ml de óleo de gengibre (*Citrus and Allied Essences Ltd.*), com um ventilador direcionando o forte aroma diretamente aos machos (Figura 1). A exposição à dose de 0,1 ml/m³ teve duração de 20 horas em condições controladas de temperatura e umidade relativa (25°C/ 50-60% UR). Os experimentos tiveram início logo após a exposição.



Figura 1 - Tratamento aromático de machos estéreis da mosca-da-fruta, *Ceratitis capitata* (gaiola) com óleo de gengibre (placa de Petri) em uma sala de 23 m³

3.2 Comportamento de recópula de fêmeas selvagens de *C. capitata*

Os estudos do comportamento de recópula tiveram como objetivo determinar a frequência de recópula das fêmeas, o número de recópulas por fêmea, o intervalo entre a cópula e a primeira recópula (período refratário) e a duração das cópulas e recópulas com machos selvagens e estéreis tratados e não tratados com óleo de gengibre.

O comportamento de recópula das fêmeas foi avaliado em três situações: (i) somente machos selvagens na cópula e nas recópulas, sendo a cópula na proporção de 1 macho selvagem: 1 fêmea selvagem e as recópulas na proporção de 3 machos

selvagens: 1 fêmea selvagem (FAO/IAEA/USDA, 2003); (ii) machos estéreis concorrendo com machos selvagens pelas fêmeas na cópula e nas recópulas, sendo a cópula na proporção de 5 machos estéreis: 1 macho selvagem: 1 fêmea e as recópulas na proporção de 15 machos estéreis: 3 machos selvagens: 1 fêmea selvagem; (iii) idem à situação “ii”, porém os machos estéreis foram tratados com óleo de gengibre.

Os experimentos foram realizados em laboratório, porém em condições ambientais locais (~ 27 a 31°C/ 10 a 80% UR). As cópulas e recópulas tiveram início sempre entre 6:30 e 7:00 horas da manhã. Um dos tipos de macho foi marcado no tórax com tinta branca a base de água para identificação (Figura 2a). Para a primeira cópula, aproximadamente 100 fêmeas, 100 machos selvagens e 500 machos *ts/V8* irradiados tratados ou não tratados com óleo de gengibre, sexualmente maduros e virgens, foram colocados juntos em uma gaiola de acrílico de 30x30x30cm na proporção de 5 machos estéreis: 1 macho selvagem: 1 fêmea, ou então 1 macho selvagem: 1 fêmea selvagem (Figura 3a). Os casais em cópula foram coletados individualmente, após o macho introduzir o edeado na fêmea, e mantidos em tubos plásticos identificados. Para cada casal, anotou-se o tipo de macho envolvido, o início da cópula (após introdução do edeago) e o término. Ao encerrar a cópula, as fêmeas foram separadas dos machos e mantidas, duas a duas, em gaiolas de acrílico de 20x20x20 cm identificadas e com livre acesso a água, dieta e bagas de uva para oviposição. Uma das fêmeas contidas na gaiola foi marcada no tórax com tinta branca a base de água (Figura 2b) para completa identificação.



Figura 2 - Macho (a) e fêmea (b) de *Ceratitidis capitata* marcados no tórax com tinta branca a base de água

Diariamente, até o sexto dia após a cópula (KRAAIJEVELD et al., 2005), a partir das 6:30 horas, os pares de fêmeas foram retirados das gaiolas e inseridos em outras gaiolas idênticas contendo 6 machos selvagens e 30 irradiados, tratados ou não com óleo de gengibre, ou somente 3 machos selvagens, seguindo a proporção de 15 machos estéreis: 2 machos selvagens: 1 fêmea selvagem num total de 38 insetos/gaiola ou 8 insetos/gaiola (Figura 3b). Anotaram-se as fêmeas em recópula, o tipo de macho envolvido e a duração da recópula. Às 15:30 horas, os pares de fêmeas foram retirados e transferidos para sua gaiola inicial e o substrato para oviposição trocado. As fêmeas tiveram acesso constante às bagas de uva para oviposição durante e após o período diário de recópula.

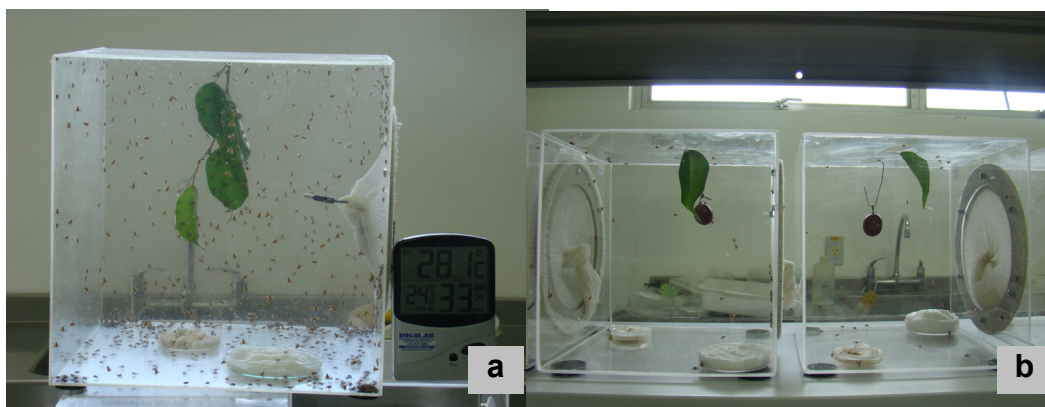


Figura 3 - Gaiola de acrílico de 30x30x30 cm utilizada para cópula de *Ceratitidis capitata*, contendo água, alimento e ramo de *Ficus benjamina*, pois os machos se agregam na face inferior das folhas (a); gaiolas de acrílico de 20x20x20 cm utilizadas para recópula contendo água, alimento, baga de uva para oviposição e folha de *F. benjamina* (b)

Dessa forma, foi avaliada a frequência de recópula das fêmeas selvagens, o número de recópulas, a duração e o intervalo entre elas de acordo com o(s) tipo(s) de macho(s) envolvido(s). Conforme a necessidade, os experimentos foram repetidos duas vezes de forma a obter o número mínimo de 30 repetições, sendo cada fêmea considerada uma repetição. As fêmeas consideradas como repetição, permaneceram vivas até o final do experimento, passando pelas etapas de cópula, recópulas e oviposição antes e após a recópula.

Para verificar se houve diferença entre as frequências de recópulas das fêmeas na presença de machos tratados e não tratados com óleo de gengibre, assim como no

número médio de recópulas, no período refratário e nas durações médias da cópula e das recópulas (1ª e 2ª), foi utilizado o teste de Qui-quadrado (χ^2).

Para estimar a competitividade dos machos estéreis e estéreis tratados com óleo de gengibre em relação aos selvagens, calculou-se o Índice de Esterilidade Relativa ou RSI. Segundo a FAO/IAEA/USDA (2003), o RSI, é o principal índice de competitividade sexual dos machos, e é uma estimativa da esterilidade que poderia ser induzida em uma população selvagem pelos machos estéreis liberados em determinada proporção de machos estéreis e selvagens (CAYOL et al., 1999). O RSI é calculado pela razão entre o número de cópulas estéreis e o total de cópulas, e varia entre 0 e 1 em proporção de 1 estéril:1 selvagem, sendo que valores menores que 0,5 indicam melhor desempenho dos machos selvagens, maiores que 0,5 indicam melhor desempenho dos machos estéreis e valores iguais a 0,5 indicam desempenho igual de ambos os machos (CAYOL et al., 1999; FAO/IAEA/USDA, 2003). Como a proporção de machos estéreis: selvagens foi de 5:1, o RSI esperado de igual competitividade dos machos é de 0,83 (McInnis, comunicação pessoal) sendo que valores abaixo deste indicam que os machos estéreis são menos competitivos que os selvagens e valores acima indicam maior competitividade dos estéreis.

3.3 Conseqüências da recópula na esterilidade induzida por machos estéreis em fêmeas selvagens de *C. capitata*

A segunda etapa foi determinar as conseqüências da recópula na indução de esterilidade em fêmeas selvagens pela técnica do inseto estéril. Para isso, foram avaliadas a fecundidade e fertilidade resultantes da ordem de cópula e recópula de acordo com os tipos de machos envolvidos, em período refratário de dois e cinco dias.

