

## BIOLOGICAL CONTROL

### Influência de Três Temperaturas na Biologia e na Capacidade de Parasitismo de *Ageniaspis citricola* Logvinovskaya (Hymenoptera: Encyrtidae) em Laboratório

PATRÍCIA MILANO E JOSÉ R.P. PARRA

Depto. Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ESALQ/USP, 13418-900, Piracicaba, SP

*Neotropical Entomology* 32(2):299-303 (2003)

#### Influence of Three Temperatures on the Biology and Parasitism Capacity of *Ageniaspis citricola* Logvinovskaya (Hymenoptera: Encyrtidae) in Laboratory

**ABSTRACT** - In order to optimize rearing of *Ageniaspis citricola* Logvinovskaya (Hymenoptera: Encyrtidae) in laboratory the parasitism capacity of the parasitoid was evaluated at 20, 25 and 30°C. After determining that the parasitism was similar in eggs and 1<sup>st</sup>-instar larvae of *Phyllocnistis citrella* Stainton in free-choice and no choice tests, the study of the development of the parasitoid on eggs was preferred for the readiness of acquiring and handling this stage of the parasitoid development. The parasitism capacity was similar at all three temperatures, although differences occurred in the other parameters especially the duration of the egg-adult period (23.6 days to 20°C, 18.1 days to 25°C and 13.8 days to 30°C), decreasing with the thermal elevation. However, considering the aim of this work, the 25°C temperature is more adequate for rearing the insect in laboratory for providing higher survival and produced a higher number of pupae per parasitized egg. Although the results at 20°C were very close, such temperature is not recommended because the cycle is extended with a consequent lower number of individuals produced.

**KEY WORDS:** Insecta, parasitoid rearing, citrus leaf miner, egg parasitoid

**RESUMO** - O objetivo da pesquisa, visando otimizar a criação de *Ageniaspis citricola* Logvinovskaya (Hymenoptera: Encyrtidae) em laboratório, foi estudar a capacidade de parasitismo e desenvolvimento do parasitóide a 20, 25 e 30°C. Em testes de livre escolha e confinamento o parasitismo foi semelhante em ovos ou lagartas de 1<sup>a</sup> instar de *Phyllocnistis citrella* Stainton. A capacidade de parasitismo foi semelhante nas três temperaturas, embora tenha havido diferenças nos outros parâmetros principalmente quanto à duração do período ovo-adulto, que foi 23,6 dias a 20°C, 18,1 dias a 25°C e 13,8 dias a 30°C. A temperatura de 25°C foi a mais adequada para criação do inseto em laboratório, por proporcionar maior sobrevivência, e produzir maior número de pupas por ovo parasitado. Embora a 20°C os resultados tenham sido muito próximos, não se recomenda tal temperatura, pois nesta condição há um alongamento do ciclo e, conseqüentemente, menor número de indivíduos produzidos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Insecta, criação de parasitóides, lagarta minadora-dos-citros, parasitóide de ovos

O microimenóptero *Ageniaspis citricola* Logvinovskaya foi inicialmente descrito através de populações oriundas do Vietnã (Logvinovskaya 1983), ocorrendo também em Taiwan e Tailândia (Schauff *et al.* 1998). Atualmente, devido à sua utilização como agente de controle de *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae), encontra-se distribuído por vários países como: Austrália, Bahamas, Grécia, Honduras, Israel, Marrocos, Oman, Síria, Tunísia, Turquia, EUA (Flórida e Louisiana) (Schauff *et al.* 1998), Espanha (Garijo & Garcia 1994; Urbaneja *et al.* 1998), Argentina (Willink *et al.* 1998), Peru, Chile (Sacarias &

Canales 1999) e Brasil (Gravena 2001).

O parasitóide é poliembriônico (Logvinovskaya 1983) e tem tido grande capacidade de adaptação nos locais onde foi utilizado como agente de controle biológico. Os índices de parasitismo, após seu estabelecimento em campo, têm sido da ordem de 60% a 80% nos EUA (Hoy *et al.* 1995) e de até 98% no Peru (Sacarias & Canales 1999). Em nosso país *A. citricola* foi introduzido em 1998, a partir de populações oriundas da Flórida (EUA), tendo grande adaptação nas regiões citrícolas do estado de São Paulo (Chagas *et al.* 2002) principalmente nas regiões mais úmidas. Dada a sua eficiência

no controle de *P. citrella*, ele continua a ser liberado nas áreas onde o problema da praga não foi solucionado.

Assim, o objetivo deste trabalho foi o de otimizar a criação de *A. citricola*, estudando-se a biologia e a capacidade de parasitismo do parasitóide a 20, 25 e 30°C.

### Material e Métodos

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Piracicaba, da Universidade de São Paulo (USP).

**Criação Estoque da Praga e do Inimigo Natural.** Populações de *A. citricola* foram mantidas em laboratório a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , UR  $70 \pm 10\%$  e fotofase de 14h sobre *P. citrella*, utilizando-se a metodologia de criação do minador-dos-citros desenvolvida por Chagas & Parra (2000).

**Parasitismo de *A. citricola* sobre Ovos e Lagartas de 1º Ínstar de *P. citrella*.** Para obtenção de ovos e lagartas de 1º ínstar de *P. citrella*, 100 plantas de limão cravo (*Citrus limonia* L. Obseck) mantidas em tubetes, foram colocadas em gaiolas de madeira, com 60 cm de aresta, com dois casais de *P. citrella* por planta, durante 48h. Ao ser constatado o número de 300 ovos em um número de plantas que variou entre 40 e 60, estas foram separadas para a realização dos testes. Os ovos e as lagartas de 1º ínstar foram separados com o auxílio de microscópio estereoscópico, e expostos ao parasitismo a 33 fêmeas de *A. citricola* em testes de livre escolha e confinamento (Lara 1991) durante 48h. Os testes foram conduzidos em gaiolas de madeira, de 60 cm de aresta, recobertas por tela anti-afídeos, de coloração branca, com a parte frontal de vidro. Após a realização dos testes, as plantas contendo ovos e lagartas de 1º ínstar, foram mantidas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , UR:  $70 \pm 10\%$  e fotofase 14h. No 14º dia, ramos de limão cravo foram cortados, e cada câmara pupal do minador foi aberta, observando-se a presença ou não do parasitóide. O delineamento experimental foi totalmente ao acaso com cinco repetições para os testes de livre escolha e de confinamento. Os resultados foram transformados em  $\sqrt{(x + 1)}$  e submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

**Influência de Três Temperaturas na Capacidade de Parasitismo e Biologia de *A. citricola*.** Desde que não houve diferenças no parasitismo de ovos e lagartas de 1º ínstar de *P. citrella*, optou-se pela utilização de ovos para a avaliação do efeito das três temperaturas no desenvolvimento de *A. citricola*. O bioensaio foi conduzido em gaiolas constituídas de material plástico, cilíndrico, de 9,5 cm de altura, cuja base menor, mediu 7,8 cm de diâmetro e a maior 9,8 cm, onde se acoplou uma tampa de 10,5 cm de diâmetro. Nas paredes e na base menor do recipiente, foram feitas quatro aberturas circulares, de 2,8 cm de diâmetro, recobertas por tecido *voile*, para permitir a aeração. Na tampa, foi realizado um corte de raio 5,5 cm cuja extremidade, no centro da tampa, terminou

em um pequeno círculo de 0,8 cm de diâmetro. Assim, a tampa pôde ser aberta e acoplada ao caule de uma planta de limão cravo, a qual foi fixada à mesma, com o auxílio de pequenos pedaços de fita adesiva, os quais impediram a fuga dos insetos (Fig. 1A). A gaiola, por sua vez, foi acoplada à tampa, confinando o inseto (Fig. 1B). Plantas contendo vinte ovos de *P. citrella* foram diariamente oferecidas às fêmeas de *A. citricola*, nas temperaturas de 20, 25 e 30°C, até a morte das mesmas, no total de 22 fêmeas por tratamento. Na troca diária de plantas, o parasitóide foi confinado em um pequeno tubo de ensaio e recolocado, posteriormente, na gaiola com a nova planta. Após o período de exposição às fêmeas, as plantas contendo os ovos, foram mantidas em grades de metal, em bandejas com água, em suas respectivas temperaturas. Observações biológicas diárias foram realizadas até a formação de pupas do parasitóide, quando então, as folhas contendo as pupas foram acondicionadas em tubos de vidro de 8,5 cm de altura e 2,3 cm de diâmetro, contendo três retângulos de papel de filtro de 7 cm x 1 cm, a fim de se manter a umidade nas respectivas temperaturas.