A fecundidade e a fertilidade das fêmeas selvagens (♀S) envolvidas em cópulas/recópulas com machos irradiados (♂irrad) e selvagens (♂S), foram avaliadas em 8 situações (tratamentos) diferentes:

primeira cópula → recópula

1. ♂irrad x ♂S x ♀S → ♂irrad x ♂S x ♀S
2. ♂irrad tratados com óleo de gengibre x ♂S x ♀S → ♂irrad tratados com óleo de gengibre x ♂S x ♀S

3. ♂irrad x ♀S → ♂irrad x ♀S
4. ♂irrad x ♀S → ♂S x ♀S
5. ♂irrad tratados com óleo de gengibre x ♀S → ♂S x ♀S
6. ♂S x ♀S → ♂S x ♀S
7. ♂S x ♀S → ♂irrad x ♀S
8. ♂S x ♀S → ♂irrad tratados com óleo de gengibre x ♀S

Para a primeira cópula, aproximadamente 75 fêmeas selvagens, machos irradiados e machos selvagens foram liberados as 6:30 horas, em uma gaiola de acrílico de 30x30x30 cm com livre acesso a água e dieta. Nas situações que envolveram concorrência entre machos estéreis e selvagens pelas fêmeas, a proporção entre estes foi de 5 machos estéreis: 1 macho selvagem: 1 fêmea. Quando havia somente um tipo de macho envolvido, a proporção foi de 1 macho: 1 fêmea.

Os casais em cópula foram coletados individualmente até as 15:30hs, e mantidos em tubos plásticos identificados. Após o término da primeira cópula, as fêmeas foram separadas dos machos e mantidas, em grupos de 10, em gaiolas de acrílico de 20x20x20 cm com livre acesso a água, dieta e bagas de uva para oviposição. As bagas foram trocadas a cada 24 horas, e a partir do sexto dia após a cópula foram também dissecadas para a coleta dos ovos, os quais foram mantidos sobre papel de filtro umedecido contido em placa de Petri a 25°C. As eclosões foram quantificadas 4 dias após a coleta dos ovos. Este procedimento foi repetido diariamente até o 12º dia após a cópula.

Dois dias após a cópula, as fêmeas previamente copuladas foram submetidas à recópula e para tal, foram liberadas as 7:30hs da manhã, em uma gaiola de acrílico de 30x30x30 cm contendo os machos (5 machos estéreis: 1 macho selvagem: 1 fêmea, ou 1 macho: 1 fêmea, com e sem concorrência de tipos de machos respectivamente). Na mesma gaiola havia disponibilidade de água, dieta e bagas de uva. Os pares em cópula foram coletados e identificados em tubos de plástico. Após o término da cópula, as fêmeas recopuladas foram separadas dos machos e colocadas novamente em gaiolas de acrílico de 20x20x20 cm identificadas, com água, dieta e bagas de uva. As

fêmeas que não recopularam foram separadas dos machos às 15:30hs e assim mantidas em gaiolas com água, dieta e bagas de uva. As bagas de uvas foram trocadas diariamente e a partir do sexto dia após a cópula foram também dissecadas para coleta diária dos ovos, que foram mantidos conforme descrito anteriormente. As fêmeas que não recopularam no 2º dia após a cópula, tiveram a oportunidade de recopular três dias depois, no 5º dia após a cópula seguindo a mesma metodologia já descrita acima.

Para as oito situações de cópula → recópula descritas anteriormente, a fecundidade diária e a fertilidade foram avaliadas em fêmeas que somente copularam sem recópula, e em fêmeas que recopularam em período refratário de 2 dias ou de 5 dias. Foram feitas sete repetições, sendo cada dia de coleta de ovos, a partir do 6º até o 12º, uma repetição. Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Jhonckheere (CAMPOS, 1983), e em caso de diferença significativa, foi feito o teste ajustado de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$) para verificação das diferenças.

4 RESULTADOS

4.1 Comportamento de recópula de fêmeas selvagens de *C. capitata*

Quando machos estéreis e selvagens concorreram entre si por fêmeas selvagens, a ocorrência de cópulas múltiplas foi alta e cerca de 63% das fêmeas recopularam, em média, 3,37 vezes (Tabelas 1 e 2). Em situação semelhante, quando machos estéreis foram tratados com óleo de gengibre, a frequência de recópulas foi significativamente menor entre as fêmeas (47%) e também menor, mas sem diferença estatística, no número de recópulas por fêmea (1,7 vezes). Não houve fêmeas que recopularam mais de cinco vezes quando os machos estéreis receberam tratamento com óleo de gengibre. Em ambas as situações, a densidade de insetos nas gaiolas foi menor que em outros estudos que relataram taxas de recópulas (Tabela 3), porém, os presentes valores são maiores que os relatados. Shelly, Edu e Pahio (2004a) observaram que o tratamento aromático dos machos estéreis de *C. capitata* com óleo de gengibre aumentou significativamente a taxa de recópula de fêmeas de laboratório com machos estéreis após uma primeira cópula com machos férteis. As condições experimentais entre o presente trabalho e o citado anteriormente são diferentes, e como a ocorrência de cópulas selvagens foi muito baixa, não é possível comparar a taxa de recópula de acordo com o macho da primeira cópula, visto que das 5 fêmeas que copularam com machos selvagens, somente uma recopulou, e foi com macho estéril com óleo de gengibre.

Tabela 1 - Efeito do tratamento aromático de machos estéreis com óleo de gengibre (OG) na frequência de recópula de fêmeas selvagens de *Ceratitis capitata*

Tratamentos ⁽¹⁾	Nº de fêmeas (frequência de recópula)
Machos estéreis	51(62,96%)
Machos estéreis com OG	19 (47,50%)
Total	70
χ^2	14,63**

⁽¹⁾ Em ambos os tratamentos os machos estéreis concorreram com os selvagens pelas recópulas, na proporção de 15ME: 3MS: 1FS. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de χ^2 ($\chi^2_{\text{tab}}=10,83$, ** $P<0,01$).

Tabela 2 - Efeito do tratamento aromático de machos estéreis com óleo de gengibre (OG) no número de recópulas por fêmea selvagem de *Ceratitis capitata*

nº de recópulas por fêmea	Tratamentos ⁽¹⁾				χ^2
	Machos estereis		Machos estéreis com OG		
	nº de fêmeas	frequência (%)	nº de fêmeas	frequência (%)	
1	19	37,25	10	52,63	3,45 n.s.
2	9	17,65	6	31,58	5,47 *
3	9	17,65	1	5,26	6,5 *
4	3	5,88	2	10,53	1,83 n.s.
≥ 5	11	21,57	0	-	17,89 **
média	3,37 vezes		1,74 vezes		0,52 n.s.
total	51	100	19	100	

- Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento. ⁽¹⁾ Em ambos os tratamentos os machos estéreis concorreram com os selvagens pelas cópulas, na proporção de 15ME: 3MS: 1FS.; Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de χ^2 ($\chi^2_{\text{tab}}=3,84$, * $P<0,05$; $\chi^2_{\text{tab}}=10,83$, ** $P<0,01$); n.s.- não significativo.

Tabela 3 - Estudos relatando frequências de recópula em fêmeas de *Ceratitis capitata*

Tipo de fêmea	Tipo de macho	Densidade (moscas/cm ³)	Condições experimentais	PRF ⁽¹⁾ (dias)	Frequência de recópula (%)	Referência
Cria massal (linhagem Vienna)	Cria massal com diferentes dietas de adulto	0,03	Laboratório	1	61 - 76	Blay e Yuval (1997)
Cria massal	Fértil e estéril	0,03	Laboratório	≤ 7	9,5 - 81,8	Kraaijeveld e Chapman (2004)
Cria massal e laboratório	Cria massal, laboratório e selvagem	0,008 0,002	Laboratório Laboratório	≤ 4 ≤ 4	27 - 95 5 - 34	Vera et al. (2002)
Selvagem	Estéril com diferentes dietas de adulto e selvagem	0,005	Laboratório	2 4	3,3 - 10,7 ≤ 3,6	Shelly e Kennely (2002)
Cria massal	Cria massal	0,03	Laboratório	2 6	15 8,3	Miyatake, Chapman e Partridge (1999)
Laboratório	Laboratório	0,001	Laboratório	≤ 5	45	Whittier e Shelly (1993)
Laboratório	Laboratório fértil e estéril	Não disponível	Laboratório	7 - 11	26,7 - 41,3	Katiyar e Ramirez (1970)
Selvagem	Cria massal fértil e estéril e selvagem	0,00001	Gaiola de campo	<1	≤ 16,8	Vera et al. (2003)
Selvagem criada em laboratório até 4 ^a geração	Selvagem criado em laboratório até 4 ^a geração	0,02	Laboratório	1 e 2 3 4	3,3 10 13,3	Kraaijeveld et al. (2005)
Laboratório	Linhagem <i>ts</i> /estéril tratado com óleo de gengibre	0,01	Laboratório	2	15,6 - 32,8	Shelly, Edu e Pahio (2004)
Selvagem	Selvagem	..	Coleta de campo	..	5,5 - 50	Bonizzoni et al. (2007)

⁽¹⁾ PRF = período refratário entre a cópula e a primeira recópula; .. - não se aplica dado numérico.

O período refratário médio entre a cópula e a 1^a recópula de fêmeas selvagens foi avaliado em duas situações. Onde os machos estéreis competiam com selvagens pelas cópulas com as fêmeas, o período refratário médio foi de 2,02 dias. Idem a

anterior, porém os machos estéreis foram tratados com óleo de gengibre, o período refratário médio foi de 1,44 dias. Não houve diferença estatística para período refratário de até três dias entre machos tratados e não tratados, assim como para período refratário médio (Tabela 4), entretanto a diferença para período refratário de quatro a seis dias foi altamente significativa, pois todas as fêmeas, na presença de machos estéreis tratados com óleo de gengibre, que recopularam já o tinham feito até o terceiro dia após a cópula. No segundo dia após a cópula, 78 % das fêmeas que foram copuladas por estéreis ou selvagens (ambos os machos concorreram pelas cópulas), já haviam recopulado pelo menos uma vez; e 94% em situação semelhante quando os machos estéreis foram tratados com óleo de gengibre (Figura 4). As fêmeas copuladas por machos estéreis tratados com óleo de gengibre ou selvagens (ambos os machos concorriam pelas cópulas) recopularam até o terceiro dia após a cópula.

Tabela 4 - Efeito do tratamento aromático de machos estéreis com óleo de gengibre (OG) no período refratário entre a cópula e a primeira recópula de fêmeas selvagens de *Ceratitits capitata*

Período refratário (dias)	Tratamentos ⁽¹⁾				χ^2
	Machos estéreis		Machos estéreis com OG		
	nº de fêmeas	frequência (%)	nº de fêmeas	frequência (%)	
1	22	44,90	11	61,11	2,85 n.s.
2	16	32,65	6	33,33	0,01 n.s.
3	5	10,20	1	5,56	0,75 n.s.
4 a 6	6	12,25	-	..	10,81**
média	2,02 dias		1,44 dias		0,46 n.s.
total	49	100	18	100	

- Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento, .. não se aplica dado numérico. ⁽¹⁾ Em ambos os tratamentos os machos estéreis concorreram com os selvagens pelas cópulas, na proporção de 15ME: 3MS: 1FS. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de χ^2 ($\chi^2_{\text{tab}}=5,99$, * $P<0,05$; $\chi^2_{\text{tab}}=9,21$, ** $P<0,01$); n.s.- não significativo.

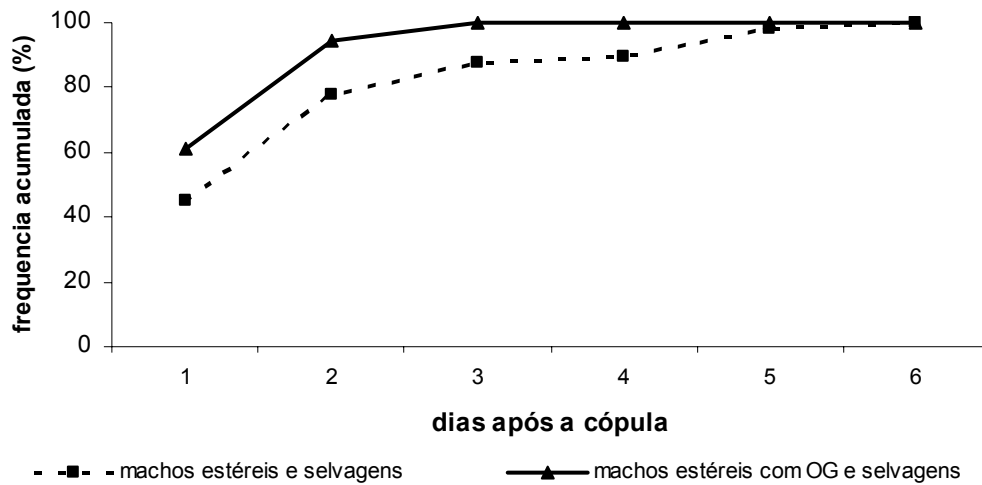


Figura 4 - Frequência acumulada de recópula de fêmeas selvagens (FS) de *Ceratitis capitata* envolvendo três tipos de machos em duas situações distintas: machos estéreis e selvagens concorreram pelas cópulas na proporção de 15ME: 3MS: 1FS (n=49); machos estéreis tratados com óleo de gengibre (OG) e selvagens concorreram pelas cópulas na proporção de 15MEOG: 3MS: 1FS (n=18)

Os machos estéreis, tratados ou não com OG, concorreram com os selvagens pelas cópulas com as fêmeas na proporção de 5 ME:1MS. O maior número de indivíduos estéreis conferiu-lhes uma maior competitividade e resultou na baixa ocorrência de cópulas e recópulas selvagens (Tabela 5), o que inviabilizou a análise da frequência de recópula de acordo com o primeiro macho envolvido na cópula. As fêmeas recopularam com machos estéreis, selvagens ou ambos, independentemente do macho envolvido na primeira cópula e do tratamento com óleo de gengibre.

O índice de esterilidade relativa (RSI) calculado mostra que os machos estéreis foram mais competitivos que os selvagens ao copularem fêmeas virgens e recopularem fêmeas não-virgens. Os machos tratados com óleo de gengibre tiveram maior competitividade que os selvagens ao copularem fêmeas virgens, contudo foram menos competitivos com fêmeas não-virgens, na recópula (Tabela 5).

Tabela 5 - Cópula e recópulas de fêmeas selvagens de *Ceratitis capitata* com machos estéreis tratados e não tratados com óleo de gengibre (OG) concorrendo com machos selvagens pelas cópulas e recópulas na proporção de 15ME: 3MS: 1FS

	Tratamentos			
	Machos estéreis		Machos estéreis com OG	
	nº de casais	frequência (%)	nº de casais	frequência (%)
Cópula				
Estéril	87	92,55	85	94,44
Selvagem	7	7,45	5	5,56
Total	94	100	90	100
RSI ⁽¹⁾	0,93		0,94	
Recópula				
Estéril	153	90,00	26	81,25
selvagem	17	10,00	6	18,75
Total	170	100	32	100
RSI ⁽¹⁾	0,90		0,81	

⁽¹⁾ RSI- Índice de esterilidade relativa = nº de cópulas estéreis/nº de cópulas totais, sendo que o RSI de igual competitividade entre os machos é de 0,83.

Na presença exclusiva de machos selvagens, a ocorrência de cópulas múltiplas entre as fêmeas foi baixa, sendo que 9,6% das fêmeas (n=52) recopularam em média 1 vez, das quais 25 e 50% destas fêmeas tiveram um período refratário de 2 e 3 dias respectivamente. Nesta situação, a proporção de 6MS: 2FS na gaiola resultou em uma densidade de 0,001 moscas/cm³, que é baixa em relação à situação onde havia também machos estéreis concorrendo com os selvagens pela cópula das fêmeas (30ME:6MS: 2FS, 0,005 moscas/cm³). A alta densidade de insetos (VERA et al., 2002) e a primeira cópula com macho estéril (HENDRICHS et al., 1993; ROBINSON; CAYOL; HENDRICHS, 2002; VERA et al., 2002; MOSSINSON; YUVAL, 2003; KRAAIJEVELD; CHAPMAN, 2004) são fatores que favorecem bastante a recópula entre as fêmeas, e como ambos estão ausentes nessa situação, não foi possível atribuir a menor ocorrência de recópulas às cópulas exclusivamente selvagens. Para Vera et al. (2002), em laboratório, alta e baixa densidades seriam 0,008 moscas/cm³ e 0,002 moscas/cm³

respectivamente, nas quais foram encontradas taxas de recópula de fêmeas selvagens de 15% e 7%, respectivamente (MOSSISON; YUVAL, 2003).

Não houve diferença no tempo de cópula e primeira recópula das fêmeas com diferentes tipos de machos, exceto na duração na 2ª recópula (Tabela 6), sendo que as recópulas selvagens tiveram maior duração que as com machos estéreis tratados com óleo de gengibre, que por sua vez duraram mais que com machos estéreis sem tratamento.

Machos estéreis tratados com óleo de gengibre copularam por menor tempo quando a fêmea copulava pela segunda vez, e não houve diferença entre os tempos de cópula com fêmeas virgens e com as copuladas pela terceira vez. Não houve diferença entre os demais tipos de machos.