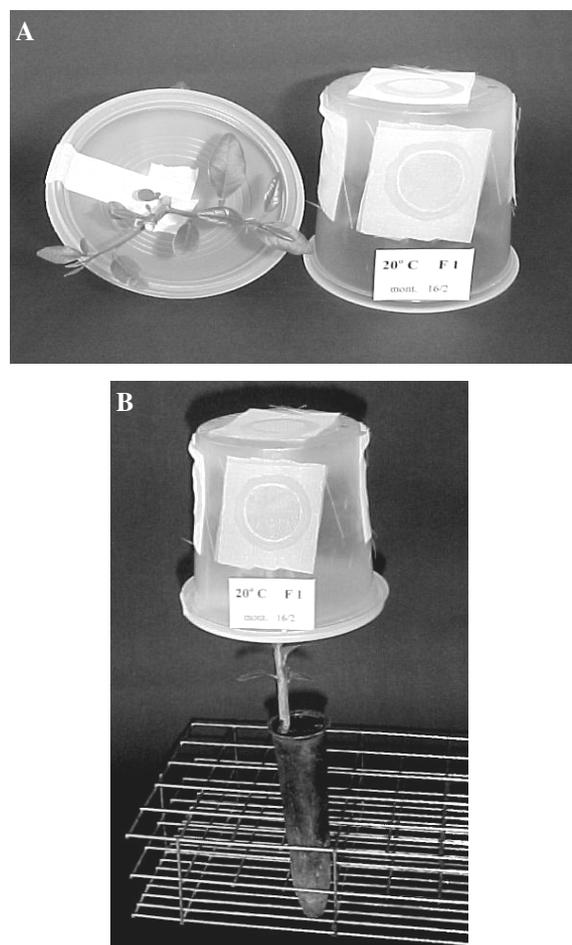


Figura 1. Gaiola para teste da influência de três temperaturas na capacidade de parasitismo e biologia de *A. citricola* UR:  $70 \pm 10\%$  e fotofase 14h. A. Detalhe da tampa e base da gaiola; B. Detalhe da gaiola acoplada à tampa, confinando o inseto.

Avaliaram-se, em cada temperatura, a porcentagem de parasitismo, longevidade e sobrevivência, média de pupas de *A. citricola* por hospedeiro, viabilidade pupal e duração do período ovo-adulto do parasitóide. Os resultados de capacidade de parasitismo e longevidade das fêmeas foram transformados em e submetidos a análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. A sobrevivência de *A. citricola* foi analisada pelo modelo de distribuição de Weibull (Sgrillo 1982).

Como o objetivo desta pesquisa foi determinar a melhor temperatura para otimizar a criação do parasitóide, estimou-se o número de gerações, durante um ano, de *A. citricola* levando-se em conta a duração do período ovo-adulto. Calculou-se o número de insetos produzidos por temperatura/fêmea durante um ano, com base no número de pupas produzidas e na sua viabilidade, durante as gerações possíveis.

## Resultados e Discussão

**Parasitismo de *A. citricola* em Ovos e Lagartas de 1º Instar de *P. citrella*.** O parasitismo médio foi baixo, tanto sobre ovos ( $19,3 \pm 11,01\%$  e  $29,6 \pm 13,14\%$ ) como sobre lagartas de 1º instar ( $16,2 \pm 7,47\%$  e  $34,5 \pm 12,54\%$ ), para ambos, em teste de livre escolha e confinamento, respectivamente, considerando-se o número de ovos e lagartas oferecidos (300/repetição). O baixo parasitismo pode ter sido consequência da mortalidade de *A. citricola* durante seu desenvolvimento, fato não estudado no presente trabalho, sugerindo-se pesquisas neste sentido. Como não houve diferenças estatísticas entre o parasitismo de ovos e de lagartas de 1º instar, optou-se por oferecer ovos de *P. citrella*, devido à facilidade e rapidez na obtenção dos mesmos. *A. citricola* é poliembriônico (Logvinovskaya 1983, Edwards & Hoy 1998), e nos dois testes (confinamento e livre escolha) formaram-se de uma a seis pupas do parasitóide, não havendo diferenças numéricas no parasitismo de ovos ou lagartas de 1º instar de *P. citrella*.

**Influência de Três Temperaturas na Capacidade de Parasitismo e Biologia de *A. citricola*.** A temperatura não afetou a capacidade de parasitismo de *A. citricola*, a qual variou de 20,2% a 26,0% a 20°C e 30°C (Tabela 1), bem como a longevidade média das fêmeas. Por outro lado, a longevidade média de *A. citricola* a 25°C (Tabela 1) foi superior àquelas encontrada por Smith e Hoy (1995) e por Argov & Rössler (1996,1998), o mesmo ocorrendo em relação à temperatura de 30°C, onde a longevidade média foi superior àquela

Tabela 1. Porcentagem de parasitismo de *A. citricola* e longevidade média das fêmeas em três temperaturas, UR:  $70 \pm 10\%$  e fotofase 14h.

| Temperatura (°C) | Parasitismo de <i>A. citricola</i> (%) | Longevidade das fêmea (dias) <sup>1</sup> |
|------------------|--|---|
| 20               | $20,2 \pm 1,80$ a                      | $7,8 \pm 1,80$ a                          |
| 25               | $22,4 \pm 1,85$ a                      | $8,5 \pm 1,05$ a                          |
| 30               | $26,0 \pm 2,23$ a                      | $5,4 \pm 0,44$ a                          |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup>Dados transformados em  $\sqrt{(x+1)}$

encontrada por Hoy & Nguyen (1997) e Edwards & Hoy (1998). Estes últimos autores observaram a 30°C e em umidades de 96, 80, 63 e 30%, a máxima longevidade de quatro dias em UR de 96% e longevidade menor do que 24h em umidades inferiores. A umidade afetou a longevidade dos adultos no trabalho realizado por Edwards & Hoy (1998), sendo que no presente trabalho, a UR não foi levada em consideração, pois utilizou-se a melhor UR para a espécie ( $70 \pm 10\%$ ), determinada por M.C.M. Chagas (informação pessoal).

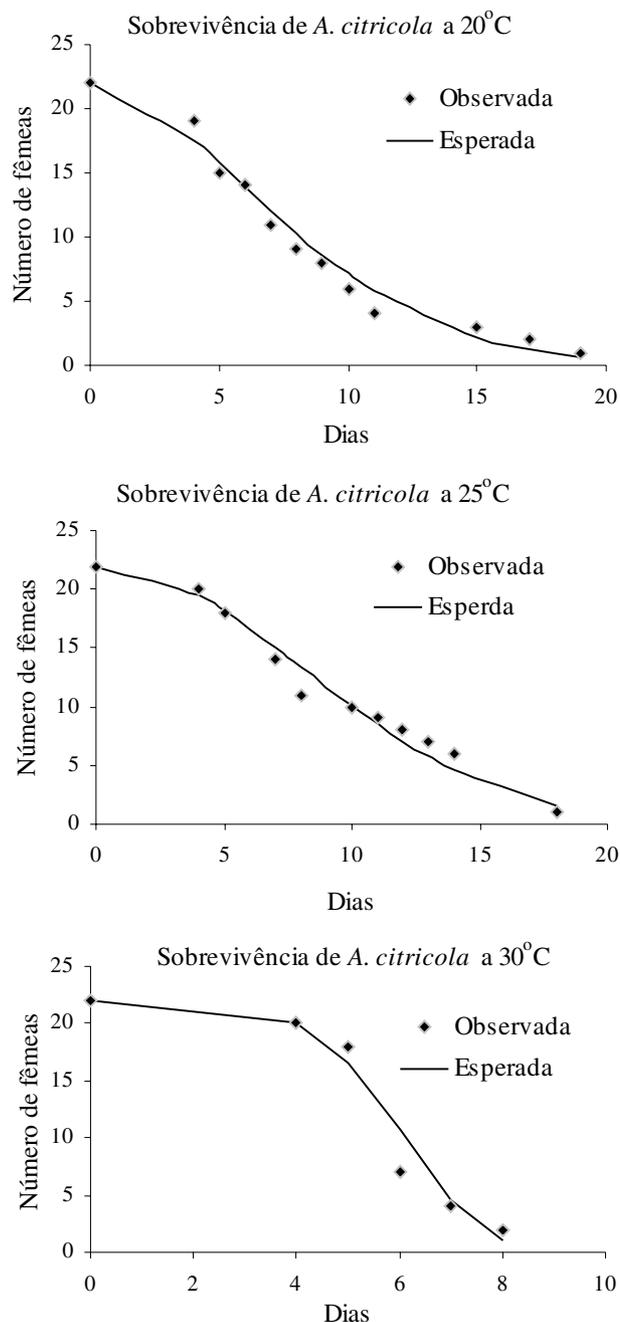


Figura 2. Sobrevivência observada e esperada de fêmeas de *A. citricola* em três temperaturas, UR:  $70 \pm 10\%$  e fotofase 14h, segundo o modelo de distribuição de Weibull.