Tabela 6 – Duração média (minutos) da cópula, 1ª e 2ª recópulas de fêmeas selvagens de *Ceratitidis capitata* com machos estéreis tratados e não tratados com óleo de gengibre (OG) e machos selvagens

Tipo de macho	Duração média			χ^2
	cópula	1ª recópula	2ª recópula	
Macho estéril	96,06	88,11	78,39 C	1,79 n.s.
Macho estéril com OG	94,72 a	65,46 b	94,40 a B	6,65 *
Macho selvagem	119,42	91,56	122,50 A	5,23 n.s.
χ^2	3,73 n.s.	4,92 n.s.	10,13**	

Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de χ^2 ($\chi^2_{\text{tab}}=5,99$; * $P<0,05$; $\chi^2_{\text{tab}}=9,21$, ** $P<0,01$); n.s.- não significativo. Letras minúsculas iguais na linha e maiúsculas iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de χ^2 .

4.2 Consequências da recópula na esterilidade induzida por machos estéreis em fêmeas selvagens de *C. capitata*

Não houve diferença significativa entre as fecundidades das fêmeas que somente copularam uma vez daquelas que recopularam com o mesmo tipo de macho ($P=0,05$ para macho estéril e $P=0,20$ para macho selvagem) (Figura 5). O mesmo aconteceu com as fêmeas que tiveram a chance da primeira cópula e da recópula com

machos estéreis e selvagens em concorrência ($P=0,10$), e com as fêmeas que copularam com macho selvagem e recopularam com estéril tratado com óleo de gengibre ($P=0,05$).

Quando o primeiro macho a copular a fêmea foi estéril ou estéril com óleo de gengibre e o segundo selvagem, também não houve diferença na fecundidade entre as fêmeas que copularam uma e duas vezes, contudo aquelas que copularam com macho estéril tratado e recopularam em dois dias tiveram fecundidade significativamente menor que em cinco dias ($P=0,004$). Sem o tratamento aromático dos machos a fecundidade em cinco dias foi menor que após a recópula em dois dias ($P=0,01$).

A fecundidade das fêmeas que copularam com machos estéreis tratados com óleo de gengibre ou com selvagens (ambos os machos concorreram pelas cópulas e recópulas) e tiveram chance de recópula com os mesmos machos ($P=0,01$), e fêmeas que copularam com macho selvagem e tiveram chance de recópula com estéril ($P=0,04$), apresentaram a mesma tendência: fêmeas que recopularam 5 dias após a cópula produziram menos ovos que aquelas que somente copularam.

Whittier e Shelly (1993) constataram aumento na produtividade (número de adultos da progênie) e na longevidade de fêmeas que tiveram cópulas múltiplas, sendo a maior produtividade atribuída às cópulas múltiplas na idade jovem e não à maior longevidade. Fêmeas de *Bactrocera dorsalis* que copularam múltiplas vezes também apresentaram maior fecundidade (SHELLY, 2000). Ambos os resultados diferem dos presentes, pois só houve variação na fecundidade quando o tipo de macho na recópula foi diferente do da cópula. Quando ocorreu diferença significativa entre fêmeas que somente copularam e aquelas que recopularam, a fecundidade após a recópula foi sempre menor. Apesar do fato das fêmeas serem virgens ou copuladas não interferir na produção de ovos (CHAPMAN et al., 1998), a recópula estéril sem óleo de gengibre após a cópula selvagem reduziu a produção de ovos.

Dentre as situações, sendo o período refratário de dois dias, a que resultou em menor fecundidade foi a primeira cópula com macho selvagem e a recópula com macho estéril, sendo estatisticamente diferente somente da maior fecundidade, que foi resultante da cópula estéril e recópula selvagem ($P=0,047$) (Figura 6). Para período refratário de 5 dias, a situação que resultou em menor fecundidade foi a cópula com

macho selvagem e recópula com macho selvagem estéril, contudo diferiu somente da situação oposta ($P=0,047$). Em situações de concorrência entre machos estéreis e selvagens, não houve diferença significativa do tratamento com óleo de gengibre na fertilidade das fêmeas.

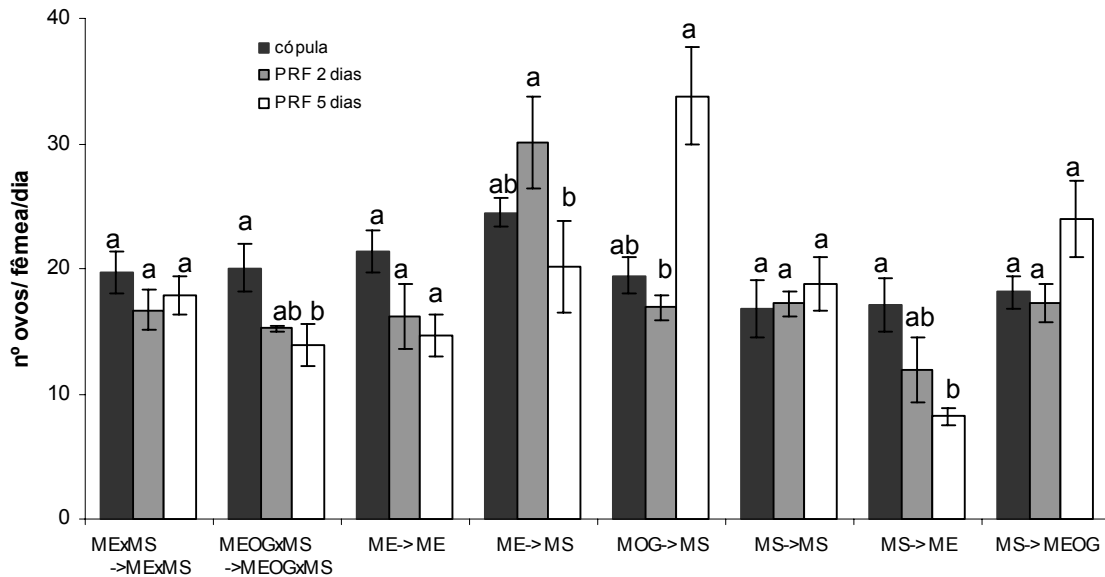


Figura 5 – Fecundidade média diária de fêmeas selvagens de *Ceratitís capitata* após uma ou duas cópulas (recópula) com diferentes tipos de machos em período refratário (PRF) de dois ou cinco dias. Barras com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Jhonckheere ($P<0,05$). Cópula→ recópula, onde ME-macho estéril, MS-macho selvagem, MEOG- macho estéril tratado com óleo de gengibre.

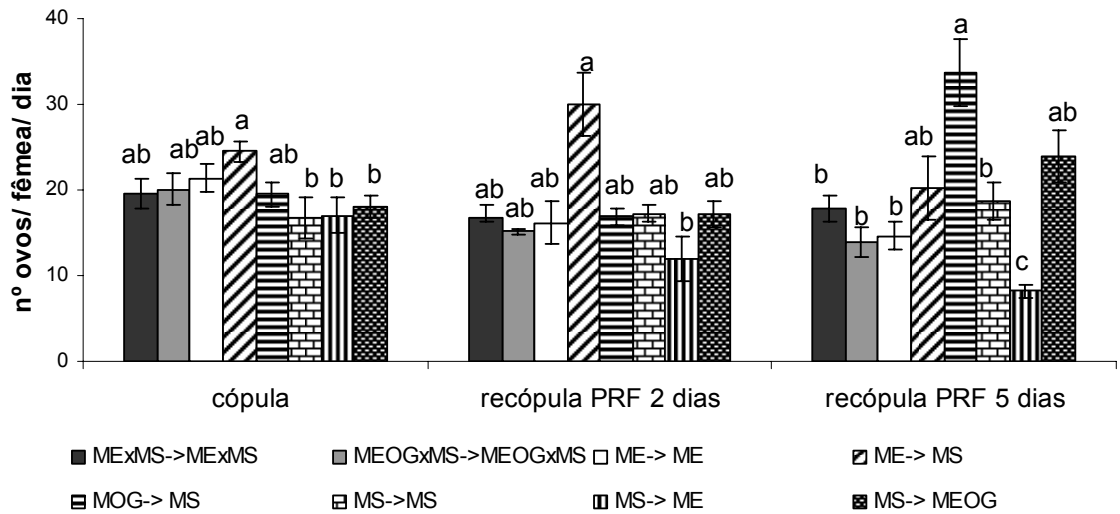


Figura 6 – Fecundidade média diária de fêmeas selvagens de *Ceratitidis capitata* após única cópula ou após cópula e recópula em período refratário (PRF) de dois ou cinco dias com diferentes tipos de machos. Barras com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Jhonckheere ($P < 0,05$). Cópula → recópula, onde ME-macho estéril, MS-macho selvagem, MEOG- macho estéril tratado com óleo de gengibre.