Embora para a longevidade média das fêmeas não tenha ocorrido influência da temperatura, a sobrevivência esperada, através do modelo de weibull, foi maior nas temperaturas de 20°C e 25°C, variando de 19 a 18 dias respectivamente. A 30°C, a sobrevivência das fêmeas não ultrapassou oito dias (Fig. 2). A média de pupas por hospedeiro foi maior a 25°C e menor a 30°C variando de 5,6 a 3,9 pupas, respectivamente (Tabela 2). Foram observadas de uma a sete pupas de *A. citricola* por hospedeiro em todas as temperaturas testadas; no entanto, a porcentagem de ocorrência de duas pupas foi a mais comum, sendo registrada em 43,6% dos casos (Tabela 3).

A viabilidade pupal foi maior a 20°C em relação às outras temperaturas, sendo de 58,4%, diferindo dos valores obtidos a 25°C (43,9%) e a 30°C (32,3%) (Tabela 2). A duração do período ovo-adulto decresceu com o aumento da temperatura sendo de 23,6 dias a 20°C, de 18,1 dias a 25°C e de 13,8 dias a 30°C (Tabela 2).

Durante uma geração de laboratório de *A. citricola*, a longevidade das fêmeas foi estatisticamente semelhante nas

Tabela 2. Frequência média de pupas de *A. citricola* por hospedeiro, viabilidade pupal e duração do período ovo-adulto do parasitóide em três temperaturas, UR: 70 ± 10% e fotofase 14h.

| Temp. (°C) | Média de pupas/hospedeiro <sup>1</sup> | Viabilidade pupal (%) | Duração do período ovo – adulto (dias) <sup>1</sup> |
|------------|--|-----------------------|---|
| 20         | 4,2 ± 1,01 ab                          | 58,4 ± 4,64 a         | 23,6 ± 0,35 a                                       |
| 25         | 5,6 ± 1,16 a                           | 43,9 ± 1,85 b         | 18,1 ± 0,22 b                                       |
| 30         | 3,9 ± 0,83 b                           | 32,3 ± 3,15 b         | 13,8 ± 0,18 c                                       |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup>Dados transformados para  $\sqrt{(x+1)}$

Tabela 3. Frequência de (%) de pupas de *A. citricola* / hospedeiro a 20, 25 e 30°C, UR: 70 ± 10% e fotofase 14h.

| Nº de pupas de <i>A. citricola</i> /hospedeiro | Ocorrência (%) <sup>1</sup> |
|--|-----------------------------|
| 1  | 33,6 ± 0,94 b               |
| 2  | 43,6 ± 1,49 a               |
| 3  | 17,1 ± 0,71 c               |
| 4  | 4,2 ± 0,25 d                |
| 5  | 0,9 ± 0,09 e                |
| 6  | 0,3 ± 0,07 e                |
| 7  | 0,3 ± 0,01 e                |

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup>Dados transformados para  $\sqrt{(x+1)}$

Tabela 4. Total de adultos de *A. citricola* conseguidos em um ano, em três temperaturas, a partir do número de pupas produzido por uma fêmea do parasitóide e do número de gerações do inseto.

| Temperatura (°C) | Pupas produzidas/fêmea/geração | Viabilidade pupal (%) | Número de gerações/ano | Total de adultos/ano |
|------------------|--------------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|
| 20               | 61                             | 58,4                  | 15,47                  | 551,11               |
| 25               | 84                             | 43,9                  | 20,17                  | 743,80               |
| 30               | 56                             | 32,3                  | 26,45                  | 478,43               |

três temperaturas (Tabela 1); por outro lado, a viabilidade pupal foi maior a 20°C (Tabela 2), sendo o número de pupas produzido semelhante a 20°C e 25°C (Tabela 2). Entretanto para grandes criações (objetivo do presente trabalho), o número estimado de adultos produzidos durante um ano na temperatura de 25°C é 25,9% maior em relação ao obtido a 20°C e 35,7% superior ao obtido a 30°C (Tabela 4). Assim, indica-se a temperatura de 25°C como a mais adequada para a criação contínua do parasitóide *A. citricola* em laboratório.

### Agradecimentos

A Rita de Cássia R.G. Gervásio e Ronaldo Reis, do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da ESALQ/USP, pelo auxílio nas análises estatísticas. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa de pesquisa para o primeiro autor. Ao Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), pelo suporte financeiro e apoio logístico.