Os resultados da fertilidade das fêmeas em diversas situações de cópula e recópula indicam que quando a primeira cópula foi estéril, e a segunda selvagem em dois dias após a cópula, houve aumento significativo de 94% na fertilidade das fêmeas ($P = 0,0042$) (Figura 7). O mesmo aconteceu com os machos estéreis tratados com óleo de gengibre, sendo que o aumento máximo foi de 95% ($P = 0,0042$).

Nas situações em que o primeiro macho a copular a fêmea foi selvagem e o segundo estéril, a fertilidade das fêmeas reduziu significativamente em 26% somente para o período refratário de dois dias ($P = 0,0042$). Quando as fêmeas recopularam em período refratário maior, de cinco dias, a fertilidade foi estatisticamente igual àquelas que somente copularam com machos selvagens e não quiseram recopular. O mesmo aconteceu quando os machos foram tratados com óleo de gengibre, com queda de 34% na fertilidade ($P = 0,0042$). Isso mostra que se a fêmea copular com macho selvagem e recopular com estéril, haverá queda na fertilidade somente se o período refratário for curto, caso contrário a recópula estéril não induzirá esterilidade nas fêmeas

independente dos machos estéreis receberem tratamento aromático com óleo de gengibre. Katiyar e Ramirez (1970) encontraram, em fêmeas copuladas alternadamente por machos estéreis e férteis, aumento de 68,2% com a última cópula fértil e decréscimo de 43,4% com a última cópula estéril. Os autores não constataram efeito do período refratário na fertilidade de fêmeas que recopularam.

Na situação onde os machos estéreis concorreram com os selvagens pelas cópulas e recópulas, não houve diferença entre a fertilidade das fêmeas que somente copularam e as que recopularam, independente do período refratário ($P=0,1$). Em situação semelhante, onde os machos estéreis foram tratados com óleo de gengibre, a fertilidade foi significativamente maior após a recópula em período refratário de 5 dias ($P=0,0042$).

Os valores de RSI calculados para as situações de competição seguem a mesma tendência daqueles valores da Tabela 5, mostrando que machos tratados com óleo de gengibre são mais competitivos que os selvagens com fêmeas virgens (RSI=0,94) e menos competitivos na recópula de fêmeas não-virgens (RSI= 0,80 e 0,58 para recópula no segundo e quinto dia após a cópula respectivamente). Já os machos não tratados mantiveram-se menos competitivos que os selvagens na cópula e nas recópulas em período refratário de 2 e 5 dias, com valores de RSI de 0,72, 0,75 e 0,81 respectivamente. Na situação de concorrência entre machos estéreis tratados e selvagens, o aumento brusco na fertilidade das fêmeas que recopularam no quinto dia após a cópula (Figura 7) foi devido possivelmente à menor competitividade dos estéreis com fêmeas não-virgens que resultou em mais recópulas selvagens.

Cópulas selvagens seguidas de recópulas também selvagens dois dias após a cópula ocasionaram aumento na fertilidade ($P=0,0042$). Recópulas estéreis cinco dias após a cópula também estéril reduziu ainda mais a fertilidade das fêmeas ($P=0,01$).

Em situação onde os machos estéreis concorrem com os selvagens pelas cópulas, o que ocorre em áreas onde se liberam machos estéreis, a fertilidade após a cópula e após recópula em período refratário de dois dias foi significativamente menor quando os machos receberam tratamento com óleo de gengibre ($P=0,0042$) (Figura 8). Quando a recópula aconteceu em 5 dias após a cópula, não houve diferença estatística para machos tratados e não tratados ($P=0,0042$).

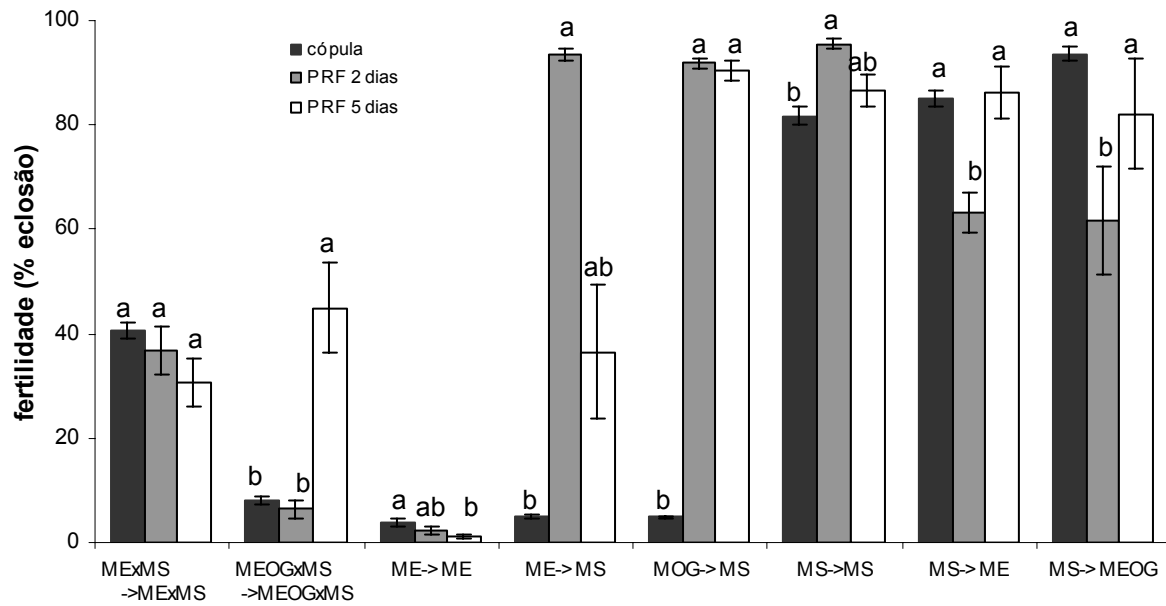


Figura 7 – Fertilidade média de fêmeas selvagens de *Ceratitidis capitata* após uma ou duas cópulas (recópula) com diferentes tipos de machos, em período refratário (PRF) de dois ou cinco dias. Barras com a mesma letra não diferem ente si pelo teste de Jhonckheere ($P < 0,05$). Cópula → recópula, onde ME-macho estéril, MS-macho selvagem, MEOG- macho estéril tratado com óleo de gengibre

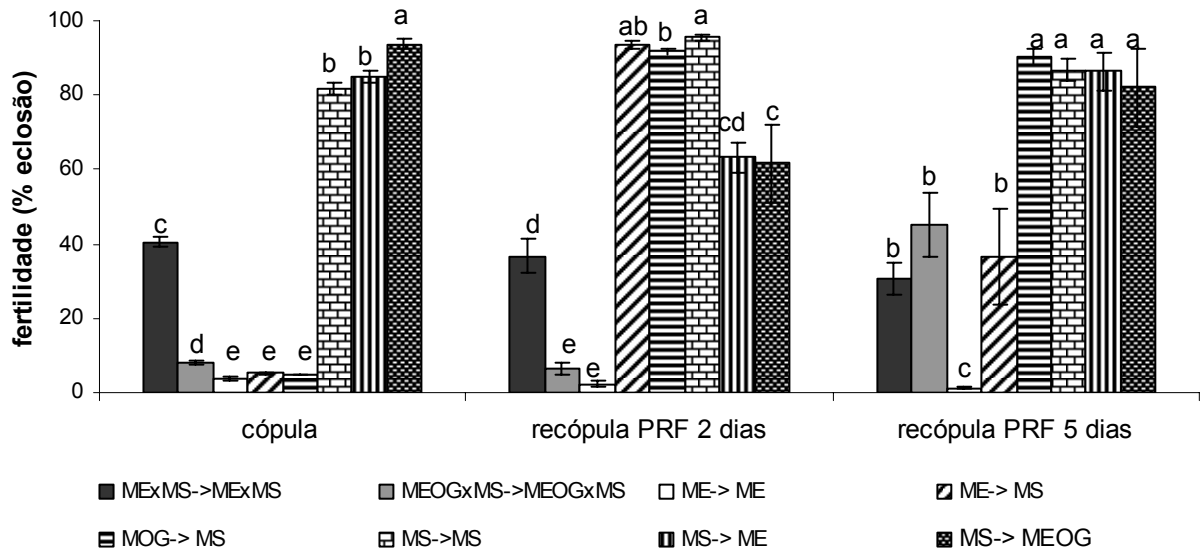


Figura 8 – Fertilidade média de fêmeas selvagens de *Ceratitidis capitata* após única cópula e após cópula e recópula, com diferentes tipos de machos, em período refratário (PRF) de dois ou cinco dias. Barras com a mesma letra não diferem entre si pelo teste de Jhonckheere ($P < 0,05$). Cópula → recópula, onde ME-macho estéril, MS-macho selvagem, MEOG- macho estéril tratado com óleo de gengibre

5 DISCUSSÃO

A densidade de insetos influencia diretamente a recópula (VERA et al., 2002). Comparando-se a frequência de recópula de fêmeas selvagens observada no presente estudo com a literatura disponível (Tabela 3), encontram-se valores bem menores para situações de maior densidade de insetos, levando a crer que outro fator além da densidade de insetos tenha levado à alta frequência de recópula.