### Literatura Citada

- Argov, Y. & Y. Rössler. 1996.** Introduction, release and recovery of several exotic natural enemies for biological control of the citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella*, in Israel. *Phytoparasitica* 24: 33-38.
- Argov, Y. & Y. Rössler. 1998.** Rearing methods for the citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* Stainton, and its parasitoids in Israel. *Biol. Control* 11: 18-21.
- Chagas, M.C.M. & J.R.P. Parra. 2000.** *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae): técnica de criação e biologia em diferentes temperaturas. *An. Soc. Entomol. Brasil* 29: 227-235.
- Chagas, M.C.M., J.R.P. Parra, P. Milano, A.M. Nascimento, A.L.G.C. Parra e P.T. Yamamoto. 2002.** *Ageniaspis citricola*: criação e estabelecimento no Brasil. P. 377-391. J.R.P.Parra, P.S.M. Botelho, B.S.Corrêa-Ferreira e J.M.S. Bento. *Controle biológico no Brasil: Parasitóides e predadores*. São Paulo, Manole, 635p.
- Edwards, O.R. & M.A. Hoy. 1998.** Biology of *Ageniaspis citricola* (Hymenoptera: Encyrtidae), a parasitoid of the leafminer *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae). *An. Entomol. Soc. Am.* 91: 654-660.
- Garijo, C. & E.J. Garcia. 1994.** *Phyllocnistis citrella* (Stainton, 1856) (Insecta: Lepidoptera: Gracillariidae:

- Phyllocnistinae) en los cultivos de cítricos de Andalucía (Sur España): biología, ecología y control de la plaga. Bol. San. Veg. Plagas 20: 815-816.
- Gravena, S. 2001.** “Vespinha importada controla minadora”: *Ageniaspis citricola*, a microvespa que veio da Flórida, se deu bem na citricultura brasileira e foi um sucesso no controle biológico da Minadora dos Citros. Citricultura Atual 22: 14-15.
- Hoy, M.A. & R. Nguyen. 1997.** Classical biological control of the citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae): Theory, practice, art and science. Trop. Lepid. 1: 19.
- Lara, F.M. 1991.** Princípios de resistência de plantas a insetos. São Paulo, Cone, 336p.
- Logvinovskaya, T.V. 1983.** A new species of *Ageniaspis* Dahlbom 1857 (Hymenoptera, Encyrtidae) from Vietnam. Entomol. Rev. 62: 150-152.
- Neale, C., D. Smith, G.A.C. Beattie & M. Miles. 1995.** Importation host specificity testing rearing and release of three parasitoid of *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae) in Eastern Australia. J. Austr. Entomol. Soc. 34: 343-348.
- Sacariás, E.N. & A.C. Canales. 1999.** *Ageniaspis citricola* Logvinovskaya, 1983 (Hymenoptera: Encyrtidae) controlador de *Phyllocnistis citrella* “minador de la hoja de los citricos”: experiencia peruana. Lima, SENASA, 88p.
- Schauff, M.E., J. LaSalle & G.A. Wijesekara. 1998.** The genera of Chalcididae parasitoids (Hymenoptera: Chalcidoidea) of citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* Stainton (Lepidoptera: Gracillariidae). J. Nat. Hist. 32: 1001-1056.
- Sgrillo, R.B. 1982.** A distribuição de Weibull como modelo de sobrevivência de insetos. Ecosystema 7: 9-13.
- Smith, J.M. & M.A. Hoy. 1995.** Rearing methods for *Ageniaspis citricola* (Hymenoptera: Encyrtidae) and *Cirrospilus quadristriatus* (Hymenoptera: Eulophidae) reared in a classical biological control program for the citrus leafminer *Phyllocnistis citrella* (Lepidoptera: Gracillariidae). Fla. Entomol. 78: 601-608.
- Urbaneja, A., J.A. Jacas, M. Verdu & A. Garrido. 1998.** Dinámica e impacto de los parasitoides autóctonos de *Phyllocnistis citrella* Stainton en la Comunidad Valenciana. Investig. Agr. Série Protecion Vegetal, 13: 409-423.
- Wilink, E., D. Figueroa & P. H. Zamudio. 1998.** Control biológico del minador de la hoja de los citricos. Av. Agroind. 18: 14-18.

Received 22/01/02. Accepted 23/05/03.

---