Em situações onde o número de machos é maior que de fêmeas, a frequência de recópula é maior, causada pelo maior número de tentativas de cópulas direcionadas às fêmeas e, conseqüentemente, de cortejos bem sucedidos, conforme observado por Kraaijeveld et al. (2005). As fêmeas também podem ser assediadas pelos machos mais frequentemente quando estes estão em maior número, que terminam por ceder a mais uma cópula após sucessivas tentativas de se livrarem dos machos (VERA et al., 2002; KRAAIJEVELD et al., 2005). A alta proporção de 18 machos:1 fêmea, no presente estudo, pode ter favorecido a alta frequência de recópulas mais do que a densidade de insetos presentes na gaiola. Foi possível observar o assédio dos machos às fêmeas e as tentativas destas de se livrarem dos machos após a monta e antes da introdução do edeago.

Outro fator de extrema relevância na recópula é a linhagem dos insetos, tanto dos machos como das fêmeas. Quando o macho envolvido na primeira cópula é proveniente de criação massal e/ou estéril a probabilidade de recópula das fêmeas é maior. Como as porcentagens de cópulas estéreis foram altas, as frequências de recópulas também o foram. Em laboratório a recópula das fêmeas é freqüente (ROBINSON; CAYOL; HENDRICHS, 2002), porém fêmeas selvagens recopulam bem menos. Em fêmeas coletadas do campo, a análise da paternidade da progênie mostra que a frequência de recópula pode variar bastante entre populações naturais de diferentes localidades (BONIZZONI et al., 2007). Existem hipóteses de que diferentes linhagens de *C. capitata* podem diferir no estímulo do macho e na resposta da fêmea (JANG et al., 1998) e a tendência à recópula pode ser hereditária e desse modo agir como uma adaptação em várias linhagens (SAUL; MCCOMBS, 1993).

O tratamento dos machos estéreis com óleo de gengibre resultou em grande número de cópulas estéreis com menor frequência de recópula. A exposição ao aroma do óleo de gengibre aumenta a atividade de chamamento dos machos estéreis, o que resulta num maior sucesso de cópula dos mesmos (PAPADOPOULOS et al., 2006). Entretanto, já foi observado que o odor dos machos estéreis tratados não exerce maior atração sobre as fêmeas que dos machos não tratados, nem as torna mais propensas à cópula (PAPADOPOULOS et al., 2006). Shelly et al. (2007) sugerem que não há alteração no feromônio dos machos tratados, porém há alteração no aroma liberado pela cutícula, que provavelmente só é percebido pelas fêmeas a curtas distâncias.

O cortejo de machos estéreis tratados com óleo de gengibre tem maior duração que dos machos não tratados (BRICEÑO; EBERHARD; SHELLY, 2007), podendo as fêmeas distinguir os cortejos e ficarem mais receptivas ou cooperantes com esses machos para a cópula (PAPADOPOULOS et al., 2006), pois fêmeas selvagens são mais propensas a aceitarem a cópula de cortejos de maior duração (BRICEÑO; EBERHARD, 2002).

Apesar da preferência das fêmeas por machos expostos ao aroma do óleo de gengibre, a cópula com estes machos não confere benefícios reprodutivos diretos às mesmas (SHELLY, 2005). O odor emitido pelos machos pode indicar uma maior habilidade em localizar fontes naturais de α -copeno (PAPADOPOULOS et al., 2006), éster presente em várias espécies hospedeiras de moscamed (NISHIDA et al., 2000) que atrai machos desta espécie e confere vantagens na cópula aos machos que tiverem contato com a substância (SHELLY; VILLALOBOS, 2004). O óleo de gengibre aumentou o sucesso de cópula dos machos e reduziu a taxa de recópula entre fêmeas selvagens, contudo não reduziu a fecundidade e não conferiu aos machos vantagem na competição espermática. Porém, em situação de concorrência entre machos estéreis e selvagens, o que ocorre em áreas onde se liberam machos estéreis, o tratamento com óleo de gengibre aumentou a indução de esterilidade em fêmeas selvagens que somente copularam e em fêmeas que recopularam em período refratário de dois dias.

Se as fêmeas recopulam mais de uma vez, elas podem recopular com machos férteis ou estéreis. Entretanto, a liberação de grande número de machos estéreis em

programas de supressão de moscamed com o uso da técnica do inseto estéril aumenta a probabilidade de recópulas das fêmeas selvagens com machos estéreis.

Há estudos que indicam que o segundo, ou o último, macho de moscamed a copular a fêmea fecunda a maior parte dos ovos desta fêmea e torna-se o responsável pela maior paternidade da progênie (SAUL; MCCOMBS, 1993; BONIZZONI et al., 2007). Entretanto, no presente estudo, quando as fêmeas copularam com machos selvagens e recopularam com estéreis cinco dias após a cópula, o segundo macho não fecundou a maior parte dos ovos.

Em moscamed ocorre competição espermática e seleção espermática em cópulas múltiplas (SAUL; MCCOMBS, 1993; TAYLOR; YUVAL, 1999). Os órgãos de armazenamento de espermatozóides nas fêmeas permitem-nas separar temporariamente inseminação de fertilização, manipular o volume ejaculado e controlar a fertilização (TWIG; YUVAL, 2005). Ambas as espermatecas e a câmara de fertilização são órgãos de armazenagem de espermatozóides, e tem funções separadas (TWIG; YUVAL, 2005). As espermatecas armazenam por longos períodos e a câmara de fertilização é periodicamente cheias pelas espermatecas e libera os espermatozóides para a fertilização (MARCHINI et al., 2001; TWIG; YUVAL, 2005).

Os espermatozóides são armazenados nas espermatecas de forma assimétrica, o que sugere a possibilidade da fêmea controlar a paternidade da progênie (YUVAL; BLAY; KASPI, 1996; TAYLOR; YUVAL, 1999; TAYLOR; KASPI; YUVAL, 2000). Ao tendenciar o armazenamento dos espermatozóides para uma ou outra espermateca, a fêmea pode aceitar uma segunda cópula e direcionar esses espermatozóides para a espermateca mais vazia e assim manter as duas populações de espermatozóides parcialmente isoladas para decidir a paternidade da progênie após as cópulas (TAYLOR; YUVAL, 1999; TAYLOR; KASPI; YUVAL, 2000).

Em moscamed, o esperma ejaculado é transferido para as espermatecas por movimentos peristálticos dos dutos das espermatecas (DALLAI; MARCHINI; DEL BENE, 1993) o que sugere um alto grau de controle das fêmeas sobre o armazenamento do conteúdo ejaculado pelos machos durante a cópula (TAYLOR; YUVAL, 1999). Como a qualidade do macho talvez não seja totalmente aparente durante o cortejo, as fêmeas dessa forma podem aceitar a cópula e atrasar a decisão

da paternidade da progênie até uma avaliação mais completa após a cópula, e assim armazenar uma quantidade de espermatozoides compatível com a qualidade do macho (TAYLOR; YUVAL, 1999). As fêmeas podem preferir certas qualidades que são mais ou menos pronunciadas em diferentes machos e assim direcionar os respectivos ejaculados para os órgãos de armazenamento de acordo com seus próprios interesses. Há ainda a possibilidade de que a viabilidade dos espermatozoides ao longo do tempo dependa da nutrição e da manutenção nas espermatecas, e que este processo pode ser controlado no corpo da fêmea de acordo com a qualidade do macho conforme a percepção da fêmea (BLAY; YUVAL, 1999).

Os machos possuem três aberturas na extremidade distal do edeago pelas quais ejaculam. Duas delas despejam o volume ejaculado na bolsa de inseminação e por meio de movimentos peristálticos dos dutos chega às espermatecas. A terceira abertura direciona o ejaculado para a câmara de fertilização, onde durante a cópula é encontrado menor número de espermatozoides que nas espermatecas (MARCHINI et al., 2001). Assim, o segundo macho pode ejacular seus próprios espermatozoides na câmara de fertilização e possivelmente remover aqueles da cópula anterior (MARCHINI et al., 2001).

Possivelmente, as fêmeas que recopularam em período refratário menor não estavam com a câmara de fertilização totalmente cheia, devido à qualidade da primeira cópula, e por isso a maior paternidade da progênie foi do segundo macho a copular. As fêmeas que aceitaram a recópula em maior período refratário podem ter sido influenciadas pelo assédio dos machos, pois já haviam tido a segunda chance de recópula uma vez e recusaram, e não pelo esvaziamento dos órgãos de armazenamento, e dessa forma o segundo macho não teve sucesso reprodutivo.

As fêmeas podem recopular por razões diferentes da reposição de espermatozoides, como a alta qualidade do macho presente na recópula de foram a garantir a variabilidade e o sucesso genético da progênie, e também para evitar gasto energético no armazenamento e manutenção de espermatozoides viáveis da primeira cópula (BLAY; YUVAL, 1999). Esses autores também relataram que as fêmeas frequentemente recopulam em curto período refratário, indicando que elas não esperam

o suprimento de espermatozoides diminuir até um limiar crítico para aceitar outra cópula visando a reposição espermática (YUVAL; BLAY; KASPI, 1996, BLAY; YUVAL, 1997).

A tendência é que as fêmeas recopulem em períodos refratários curtos, caso a primeira cópula não tenha sido bem sucedida. Quando isso acontece, o segundo macho a copular a fêmea é o responsável pela maior paternidade da progênie. Dessa forma, para que a técnica do inseto estéril seja eficiente é necessário que haja sempre machos estéreis de boa qualidade no campo para recopularem as fêmeas, pois elas apresentam período refratário curto. Se os machos forem tratados com óleo de gengibre, a competitividade deles decai na recópula e o intervalo de liberações deve ser determinado considerando esse fato.

6 CONCLUSÕES

A frequência de recópula em fêmeas de *Ceratitis capitata* que haviam sido copuladas por machos estéreis e selvagens foi de 63%, sendo considerada alta comparada à outros estudos já realizados. Elas recopulam em média 3,37 vezes em curto período refratário, sendo que 82% das fêmeas recopularam em dois dias após a cópula.

Fêmeas copuladas por machos estéreis tratados aromaticamente com óleo de gengibre diminuíram significativamente a frequência de recópula e tiveram maior esterilidade induzida, contudo não tiveram a fecundidade reduzida. O tratamento não conferiu aos machos vantagem na competição espermática.

A cópula estéril seguida de recópula selvagem resultou em aumento na fertilidade. Contudo, se a fêmea copulou com macho selvagem e recopulou com estéril, houve queda na fertilidade com período refratário curto, caso contrário a recópula estéril não induziu esterilidade nas fêmeas, independentemente dos machos estéreis terem ou não recebido tratamento aromático com óleo de gengibre.

Para que a técnica do inseto estéril seja eficiente, é necessário que haja sempre machos estéreis de boa qualidade no campo para recopularem as fêmeas, pois elas apresentam período refratário curto. Sendo assim, o intervalo entre as liberações deve ser o menor possível.

REFERÊNCIAS

BARRY, J.D.; SHELLY, T.E.; McINNIS, D.O.; MORSE, J. Potential for reducing overflooding ratios of sterile Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) with the use of ginger root oil. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 86, p. 29-33, 2003.

BLAY, S.; YUVAL, B. Nutritional correlates of reproductive success of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Animal Behavior**, London, v. 54, n. 1, p. 59-66, 1997.

_____. Oviposition and fertility in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): Effects of male and female body size and the availability of sperm. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 92, p. 278-284, 1999.

BONIZZONI, M.; GOMULSKI, L.M.; BERTIN, S.; SCOLARI, F.; GUGLIELMINO, C.R.; YUVAL, B.; GASPERI, G.; MALACRIDA, A. Unfaithful Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* female: impact on the SIT? In: VREYSEN, M.J.B.; ROBINSON, A.S.; HENDRICH, J. (Ed.). **Area wide control of insect pests: from research to field implementation**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 175-182.

BRICEÑO, D.; EBERHARD, W. Decisions during courtship by male and female medflies (Diptera: Tephritidae): Correlated changes in male behavior and female accepted criteria in mass-rearing flies. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 85, n. 1, p. 14-31, 2002.

BRICEÑO, D.; EBERHARD, W.; SHELLY, T. Male courtship behavior in *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae) that have received aromatherapy with ginger root oil. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 90, n. 1, p. 175-179, 2007.

CALKINS, C.O.; PARKER, A.G. Sterile insect quality. In: DYCK, V.A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A.S. (Ed.). **Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 269-296.

CAMPOS, H. **Estatística experimental não-paramétrica**. Piracicaba: ESALQ, 1983. 258 p.

CAYOL, J.P. Changes in sexual behavior and in some life history traits of Tephritidae species caused by mass-rearing process. In: ALUJA, M.; NORRBOM, A. (Ed.). **Fruit flies (Tephritidae): phylogeny and evolution of behavior**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p. 843-860.

CAYOL, J.P.; VILARDI, J.; RIAL, E.; VERA, M.T. New indices and method to measure the sexual compatibility and mating performance of *Ceartitidis capitata* (Diptera:Tephritidae) laboratory-reared strains under field cage conditions. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 92, n. 1, p. 140-145, 1999.

CHAPMAM, T.; MIYATAKE, T.; SMITH, H.K.; PARTRIDGE, L. Interactions of mating, egg production and death rates in females of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. **Proceedings of The Royal Society of London**, Series B, London, v. 265, p. 1879-1894, 1998.

DALLAI, R.; MARCHINI, D.; DEL BENE, G. The ultrastructure of the spermatheca in *Ceratitidis capitata* Wied. And *Dacus oleae* Gmel. (Diptera:Tephritidae). **Redia**, Firenze, v. 76, p. 147-167, 1993.

FAO/IAEA/USDA. **Manual for product quality control and shipping procedures for sterile mass-reared tephritid fruit flies**. Version 5.0. Vienna:International Atomic Energy Agency, 2003. 85 p.

FIELD, S.A.; KASPI, R.; YUVAL, B. Why do calling medflies (Diptera: Tephritidae) cluster? Assessing the empirical evidence for models of medfly lek evolution. **Florida Entomologist**, Lutz, v.85, n.1, p.63-72, 2002.

FISHER, K. Irradiation effects in air and in nitrogen on Mediterranean fruit fly (Diptera:Tephritidae) pupae in Western Australia. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v.90, p.1609-1614, 1997.

FISHER, K.; CACERES, C. A filter rearing system for mass reared medfly. In: DYCK, V.A.; HENDRICHES, J.; ROBINSON, A.S. (Ed.). **Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 543-550.

HENDRICHES, J.; ROBINSON, A.S.; CAYOL, J.C.; ENKERLIN, W. Medfly areawide sterile insect technique programmes for prevention, suppression or eradication: the importance of mating behavior studies. **Florida Entomologist**, Lutz, v.85, n.1, p.1-13, 2002.

HENDRICHES, J.; WORNOAYPORN, V.; KATSOYANNOS, B.I.; GAGGL, K. First field assessment of the dispersal and survival of mass reared sterile Mediterranean fruit flies males of an embryonal, temperature sensitive genetic sexing strains. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (Ed.), **Management of insect pests: nuclear and related molecular and genetic techniques**. Vienna, 1993. p. 453-462.

JANG, E.B. Physiology of mating behavior in Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): chemoreception and male accessory gland fluids in female post-mating behavior. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 85, n. 1, p. 89-95, 2002.

JANG, E.B.; McINNIS, D.; LANCE, D.R.; CARVALHO, L.A. Mating-induced changes in olfactory-mediated behavior of laboratory-reared, sterile and wild female Mediterranean fruit flies (Diptera:Tephritidae) mated to conspecific males. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 91, p. 139-144, 1998.

KATIYAR, K.P.; RAMIREZ, E. Mating frequency and fertility of Mediterranean fruit fly females alternately mated with normal and irradiated males. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 63, p. 1247-1250, 1970.

KRAAIJEVELD, K.; CHAPMAN, T. Effects of male sterility on female remating in the Mediterranean fruitfly, *Ceratitis capitata*. **Proceedings of The Royal Society of London**, Series B, London, v. 271, p. S209-S211, 2004.

KRAAIJEVELD, K.; KATSOYANNOS B.I.; STAVRINIDES, M; KOULOSSIS, N.; CHAPMAN, T. Remating in wild females of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. **Animal Behavior**, London, v. 69, p. 771-776, 2005.

LUX, S.A.; VILARDI, J.C.; LIEDO, P.; GAGGL, K.; CALCAGNO, G.E.; MUNYIRI, F.N.; VERA, M.T.; MANSO, F. Effects of irradiation on the courtship behavior of medfly (Diptera:Tephritidae) mass reared for the sterile insect technique. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 85, n. 1, p. 102-112, 2002a.

LUX, S.A.; MUNYIRI, F.N.; VILARDI, J.C.; LIEDO, P.; ECONOMOPOULOS, A.; HASSON, O.; QUILICI, S.; GAGGL, ; CAYOL, J.P.; RENDON, P. Consistency in courtship pattern among populations of medfly (Diptera: Tephritidae): comparison among wild strains and strains mass-reared for SIT operations. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 85, n. 1, p. 113-125, 2002b.

MARCHINNI, D.; DEL BENE, G.; FALSO, L.F.; DALLAI, R. Structural organization of the copulation site in the medfly *Ceratitis capitata* (Diptera : Tephritidae) and observations on sperm transfer and storage. **Arthropod Structure & Development**, Kidlington, v. 30, n. 1, p. 39-54, 2001.

MALAVASI, A.; NASCIMENTO, A.S. Programa Biofábrica Mosca med Brasil. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 8., Águas de São Pedro, 2003. **Resumos...** Águas de São Pedro: SEB, 2003. p. 52.

McINNIS, D.O.; RENDON, P.; KOMATSU, J. Mating and remating of medflies (Diptera: Tephritidae) in Guatemala: Individual fly marking in field cages. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 85, n. 1, p. 126-137, 2002.

McINNIS, D.O.; SHELLY, T.E.; KOMATSU, J. Improving male mating competitiveness and survival in the field for medfly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) SIT programs. **Genetica**, Dordrecht, v.116, p.117-124, 2002.

MIYATAKE, T.; CHAPMAN, T.; PARTRIDGE, L. Mating-induced inhibition of remating in female Mediterranean fruit flies *Ceratitis capitata*. **Journal of Insect Physiology**, Kidlington, v.45, p.1021-1028, 1999.

MOSSINSON, S.; YUVAL, B. Regulation of sexual receptivity of female mediterranean fruit flies: old hypothesis revisited and a new synthesis proposed. **Journal of Insect Physiology**, Kiglington, v. 49, p. 561-567, 2003.

NISHIDA, R.; SHELLY, T.O., WHITTIER, T.S., KANESHIRO, K.Y. α -copaene, a potential rendezvous cue for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*? **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v. 26, n. 1, p. 87-100, 2000.

PAPADOPOULOS, N.T.; SHELLY, T.E.; NIYAZI, N.; JANG, E. Olfactory and behavioral mechanisms underlying enhanced mating competitiveness following exposure to ginger root oil and orange oil in males of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of Insect Behavior**, Ionia, v. 19, n. 3, p. 403-418, 2006.

PARANHOS, B.J.; McINNIS, D.; URAMOTO, K.; DAMASCENO, I.; GOLÇALVES, N.; ALVES, R.M.; COSTA, M.L.; WALDER, J.; MALAVASI, A.; NASCIMENTO, A. Sterile Medfly males of the *ts/* Vienna 8 genetic sexing strain display improved mating performance with ginger root oil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FRUIT FLIES OF ECONOMIC IMPORTANCE, 7., 2006, Salvador. **Proceedings...Vacaria: Neotropical Entomology**, 2008. p. 1-9.

PARKER, A.G. Mass-rearing for sterile insect release. In: DYCK, V.A.; HENDRICH, J.; ROBINSON, A.S. (Ed.). **Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated pest management**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 209-232.

ROBINSON, A.S.; CAYOL, J.P.; HENDRICH, J. Recent findings on medfly sexual behavior: implications for SIT. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 85, n. 1, p. 171-181, 2002.

SAUL, S.H.; McCOMBS, S.D. Increased remating frequency in sex-ratio distorted lines of the Mediterranean fruit fly (Diptera:Tephritidae). **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 86, p. 631-637, 1993.

SEO, S.T.; VARGAS, R.I.; GILMORE, J.E.; KURASHIMA, R.S.; FUGIMOTO, M.S. Sperm transfer in normal and gamma-irradiated, laboratory-reared Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 83, n. 5, p. 1949-1953, 1990.

SHELLY, T.E. Fecundity of female oriental fruit flies (Diptera: Tephritidae): Effects of methyl eugenol-fed and multiple mates. **Annals of The Entomological Society of America**, Lanham, v. 93, p. 559-564, 2000.

SHELLY, T.E. Does mating with ginger root oil exposed males confer fitness benefits to female Mediterranean fruit flies, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)? **Proceedings of the Hawaiian Entomological Society**, Honolulu, v. 37, p. 65-71, 2005.

SHELLY T.E.; KENNELLY, S. Influence of male diet on male mating success and longevity and female remating in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) under laboratory conditions. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 85, n. 4, p. 572-578, 2002.

SHELLY, T.E.; McINNIS, D.O. Exposure to ginger root oil enhances mating success of irradiated, mass-reared males of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 94, p. 1413-1418, 2001.

SHELLY, T.E.; VILLALOBOS, E.M. Host plant influence on the mating success of male Mediterranean fruit flies: variable effects within and between individual plants. **Animal Behaviour**, London, v. 68, p. 417-426, 2004.

SHELLY, T.E.; EDU, J.; PAHIO, E. Sterile males of the Mediterranean fruit fly exposed to ginger root oil induce female remating: implications for the sterile insect technique (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 87, n. 4, p. 628-629, 2004.

SHELLY, T.E.; EDU, J.; PAHIO, E.; NISHIMOTO, J. Scent males and choosy females: Does male odor influence female mate choice in the Mediterranean fruit fly? **Journal of Chemical Ecology**, Dordrecht, v.33, p.2308-2324, 2007.

SHELLY, T.E.; McINNIS, D.O.; PAHIO, E.; EDU, J. Aromatherapy in the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae): sterile males exposed to ginger root oil in pre-releases, storage boxes display increase mating competitiveness in field-cage trials. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 97, p. 470-481, 2004.

SHELLY, T.E.; ROBINSON, A.S.; CACERES, C.; WORNOAYPORN, V.; ISLAN, A. Exposure to ginger root oil enhances mating success of male Mediterranean fruit flies (Diptera:Tephritidae) from a genetic sexing strain. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 84, n. 3, p. 440-445, 2002.

SHELLY, T.E.; RENDON, P.; HERNANDEZ, E.; SALGADO, S.; McINNIS, D.; VILLALOBOS, E.; LIEDO, P. Effects of diet, ginger root oil, and elevation on the mating competitiveness of male Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) from a mass-reared, genetic sexing strain in Guatemala. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v. 96, n. 4, p. 1132-1141, 2003.

TAYLOR, P.W.; YUVAL, B. Postcopulatory sexual selection in Mediterranean fruit flies: advantages for large and protein fed males. **Animal Behaviour**, London, v. 58, p. 247-254, 1999.

TAYLOR, P.W.; KASPI, R.; YUVAL, B. Copula duration and sperm storage in Mediterranean fruit flies from a wild population. **Physiological Entomology**, Osney Mead, v. 25, p. 94-99, 2000.

TAYLOR, P.W.; KASPI, R.; MORISSON, S.; YUVAL, B. Age-dependent insemination success of sterile Mediterranean fruit flies. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Edinburgh, v. 98, p. 27-33, 2001.

TWIG, E.; YUVAL, B. Function of multiple sperm storage organs in female Mediterranean fruit flies (*Ceratitis capitata*, Diptera: Tephritidae). **Journal of Insect Physiology**, Kidlington, v. 51, p. 67-74, 2005.

VERA, M.T.; WOOD, R.J.; CLADERA, J.L.; GILBURN, A.S. Factors affecting female remating frequency in the Medfly (Diptera: Tephritidae). **Florida Entomologist**, Lutz, v. 85, n. 1, p. 156-164, 2002.

VERA, M.T.; CLADERA, J.L.; CALCAGNO, G.; VILARDI, J.C.; McINNIS, D.O. Remating of wild *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) females in field cages. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 96, n. 1, p. 563-570, 2003.

WHITTIER, T.S.; SHELLY, T. Productivity of singly vs multiply mated female Mediterranean fruit-flies, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Journal of the Kansas Entomological Society**, Maile Way, v. 66, n. 2, p. 200-209, 1993 .

YUVAL, B.; BLAY, S.; KASPI, R. Sperm transfer and storage in the Mediterranean fruit fly. **Annals of the Entomological Society of America**, Lanham, v. 89, n. 3, p. 486-492, 1996.